

Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

**BIOCATALISADORES DE ORIGEM MARINHA
(ALGAS, BACTÉRIAS E FUNGOS) PARA REDUÇÃO
ESTEREOSELETIVA DE CETONAS**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade
de São Paulo, para a obtenção do título
de Mestre em Físico-Química.

Ana Maria Mouad

Orientador: Professor Doutor André Luiz Meleiro Porto

Dedicatória

*Dedico este trabalho aos meus pais Luis Antônio e Maria Izildinha,
Aos meus irmãos Daniel e Mariana.*

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por estar ao meu lado, me guiando e protegendo em todos os momentos.

Ao Professor Doutor André, pela orientação, amizade, respeito e liberdade de expressão.

Aos amigos de laboratório: Mariana, Lenilson, Julieta, Hércules, Isac, Yara, Gliseida, Scarlet, alunos de IC. Obrigada pelo apoio e companheirismo no trabalho, e pela amizade, bom humor e descontração!

Aos meus pais, que são minha vida e aos meus amados irmãos Daniel e Mariana. Não encontro palavras para expressar minha gratidão e meu amor por vocês!

Professora Dra Hosana M. Deboni pela grande contribuição neste trabalho, pelo carisma e carinho com que sempre nos recebeu em seu laboratório na FCFRP/USP. Agradeço também aos alunos de seu grupo.

Ao Professor Dr. Roberto Gomes Berlinck e à aluna Stellamar Homminger, pela concessão de linhagens da alga *Sargassum* sp.

Aos queridos amigos conquistados durante estes anos em São Carlos: Livia (Tarta), Fernanda (Coxinha), Tati, Karen (Kaká), Monise, Scooby, Cóxa, Mp, Bolão, Letícia, Juba, e tantas outras pessoas especiais que transformaram momentos comuns em momentos inesquecíveis de alegria e amizade.

À minhas amigas Renata e Cinthia, companheironas de longa data.

Aos meus amigos Ivan, Beué e Denis, vocês são únicos e exclusivos!

À minha família Giazzi, em especial, à minha "irmã" de coração Camila e à pequena Ana Clara.

Ao Instituto de Química de São Carlos.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida.

RESUMO

BIOCATALISADORES DE ORIGEM MARINHA (ALGAS, BACTÉRIAS E FUNGOS) PARA REDUÇÃO ESTEREOSSELETIVA DE CETONAS

Neste trabalho foram realizadas reações de redução de cetonas empregando diferentes organismos marinhos como biocatalisadores (algas, fungos e bactérias). Nas triagens foram utilizados derivados de acetofenonas (*o*-iodoacetofenona, *m*-iodoacetofenona, *p*-iodoacetofenona, *o*-fluoroacetofenona, *o*-cloroacetofenona, *o*-bromoacetofenona, *o*-nitroacetofenona) e duas cetonas 1,3-dicarboniladas: a 4,4,4-trifluor-1-(furan-2-il)butano-1,3-diona e a 4,4,4-trifluor-1-(naftalen-2-il)butano-1,3-diona. As reações com as algas marinhas *Bostrychia tenella* e a *Bostrychia radicans* levaram aos álcoois com excelentes seletividades (*ee* >98%), contudo, obtiveram-se baixas conversões. Foram isoladas as bactérias Bt-01 (*B. tenella*) e Bt-02 (*B. radicans*), as quais catalisaram as reduções das acetofenonas com resultados similares aos obtidos com as algas. Os fungos (Br-09, Br-23, Br-27, Br-61) isolados da alga *B. radicans* reduziram as acetofenonas com boas seletividades e conversões. Ainda, reações de redução das acetofenonas com quatro linhagens de fungos isolados da alga *Sargassum* sp (SMA2-C, SMA2-8, SMA2-58, SGPY-41) levaram a obtenção dos respectivos álcoois com diferentes conversões e seletividades. As reduções das cetonas 1,3-dicarboniladas foram realizadas com as algas *B. tenella* e *B. radicans*, e com sete linhagens de fungos marinhos (*Aspergillus sydowii* Ce15, *Aspergillus sydowii* Ce19, *Aspergillus sydowii* Gc12, *Bionectria* sp Ce5, *Penicillium raistrickii* Ce16, *Penicillium miczynskii* Gc5 e *Trichoderma* sp Gc1). As algas e os fungos marinhos catalisaram a redução regioseletiva e estereosseletiva das cetonas 1,3-dicarboniladas, onde ocorreu a redução do grupo α -trifluorcarbonílico. Concluiu-se que as algas e seus microrganismos associados, e os fungos marinhos têm potencial para serem utilizados como biocatalisadores em reações de redução. Este trabalho foi o primeiro estudo realizado no país envolvendo algas marinhas e seus microrganismos associados em reações de redução de cetonas, cujos resultados são bastante promissores.

ABSTRACT

BIOCATALYSTS FROM MARINE ORIGIN (ALGAE, BACTERIA AND FUNGI) FOR STEREOSELECTIVE REDUCTION OF KETONES

In this work, were investigated the ketone reduction reactions using several marine organisms as biocatalysts (algae, fungi and bacteria). In the screening were utilized acetophenone derivatives (*o*-iodoacetophenone, *m*-iodoacetophenone, *p*-iodoacetophenone, *o*-fluoroacetophenone, *o*-chloroacetophenone, *o*-bromoacetophenone, *o*-nitroacetophenone) and two 1,3-dicarbonylated compounds: 4,4,4-trifluoro-1-(furan-2-yl)butane-1,3-dione and 4,4,4-trifluoro-1-(naftalen-2-yl)butane-1,3-dione. The reactions with algae *Bostrychia tenella* and *Bostrychia radicans* afforded the alcohols with high selectivities (*ee* > 98%), however, with low conversions. The bacteria Bt-01 and Bt-02 were isolated from algae *B. tenella* and *B. radicans*, respectively, which catalyzed the reductions of acetophenones as the same as obtained with the algae. The acetophenones were reduced by several fungi (Br-09, Br-23, Br-27, Br-61) in good selectivities and conversions. These fungi were isolated from *Bostrychia radicans*. In addition, the acetophenone reduction reactions were screened with four strains of fungi, which were isolated from algae *Sargassum* sp (SMA2-C, SMA2-8, SMA2-58, SGPY-41). The alcohols were obtained with different conversions and selectivities. The reductions of 1,3-dicarbonylated compounds were carried out with the algae *B. tenella* and *B. radicans*, and marine fungi (*Aspergillus sydowii* Ce15, *Aspergillus sydowii* Ce19, *Aspergillus sydowii* Gc12, *Bionectria* sp Ce5, *Penicillium raistrickii* Ce16, *Penicillium miczynskii* Gc5 and *Trichoderma* sp Gc1). The algae and marine fungi catalyzed regio- and estereoselectively reductions of the 1,3-dicarbonylated compounds. The α -trifluoromethylcarbonyl group was reduced preferentially. In conclusion, the algae and associated micro-organisms and marine fungi have potential for catalyzing ketone reduction reactions. This investigation was the first study carried out in the Brazil by using algae and associated micro-organisms in the ketone reduction reactions. The obtained results here are promising and interesting.

Índice

Parte I - Introdução

Introdução	2
Enzimas	3
Classes de Enzimas e suas Aplicações	7
Vantagens na utilização de enzimas em reações	7
Cofatores	9
Coenzimas e sua participação em reduções de cetonas	10
Regra de Prelog	12
Redução de cetonas para obtenção de alcoóis quirais	13
Redução de cetonas com micro-organismos	14

Parte II - Materiais e Métodos

Reagentes e solventes	21
Preparação dos álcoois racêmicos	22
Algas <i>Bostrychia tenella</i> e <i>Bostrychia radicans</i>	23
Isolamento de bactérias das algas <i>B. tenella</i> e <i>B. radicans</i>	24
Isolamento de fungos da alga <i>Sargassum</i> sp	24
Isolamento de fungos da alga <i>Bostrychia radicans</i>	26
Fungos marinhos	27
Meios de cultivo pra crescimento dos microrganismos	28
Água do mar artificial	28
Reações de biocatálise com algas <i>B. tenella</i> e <i>B. radicans</i>	29
Reações de biocatálise com as bactérias e fungos isolados das algas (<i>B. tenella</i> , <i>B. radicans</i> e <i>Sargassum</i> sp) e com os fungos marinhos	29
Extração das reações para determinação dos rendimentos	30
Cromatografia em coluna	31
Evaporadores rotativos	31
Agitador orbital rotativo termostatizado	31
Outros equipamentos	31

Rotação óptica e configuração absoluta	32
Cromatografia a gás	33
Parte III- Resultados e Discussões	35
Isolamento de microrganismos associados às algas <i>Bostrychia tenella</i> e <i>Bostrychia radicans</i>	36
Redução de iodoacetofenonas com a alga marinha <i>Bostrychia tenella</i>	40
Redução de iodoacetofenonas com a alga marinha <i>Bostrychia radicans</i>	46
Redução de iodoacetofenonas com as bactérias associadas às algas marinhas <i>Bostrychia tenella</i> e <i>Bosrtychia radicans</i>	48
Redução de <i>orto</i> -acetofenonas com a alga marinha <i>Bostrychia tenella</i>	53
Redução de derivados de acetofenonas com os microrganismos isolados da alga marinha <i>Bostrychia radicans</i>	59
Redução de derivados de acetofenonas com fungos isolados da alga <i>Sargassum</i> sp	65
Redução de α -trifluormetilcetonas com fungos marinhos	68
Considerações Finais	79
Conclusões	80
Parte IV - Referências Bibliográficas	82

Lista de figuras

Introdução

Figura 1. Estrutura primária de uma proteína	3
Figura 2. Exemplos de quimi-regiosseletividade	4
Figura 3. Moléculas de efedrina, ampicilina e cefadroxil obtidas por biotransformações	5
Figura 4: Coenzimas NADH e NADPH	10
Figura 5. Transferência de íon hidreto do cofator NAD(P)H ao grupo carbonílico no sítio ativo de uma álcool desidrogenase	12
Figura 6. Redução de cetona para obtenção de álcool quiral	14
Figura 7. Redução de <i>p</i> -acetofenonas com <i>Candida magnoliae</i>	15
Figura 8. Redução de derivados de acetofenonas com as algas <i>C. merolae</i> e <i>C. caldarium</i>	16
Figura 9. Redução assimétrica da pentafluoracetofenona com <i>Synechococcus</i> sp	16
Figura 10. Biotransformação de α -bromocetonas com <i>S. platenis</i>	17

Materiais e métodos

Figura 1. Cetonas utilizadas nas reações de biorredução	21
Figura 2. Alcoóis racêmicos	23

Resultados e Discussões

Figura 1. Alga <i>B. tenella</i> e <i>B. radicans</i> suspensas em água esterilizada	37
Figura 2. Bactérias isoladas das algas marinhas <i>B. tenella</i> (Bt-01) e <i>B. radicans</i> (Br-01) em meio de cultura NB (<i>nutrient broth</i>)	37
Figura 3. Colônias de microrganismos obtidas da alga <i>Bostrychia radicans</i> em meio de batata	38
Figura 4. Fungos isolados da alga <i>Bostrychia radicans</i> e cultivados em meio de cultura de extrato de malte.	39

*linhagem Br-62 não utilizada nas reações de biocatálise

Figura 5. Cromatogramas obtidos por CG (A) padrão da <i>o</i> -iodoacetofenona 1 (B) padrão do 1-(2-iodofenil)etanol <i>rac</i> - 4	43
Figura 6. (A) padrão da <i>m</i> -iodoacetofenona 2 (B) padrão do 1-(3-iodofenil)etanol <i>rac</i> - 5	44
Figura 7. (A) padrão da <i>p</i> -iodoacetofenona 3 (B) padrão do 1-(2-iodofenil)etanol <i>rac</i> - 6	45
Figura 8. Reação da <i>o</i> -iodoacetofenona 1 com a bactéria Br-01 isolada da alga <i>Bostrychia radicans</i> (8 dias de reação)	52
Figura 9. (A) padrão da <i>o</i> -fluoroacetofenona 7 (B) padrão do 1-(2-fluorfenil)etanol <i>rac</i> - 11	55
Figura 10. (A) padrão da <i>o</i> -cloroacetofenona 8 (B) padrão do 1-(2-clorofenil)etanol <i>rac</i> - 12	56
Figura 11. (A) padrão da <i>o</i> -bromoacetofenona 9 (B) padrão do 1-(2-bromofenil)etanol <i>rac</i> - 13	57
Figura 12. (A) padrão da <i>o</i> -nitroacetofenona 10 (B) padrão do 1-(2-nitrofenil)etanol <i>rac</i> - 14	58
Figura 13. Cromatograma obtido por CG da reação da <i>p</i> -iodoacetofenona 3 com fungo Br-09 isolado da alga <i>B. radicans</i> com 10 dias de reação	
Figura 14. Cromatogramas das reações de redução com o fungo Br-09 isolado a alga <i>B. radicans</i> com 10 dias de reação. (A) <i>o</i> -fluorfeniletanol 7 (B) <i>o</i> -nitrofeniletanol 10	64
Figuras 15. Cromatogramas das reações da <i>o</i> -cloroacetofenona 8 com fungos solados da alga <i>Sargassum</i> sp com 10 dias de reação (A) fungo SMA2-8 (B) fungo SGPY-41	68
Figura 16. Colônias de fungos marinhos cultivadas em extrato de malte 2%	69
Figura 17. Regra de Prelog para a redução da cetona 17 com fungos marinhos	71
Figura 18. Cromatogramas obtidos por CG. (A) padrão da dicetona 15 (B) padrão do álcool <i>rac</i> - 17	74
Figura 19. Cromatogramas das reações da dicetona 15 com fungos marinhos com 7 dias de reação (A) <i>Penicillium raistrickii</i> Gc5 (B) <i>Aspergillus sydowii</i> Ce19	75
Figura 20. (A) padrão da dicetona 16 (B) padrão do álcool <i>rac</i> - 18	76

Figura 21. Cromatogramas obtidos por CG das reações da dicetona 15 com fungos marinhos em 7 dias de reação (A) <i>Penicillium raistrickii</i> Gc5	76
--	----

LISTA DE TABELAS

Introdução

6

Tabela 1. Classificação das enzimas

Tabela 2. Vantagens e desvantagens no uso de células totais ou enzimas isoladas 9

Tabela 3. Redução de cetonas alifáticas e aromáticas com *S. cerevisiae* 14

Tabela 4. Redução de cetonas com algas marinhas 18

Materiais e Métodos

30

Tabela 1. Rendimento das reações biorredução

Tabela 2. Dados de rotação óptica e tempo de retenção dos enantiômeros dos álcoois em coluna quiral CP-Chirasil-Dex-CB-Varian 32

Tabela 3. Programação utilizada no CG para as análises das reações 34

Resultados e Discussões

Tabela 1. Redução de iodoacetofenonas **1 – 3** com a alga marinha *Bostrychia tenella* 41

Tabela 2. Redução de iodoacetofenonas **1 – 3** com a alga marinha *Bostrychia radicans* 47

Tabela 3. Redução de iodoacetofenonas **1 – 3** com a bactéria Bt-01 isolada da alga marinha *Bostrychia tenella* 49

Tabela 4. Redução de iodoacetofenonas **1 – 3** com a bactéria Br-01 isolada da alga marinha *Bostrychia radicans* 51

Tabela 5. Redução de *orto*-acetofenonas **7 – 10** com a alga marinha *Bostrychia tenella* 54

Tabela 6. Redução de *o*-acetofenonas **7 – 10** com a bactéria Br-01 61

isolada da alga marinha *Bostrychia radicans*

Tabela 7. Redução de iodoacetofenonas 1 – 3 com os fungos Br-09 e Br-61 isolados da alga marinha <i>Bostrychia radicans</i>	61
Tabela 8. Redução de <i>o</i> -acetofenonas 7 – 10 com os fungos Br-09, Br-23, Br-27 e Br-61 isolados da alga marinha <i>Bostrychia radicans</i>	63
Tabela 9. Redução de <i>o</i> -acetofenonas 7 – 10 com fungos isolados da alga marinha <i>Sargassum</i> sp	66
Tabela 10. Redução da α -trifluormetilcetona 15 com os fungos marinhos	70
Tabela 11. Redução da α -trifluormetilcetona 16 com os fungos marinhos	72
Tabela 12. Redução da α -trifluormetilcetona 15 com as algas marinhas	77
Tabela 13. Redução da α -trifluormetilcetona 16 com as algas marinhas	78

Biocatalisadores de origem marinha (algas, bactérias e fungos) para
redução estereosseletiva de cetonas

Introdução

Ana Maria Mouad

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

Nos últimos anos, a química tem evoluído de forma indiscutível em todas as suas áreas de atuação, contribuindo para os avanços tecnológicos. A grande maioria dos materiais e produtos utilizados pelo homem é confeccionada a partir de métodos que incluem transformações químicas. No entanto, a crescente demanda na síntese de substâncias orgânicas e inorgânicas ao longo dos anos, acarretou em um aumento na geração de subprodutos tóxicos que se reflete negativamente sobre o meio ambiente.

Desta forma, tornou-se fundamental a adoção de medidas ambientalmente adequadas, incentivando uma nova postura química, onde medidas de prevenção que minimizem riscos ao meio ambiente sejam aplicadas, seja no meio acadêmico ou no meio industrial (Silva, L.M., 2007). Neste contexto, uma extensão de rotas sintéticas empregando catalisadores naturais é atualmente uma das áreas mais importantes em síntese orgânica. Esta área é a biocatálise, a qual desenvolve transformações orgânicas em uma ou mais etapas, para a produção de substâncias bioativas com alto grau de pureza (Liljeblad, A. & Kanerva, L.T., 2006).

Os termos biocatálise e biotransformação abrangem os processos em que enzimas são utilizadas para catalisar reações químicas, porém fora do sistema bioquímico, ou seja, com substratos não naturais às suas vias metabólicas. Associado a biocatálise, o termo biotransformação pode ser aplicado para modificações específicas ou interconversões realizadas por enzimas na estrutura química de compostos em múltiplas etapas (Molinari *et al.*, 2007).

As enzimas fazem parte das células de organismos vivos como fungos filamentosos, algas, plantas, bactérias e leveduras, sendo também possível utilizá-las em formas isoladas provenientes de fontes comerciais. A utilização de catalisadores naturais na transformação de compostos orgânicos sintéticos é realizada há mais de 100 anos (Faber, 2004). No entanto, o desenvolvimento de biocatalisadores como

ferramenta de síntese expandiu-se apenas ao longo das últimas décadas, associado ao conhecimento do modo de ação destes catalisadores biológicos, as enzimas.

▪ **Enzimas**

Enzimas são macromoléculas predominantemente protéicas, imprescindíveis a qualquer ser vivo. Como proteínas, são formadas por longas seqüências de aminoácidos que adotam complexas estruturas tridimensionais, responsáveis por sua função (Figura 1). Como importantes funções estão regular e manter processos vitais, além da capacidade de acelerar reações químicas, que, em sua ausência, ocorreriam muito lentamente ou nem mesmo ocorreriam. (Said, S. & Pietro, R.C.L., 2004).

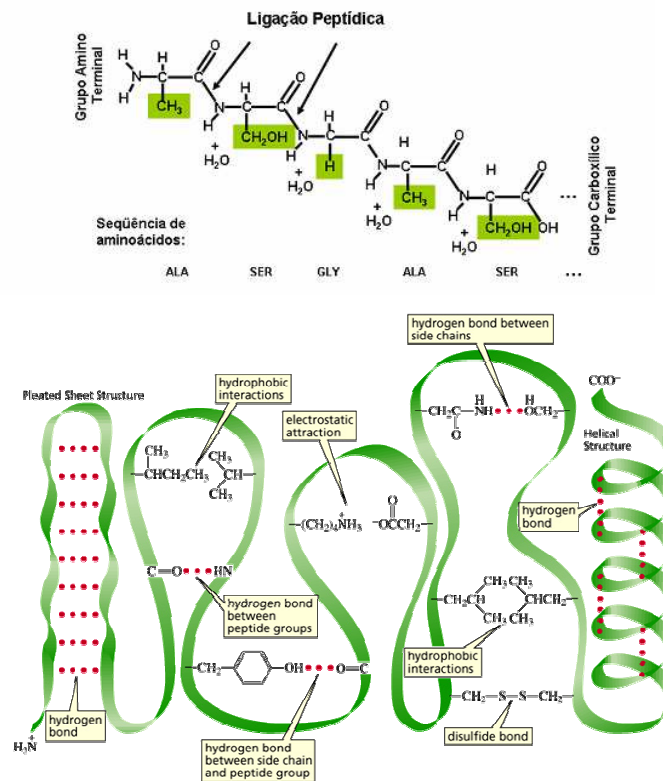


Figura 1. Estrutura primária de uma proteína (enzima). Estrutura tridimensional e suas interações (Dorn, 2008).

A ação de uma enzima está sempre associada a um sítio ativo ou a um ponto para “prender” substratos através de forças intermoleculares, conferindo à enzima uma alta especificidade catalítica (Lehninger, 2000). Um de seus aspectos mais importantes para a química orgânica é a estereosseletividade das reações que catalisam. Todas as enzimas são formadas por L-aminoácidos sendo, portanto, catalisadores quirais que apresentam configurações e conformações pré-determinadas. Como consequência, qualquer tipo de quiralidade presente na molécula de um substrato é “reconhecida” na formação do complexo enzima-substrato (Guthmann *et al.*,2002). Desta forma, as reações catalisadas pelas enzimas podem ser quimio- e/ou regioseletivas, seja atuando preferencialmente sobre um grupo funcional de um substrato que contenha diferentes funções ou distinguindo entre posições de um grupo funcional em uma determinada molécula (Faber, 2004).

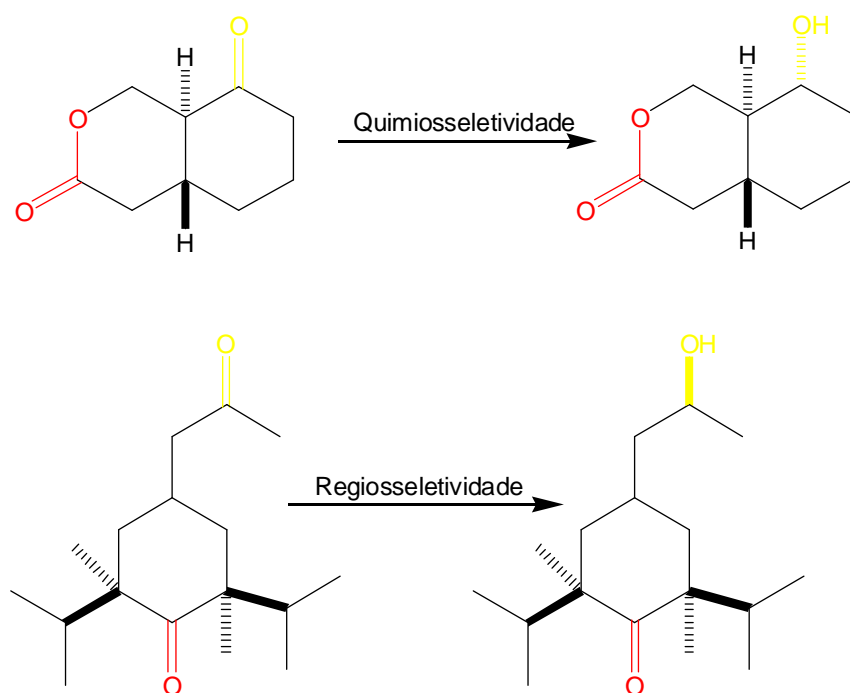


Figura 2: Exemplos de moléculas com diferentes grupos funcionais (quimiosseletividade), grupos funcionais iguais situados em diferentes regiões (regioseletividade).

Em compostos bioativos, tais como, produtos farmacêuticos e agroquímicos, a atividade biológica depende, em muitos casos de sua configuração absoluta. Normalmente um dos estereoisômeros apresenta atividade biológica, enquanto o outro é menos ativo, ou até mesmo tóxico ou inativo (Bonatto *et al.*, 2000). Desta forma, através da ação seletiva de uma enzima, um composto proquiral pode ser transformado em uma substância opticamente ativa e ainda, com formação predominante de um estereoisômero. Uma vez que mais da metade de moléculas candidatas a fármacos possuem mais de um estereocentro, os biocatalisadores quirais assumem grande importância, justificando o fato de mais de 10% da produção mundial de fármacos ser obtida por processos bioenzimáticos (biocatálise e biotransformação), (Faber, 2004).

A importância da biocatálise no desenvolvimento de novos fármacos e agrotóxicos é bem conhecida e, uma variedade de enzimas já é comumente utilizada em processos industriais. Como exemplo, pode-se citar os processos de síntese dos fármacos efedrina, com atividade β -adrenérgica obtido pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* e dos antibióticos ampicilina e cefadroxil obtidos pela enzima penicilina acilase (De Conti, 2001).

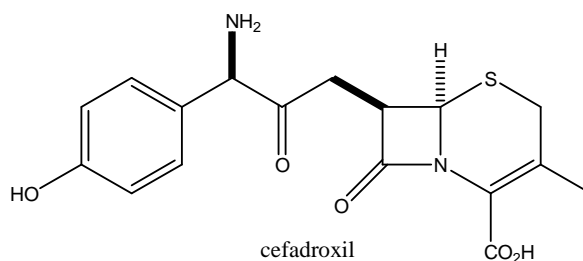
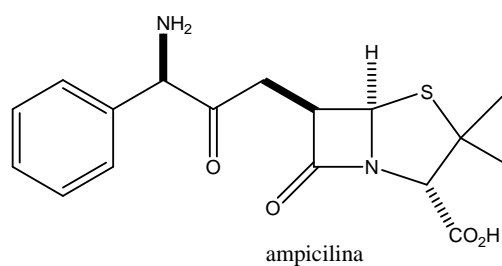
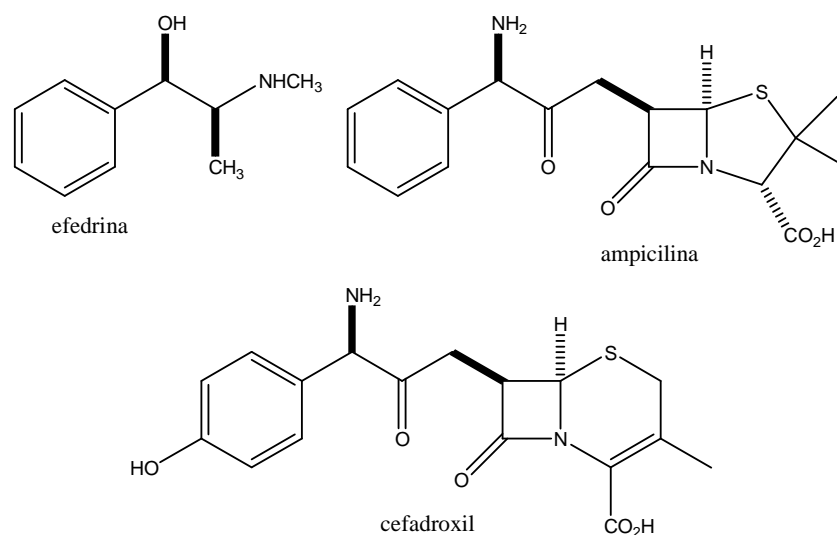


Figura 3. Moléculas de efedrina, ampicilina e cefadroxil obtidas por biotransformações

Além de atuarem na preparação de fármacos como precursores, compostos opticamente ativos são importantes na síntese de feromônios, aromas, fragrâncias, cosméticos e pesticidas (Utsukihara *et al.*, 2006). Estes compostos podem ser obtidos por diferentes rotas enzimáticas, levando-se em conta a reação de interesse (hidrogenação, hidrólise, hidroxilação, redução, oxidações, entre outras) e a classe de enzimas necessárias para tais transformações. Até o presente momento, cerca de 3200 enzimas são reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica (Faber, 2004). A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM) classifica as enzimas em seis grupos e cada uma delas em subgrupos de acordo com o tipo de reação que catalisam (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação das enzimas

Número	Classes	Tipo de reação catalisada	Subclasse	Utilidade ^a
1	Oxidoredutases	Oxidação-redução: oxigenação de ligações C-H, C-C, C=C, ou remoção ou adição de átomos de hidrogênio equivalentes.	Hydrogenases, oxidases, peroxidases, redutases	25%
2	Transferases	Reações de transferência de grupos aldeídos, cetonas, metil, fosforil.	Transaldolases, transcetolases	5%
3	Hidrolases	Formação de ésteres, aminas, lactonas, epóxidos, nitrilas.	Esterases, lipases, peptidases, fosfatases	60%
4	Liases	Adição-eliminação de pequenas moléculas em ligações C=C, C=N, C=O.	Descarboxilases, fosfatases	7%
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro da molécula para produzir isômeros	Racemases, epimerases	2%
6	Ligases	Formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O, C-N e ésteres de fosfato	Sintetases	1%

^aUtilidade estimada da classe de enzimas em transformações de substratos não naturais (Faber, 2004).

- **Classes de enzimas e suas aplicações**

Em biocatálise, as principais reações promovidas são de hidrólise, pela facilidade no manuseio e estabilidade das enzimas hidrolases, especialmente as lipases e esterases, seguidas de reações de oxidação e redução (Matsuda *et al.*, 2009). Indústrias de alimentos e de química fina são os principais mercados para a comercialização de enzimas oxidorreduções, no entanto, esta utilização é pequena comparada á das enzimas hidrolíticas (Xu, F., 2005). Com a diversidade de enzimas conhecidas, os processos biocatalíticos assumem importante papel em síntese orgânica de diversos compostos de interesse.

- **Vantagens na utilização de enzimas em reações biocatalíticas**

Além da grande diversidade enzimática, é conhecido que as enzimas atuam em condições reacionais brandas, como em temperaturas ambientes (20° - 40° C) e em soluções com pH em torno de 5 - 8, fato que minimiza problemas reacionais de decomposição, isomerização, racemização, eliminação. Ainda, os processos mediados por enzimas são acelerados por um fator de $10^8 - 10^{12}$, comparados com processos em que não ocorrem cataliticamente por sua intermediação. Também, frente aos catalisadores sintéticos que contém metais pesados, os biocatalisadores enzimáticos são vantajosos, pois são ambientalmente aceitáveis, uma vez que são completamente biodegradáveis (Faber, 2004). O tipo de biocatalisador a ser utilizado nestas condições (enzimas isoladas, livres ou imobilizadas, células de micro-organismos) pode depender de alguns fatores como o tipo de reação, se haverá ou não necessidade de cofatores e a escala em que as biotransformações devem ser conduzidas.

O procedimento mais comumente utilizado em biocatálise para a busca de novas enzimas é feito através de seleção de micro-organismos. Os micro-organismos neste caso são de particular interesse devido ao curto período de reprodução, a grande diversidade de processos metabólicos e enzimas envolvidas, além da diversidade de organismos na natureza que podem ser testados. Os micro-organismos modificam e degradam uma variedade de moléculas orgânicas, desde as mais simples até as mais complexas. Desta forma, é de se esperar que em experimentos de triagens pelo menos alguns apresentem capacidade para catalisar uma dada reação de interesse (De Conti *et al.*, 2001).

Pode-se também utilizar enzimas puras, as quais são isoladas de diferentes fontes, muitas delas disponíveis comercialmente. Enzimas isoladas que atuam como biocatalizadores em reduções assimétricas são bem documentadas (Margolin, A.L., 1993). Apesar de enzimas isoladas serem mais ativas e seletivas do que as células íntegras de micro-organismos e plantas, sua recuperação e purificação pode ser extremamente cara, e em muitos casos necessitam de um ou mais cofatores para que as reações se processem (Faber, 2004), enquanto células totais oferecem benefícios de custo (Quezada, M.A., 2009). Algumas comparações entre a utilização de enzimas isoladas e células totais são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Vantagens e desvantagens no uso de células totais ou enzimas isoladas (Faber, 2004)

Biocatalisador	Forma	Vantagens	Desvantagens
Enzimas isoladas	Qualquer	Melhor produtividade devido a maior tolerâncias de concentrações	Necessidade de recuperação de cofatores
	Dissolvida em água	Alta atividade enzimática	Necessidade de extração, possíveis reações laterais
	Suspensa em solventes orgânicos	Fácil manipulação, Fácil recuperação da enzima	Atividade reduzida
Células totais	Imobilizada	Fácil recuperação da enzima	Perda de atividade durante imobilização
	Qualquer	Não há necessidade de recuperação de cofatores	Equipamentos caros e baixa produtividade
	Células em crescimento	Alta atividade	Formação de subprodutos
	Células imobilizadas	Reutilização de células	Baixa atividade

▪ Cofatores

Algumas enzimas necessitam da presença de um cofator para exercer sua função. Cofatores podem ser íons metálicos como zinco e magnésio, ou podem ser moléculas orgânicas, chamadas coenzimas. Em ambos os casos, atuam em conjunto com as enzimas para catalisar as reações. Dentre as coenzimas, os grupos mais importantes são os constituídos pelo NADH, NADPH, ATP, ADP e coenzima A, que atuam como co-substratos, sendo sua atividade regenerada após sua participação na reação enzimática (Said, S. & Pietro,

R.C.L., 2004). Desidrogenases, redutases, oxidases e oxigenases requerem coenzimas, tais como, NADH e NADPH (Matsuda *et al.*, 2009). As moléculas de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina (NADH) e o Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina (NADPH) são importantes coenzimas, tendo ação catalítica em diversos processos enzimáticos. (Figura 4).

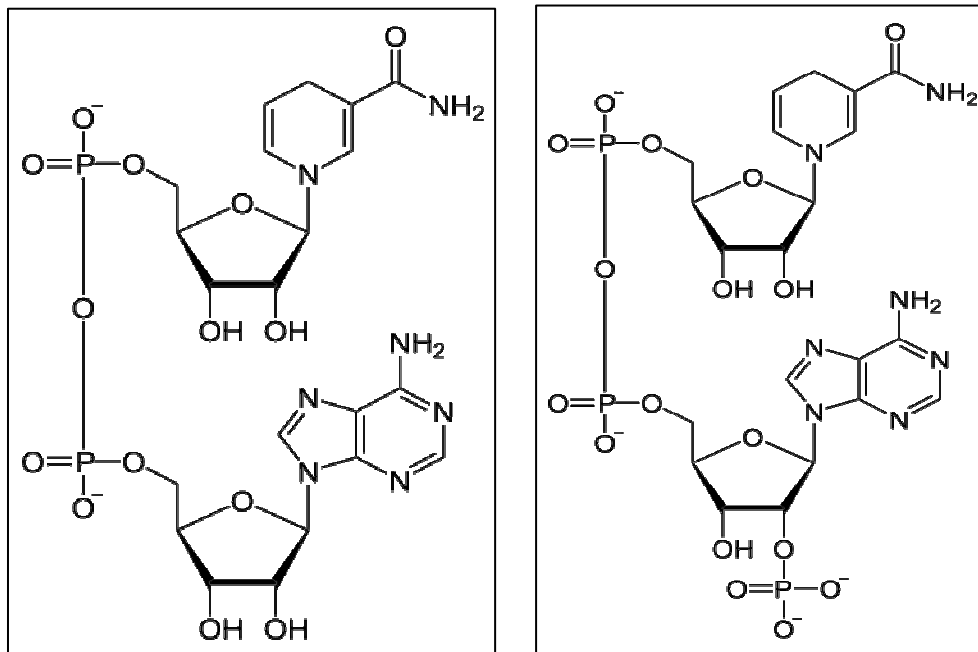


Figura 4: Coenzimas NADH e NADPH

- **Coenzimas e sua participação em reduções de cetonas**

No caso de reações em que a presença de coenzimas é necessária, as reações de redução de cetonas ocorrem, resumidamente, nas seguintes etapas (Matsuda *et al.*, 2009):

- 1- Coenzima e substrato se ligam a uma enzima;
- 2- O substrato é reduzido, enquanto a coenzima é oxidada;
- 3- A coenzima e o produto são dissociados da enzima.

Quando uma enzima, como a álcool desidrogenase reduz o grupo carbonílico usando a coenzima NADPH ou NADH, esta discrimina entre as duas faces do grupo presente no substrato, de tal forma que durante a transformação pode existir a predominância na formação de um dos estados estereoisoméricos (Drauz, K. & Waldmann, H.,1995). Exemplo de enzima que necessita de um cofator e de uma coenzima, a álcool desidrogenase, na catálise de formação de alcoóis a partir da redução de grupos carbonílicos, utiliza íons zinco no sítio ativo do grupo catalítico. Esta enzima catalisa a transferência de um hidreto da coenzima NADH, para uma variedade de grupos carbonílicos de aldeídos e cetonas (Nakamura *et al.*, 2003). Alguns mecanismos têm sido propostos para sua ação catalítica, muitos deles incluindo a interação do oxigênio carbonílico do substrato coordenado ao átomo de zinco, onde este atuaria como um ácido de Lewis recebendo a densidade eletrônica (Figura 5). Desta forma, além da coenzima, está atuando também no sítio catalítico o íon zinco e outros resíduos de aminoácidos. Uma vez que o substrato esteja coordenado no sítio catalítico da enzima, ocorre a transferência de um dos íons hidreto do cofator para uma das faces do grupo carbonílico (Figura 5).

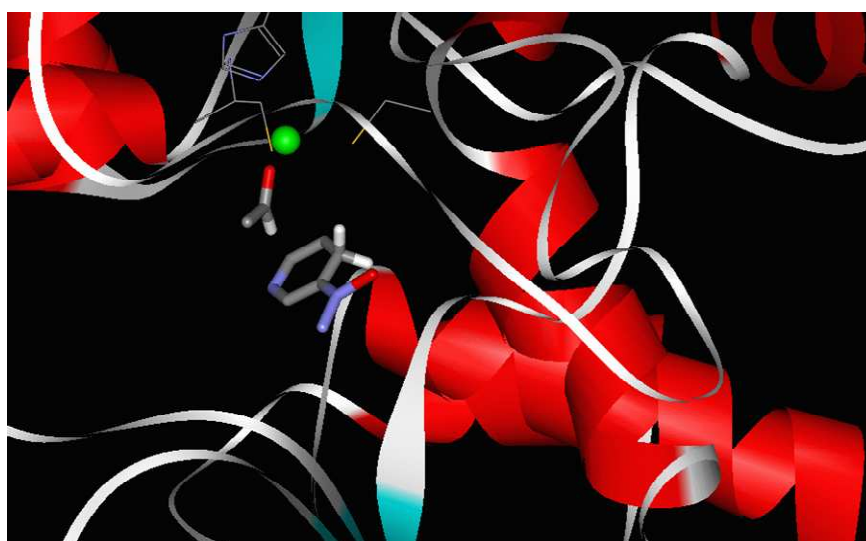
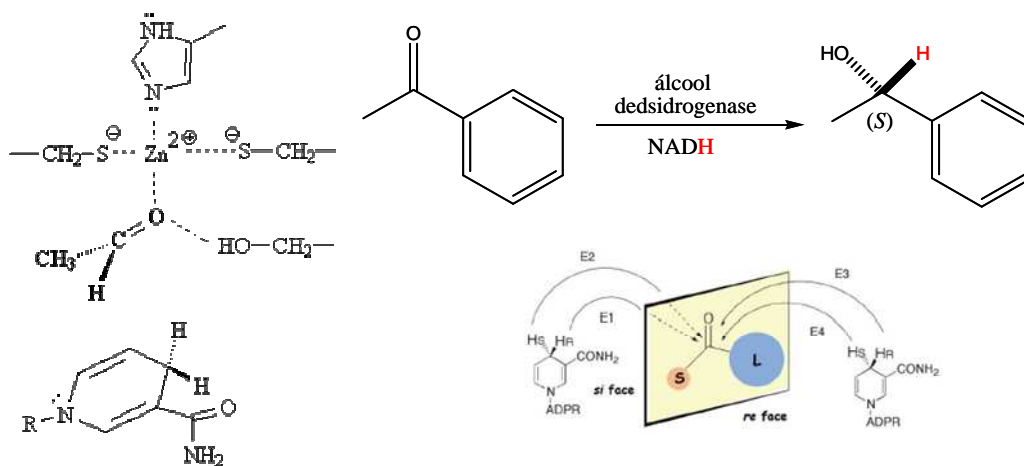


Figura 5. Transferência de íon hidreto do cofator NAD(P)H ao grupo carbonílico, o sítio ativo de uma álcool desidrogenase

Uma importante ferramenta empírica para a determinação da estereoquímica de compostos carbonílicos, reduzidos biocataliticamente é a regra de Prelog (Musa *et al.*, 2007).

- **Regra de Prelog**

Foi postulado por Prelog que de acordo com o tamanho (volume) dos grupos substituintes ligados ao carbono carbonílico é possível inferir por qual face da carbonila ocorre transferência do íon hidreto. As duas faces de um centro trigonal plano, por

exemplo, de um grupo carbonílico, têm as designações face *re* e face *si*, estabelecidos de acordo com as prioridades por número atômico segundo Cahn-Ingold-Prelog para os grupos ligados ao centro trigonal plano. Se a transferência ocorrer pela face *re* da carbonila obtém-se (*S*)-álcoois e se ocorrer pela face *si* obtém-se (*R*)-álcoois. Deve-se ainda considerar que os grupos oxigênio (O), o grupo volumoso e o grupo pequeno seguem a mesma prioridade segundo Cahn-Ingold-Prelog para a designação da configuração absoluta dos centros estereogênicos, respectivamente.

▪ **Redução de cetonas para obtenção de alcoóis quirais**

A redução assimétrica de cetonas é uma das mais importantes, fundamentais e práticas reações para a produção de alcoóis quirais, os quais podem ser transformados em várias outras funcionalidades, sem racemização e serem utilizados para sintetizar importantes produtos químicos de interesse industrial (Nakamura *et al.*, 2003). Dentre os diversos ramos industriais em que os alcoóis quirais despertam interesse, como agroquímico, alimentício e cosmético, a indústria farmacêutica se destaca por uma busca crescente em sintetizar fármacos através de rotas alternativas, ambientalmente aceitáveis e economicamente mais interessantes. Os alcoóis quirais, neste caso, são obtidos via reações de redução de cetonas empregando como catalisadores micro-organismos ou enzimas isoladas. Estes alcoóis atuam então como importantes precursores para posterior obtenção dos fármacos de interesse. Um interessante exemplo a ser citado é a síntese do composto LY300164 utilizado em testes para o tratamento de doenças como mal de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica (ELA). Este composto é obtido a partir do precursor 4-(3,4-metilenodioxifenil)-2-propanol, um álcool quiral.

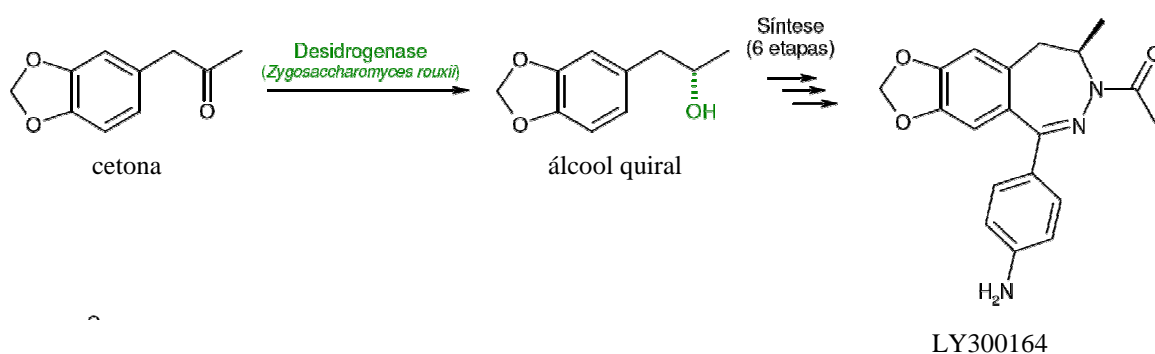


Figura 6. Redução de uma cetona através de um micro-organismo para obtenção de um álcool quiral, precursor na síntese de um fármaco.

▪ Redução de cetonas com micro-organismos- Revisão Bibliográfica

Em biocatálise, as reduções de grupos carbonílicos podem ser obtidas através de diversos organismos vivos. Um dos primeiros micro-organismos utilizados como fonte enzimática para reações de redução de cetonas foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, conhecida por fermento de pão. Uma diversidade de cetonas alifáticas e aromáticas foi reduzida em seus respectivos (*S*)-alcoóis, como mostra a tabela 3 (Faber, 2004).

Tabela 3. Redução de cetonas alifáticas e aromáticas com *S. cerevisiae* (Faber, 2004)

$\text{R}_1-\text{C}(=\text{O})-\text{R}_2 \xrightarrow{\text{S. cerevisiae}} \text{R}_1-\text{C}(\text{OH})-\text{R}_2 \text{ (S)}$			
R_1	R_2	Configuração absoluta	<i>ee</i> (%)
Me	CF ₃	<i>S</i>	>80
CF ₃	CH ₂ -Br	<i>S</i>	>80
Me	<i>n</i> -Bu	<i>S</i>	82
Me	Ph	<i>S</i>	89
Me	CH ₂ -OH	<i>S</i>	91
Me	(CH ₂) ₂ -CH=C(CH ₃) ₂	<i>S</i>	94
Me	C(CH ₃) ₂ -NO ₂	<i>S</i>	>96

O sucesso em reações com células inteiras da levedura *S. cerevisiae* levou a uma busca por novos biocatalisadores. Estudos realizados com a levedura *Candida magnoliae* e a bactéria *Lactobacillus kefir* demonstraram que estes micro-organismos possuem em seus sistemas biológicos enzimas carbonil-redutases que foram estereosseletivas nas reduções de derivados de acetofenonas (Matsuda *et al.*, 2009), (Figura 7).

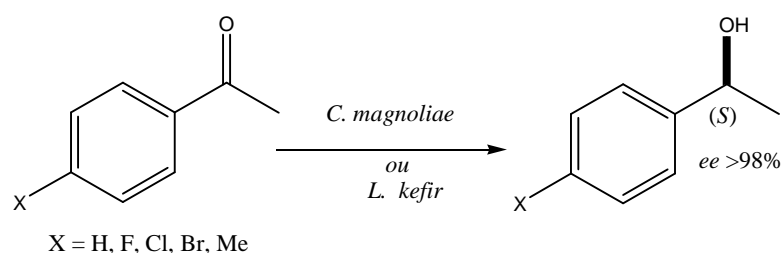


Figura 7. Redução de *p*-acetofenonas com *Candida magnoliae*
ou *Lactobacillus kefir*

Estes são dois exemplos de estudos sobre o potencial biocatalisador de alguns micro-organismos em reduções de cetonas. A diversidade de micro-organismos tanto terrestres quanto marinhos a ser explorada é imensa. Os oceanos, habitats que preservam a maioria de suas características naturais e que são auto-suficientes, representam metade da biodiversidade global (Cooper, 2004). No entanto, os micro-organismos marinhos são relativamente pouco explorados em processos biocatalíticos. Os micro-organismos atualmente recebem o foco principalmente de estudos visando à descoberta de substâncias potencialmente bioativas. Estudos de reduções biocatalíticas de cetonas aromáticas substituídas em posições *orto*, *meta* e *para* com algas vermelhas *Cyanidioschyzon merolae* e *Cyanidium caldarium* forneceram exclusivamente (*S*)-alcoóis com diferentes seletividades (Utsukihara *et al.*, 2006), (Figura 6). As células íntegras da alga *C. merolae* apresentam vantagens únicas, pois não possuem paredes celulares rígidas, permitindo maiores interações entre as enzimas e os substratos.

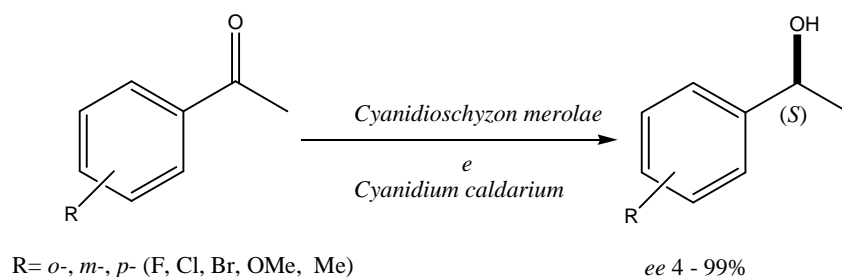


Figura 8. Redução de derivados de acetofenonas com as

algas *C. merolae* e *C. caldarium*

As reduções das cetonas contendo flúor, cloro e bromo com as espécies *Cyanidioschyzon merolae* e *Cyanidium caldarium* ocorreram com boas enantiosseletividades (67 - 99%) e observou-se que as conversões elevaram-se com o aumento do tamanho dos elementos halogenados. Em contraste, as reduções de metil- e metoxiacetofenonas foram obtidas com baixos rendimentos (7 - 38%) e baixas enantiosseletividades (2 - 41%). Neste mesmo estudo com as algas *C. merolae* e *C. caldarium*, canforquinonas e cetonas esteroidais foram reduzidas seletivamente (Utsukihara *et al.*, 2006). Estudos realizados com a cianobactéria *Synechococcus* sp demonstraram que este organismo reduziu várias arilmetilcetonas em seus correspondentes (*S*)-alcoóis. Neste mesmo estudo, a pentafluoracetofenona foi completamente consumida após três dias de reação no correspondente (*S*)-álcool em bom rendimento (90%) e excelente excesso enantiomérico (99%), (Figura 9).

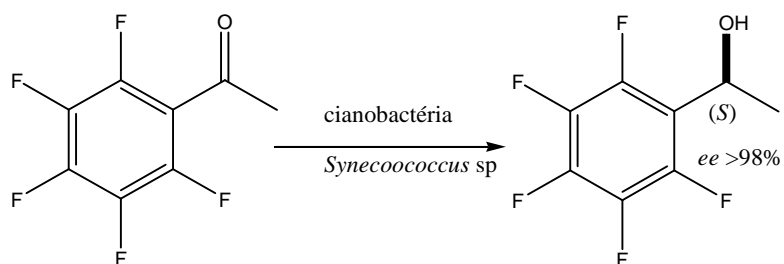


Figura 9. Redução assimétrica da pentafluoracetofenona com *Synechococcus* sp.

Entre as vantagens do uso de cianobactérias em biotransformação, além da alta enantiosseletividade, estão facilidade de manipulação e altos índices de crescimento destes organismos, no entanto, apresentam como desvantagem a dificuldade de sua preservação. Apesar deste fato, para que reações de redução ocorram não são requeridas grandes quantidades de biocatalizadores (Nakamura *et al.*, 2003).

A alga marinha *Spirulina platensis* teve seu potencial biocatalisador estudado em reações com α -bromocetonas cíclicas e aromáticas. Biotransformações das cetonas alifáticas, 3-bromo-4-heptanona e 4-bromo-5-nonanona com a alga *S. platensis* resultaram em correspondentes α -hidróxi-compostos com boas conversões, 91 e 60% respectivamente (Utsukihara *et al.*, 2007).

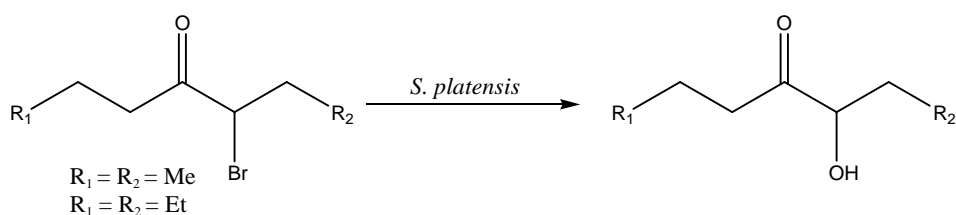


Figura 10. Biotransformação de α -bromocetonas com *S. platensis*

Em estudos realizados com a alga *Dunaliella salina*, o composto α -hidroxicetona foi reduzido ao (*R*)-(-)-1,2-propanodiol com excesso enantiomérico de 75%. A bioconversão conduzida na presença de 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia demonstrou que a coenzima NADPH foi regenerada e, que a concentração do álcool obtida foi superior a 95% sem formação de subprodutos ou biodegradação (Hatanaka *et al.*, 1996).

Reações da cetona 3-acetil-5-propilisoxasol foram realizadas com a alga *Synechococcus elongatus* PCC 7942. O substrato foi suspenso e mantido sob agitação, e não foram observadas conversões. As reações foram então conduzidas sob iluminação

fluorescente e após 96 horas, a cetona foi convertida em 67% no respectivo (*S*)-álcool, apresentando 99% de excesso enantiomérico (Itoh *et al.*, 2005).

Cinco espécies de algas marinhas *Chlorella minutíssima*, *Nannochloris atomus*, *Dunaliella parva*, *Porphyridium purpureum* e *Isochrysis galbana* foram estudadas em reações de biotransformações com cetonas aromáticas (Hook *et al.*) , (Tabela 4).

Tabela 4. Redução de cetonas (%) com algas marinhas.

Composto	<i>C. minutíssima</i>	<i>N. atomus</i>	<i>D. parva</i>	<i>P. purpureum</i>	<i>I. galbana</i>
acetofenona	65	90	21	97	64
<i>p</i> -cloroacetofenona	36	28	21	53	99
<i>p</i> -metilacetofenona	60	66	35	75	4
<i>p</i> -hidroxiacetofenona	0	0	0	0	0
benzofenona	0	0	0	0	0

Neste estudo, os rendimentos variaram conforme a estrutura dos substratos, bem como o tipo de alga utilizada. Este fato demonstra o quanto triagens com diferentes espécies tornam-se importantes.

Pesquisas demonstraram também que algas e fungos filamentosos marinhos apresentam alta capacidade de biodegradar compostos fenólicos em sua estrutura, os quais são poluentes em ambientes marinhos (Lika & Papadakis, 2009). No caso de algas marinhas, estas podem ser citadas como importantes fontes de substâncias antioxidantes naturais, uma vez que realizam fotossíntese e têm sistemas de defesas bem desenvolvidos (Rocha *et al.*, 2007), apresentando importância do ponto de vista econômico e ambiental para a sociedade humana. Ainda, realizam manutenção do equilíbrio biológico nos ambientes aquáticos, ocasionando a continuidade da fauna existente, a qual pode ser utilizada pelo homem como fonte de matéria prima Vidotti &

Rolleberg, 2004). No contexto deste trabalho, as algas marinhas são de particular interesse devido à grande diversidade de processos metabólicos e alta produção enzimática.

Sendo o Brasil um país-continente rico em recursos aquáticos, as algas marinhas e os micro-organismos marinhos podem ser intensamente explorados para a aplicação em reações de biocatálise, especialmente reações de redução de cetonas. Diferentes espécies de algas e fungos marinhos apresentaram-se como ótimos biocatalizadores para obtenção de (*S*)-alcoóis (Itoh *et al.*, 2005 Nakamura *et al.*, 2000).

Neste trabalho foram realizadas reações de redução de cetonas com fungos marinhos e com as espécies de algas marinhas *Bostrychia radicans* e *Bostrychia tenella*. No Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho (Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP) têm sido estabelecidas, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Hosana M. Deboni, culturas axênicas, além de estudos químicos e biológicos de algas pertencentes ao gênero *Bostrychia*. Até o presente momento, foram constatadas atividades tripanocida (*Trypanosoma cruzi*), citotóxica (*Artemia salina* Leach.), antifúngica (*Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum*) e antitumoral para os extratos e frações provenientes de *B. radicans*, o que nos sugere a possibilidade de potencial biológico para as substâncias acumuladas nesta espécie. O emprego de algas marinhas em biocatálise é pouco usual na literatura e estas fontes enzimáticas vêm demonstrando excelente potencial biocatalítico. Desta forma, tornam-se fundamentais os estudos nas áreas ligadas à utilização das algas e microrganismos marinhos para que as propriedades destes possam ser plenamente aproveitadas.

Biocatalisadores de origem marinha (algas, bactérias e fungos) para
redução estereosseletiva de cetonas

Materiais e métodos

Ana Maria Mouad

Prof. Dr. André L. M. Porto

MATERIAIS

Reagentes e solventes

Para o desenvolvimento do trabalho envolvendo a redução enzimática com os biocatalisadores de origem marinha foram utilizadas cetonas comerciais adquiridas da empresa Sigma-Aldrich (Figura 1). Os solventes (acetato de etila, hexano, etc) foram adquiridos da marca Synth, Vetec, Merck e Tedia.

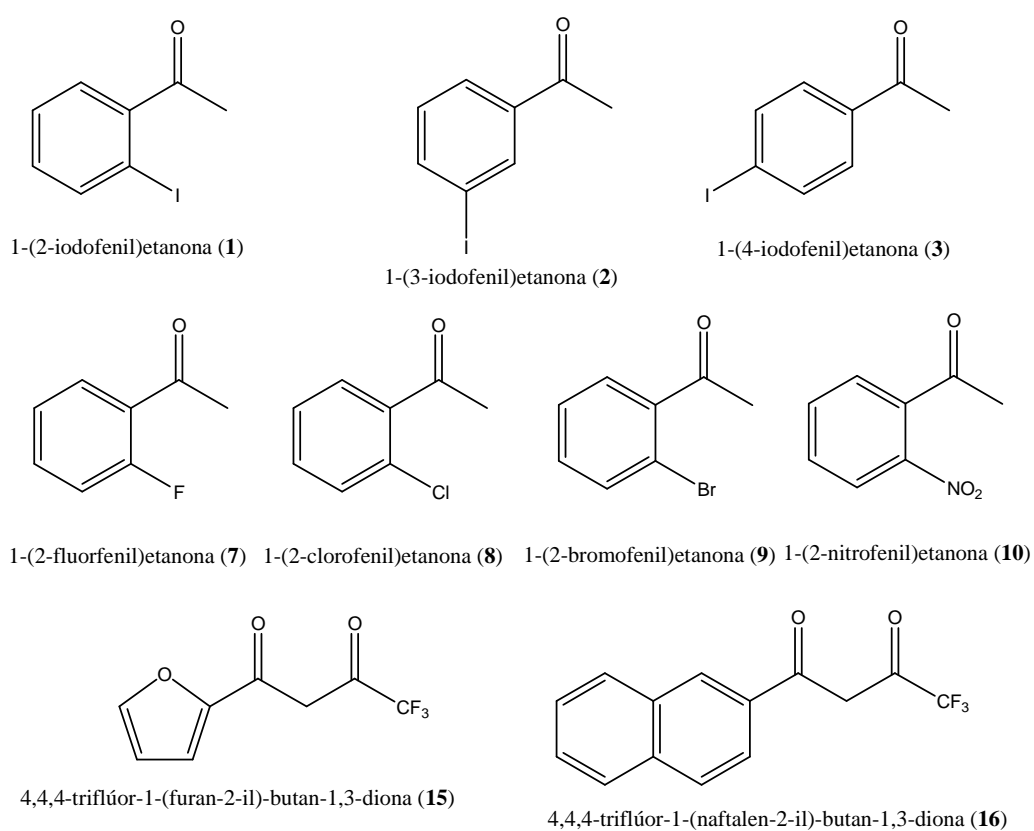


Figura 1. Cetonas utilizadas nas reações de biorredução

Preparação dos alcoóis racêmicos

Os alcoóis racêmicos foram preparados de acordo com o seguinte procedimento: Em um balão de 25 mL sob agitação magnética e à temperatura ambiente adicionou-se metanol (5 mL), cetona (50 mmol) e um excesso de borohidreto de sódio. A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada utilizando placas de sílica gel e em seguida revelada em solução de anisaldeído/ácido sulfúrico/ácido acético (1 mL/1 mL/100 mL). Após a reação ser completada adicionou-se água destilada (1 mL) e o metanol foi evaporado sob vácuo no rotaevaporador. Em seguida, adicionou-se 15 mL de água destilada e extraiu-se com acetato de etila (3 x 20 mL). À fase orgânica adicionou-se sulfato de sódio, filtrou-se e concentrou-se sob vácuo no rotoevaporador. O produto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando sílica gel com misturas de eluentes (hexano/acetato de etila). O rendimento das reações foi superior a 90%. Análises por CG utilizando coluna quiral de ciclodextrina mostrou a resolução enantiomérica de todos os alcoóis. Os alcoóis derivados do feniletanol (**4-6** e **11- 14**) foram analisados por CG e caracterizados anteriormente pelo grupo (Kagohara *et al.*, 2008; Da Rocha, 2008; Comasseto *et al.*, 2006; Andrade *et al.*, 2005; Comasseto *et al.*, 2003). Os alcoóis **17 – 18** estão sendo caracterizados por RMN. Na figura 2 têm-se as estruturas dos alcoóis racêmicos preparados.

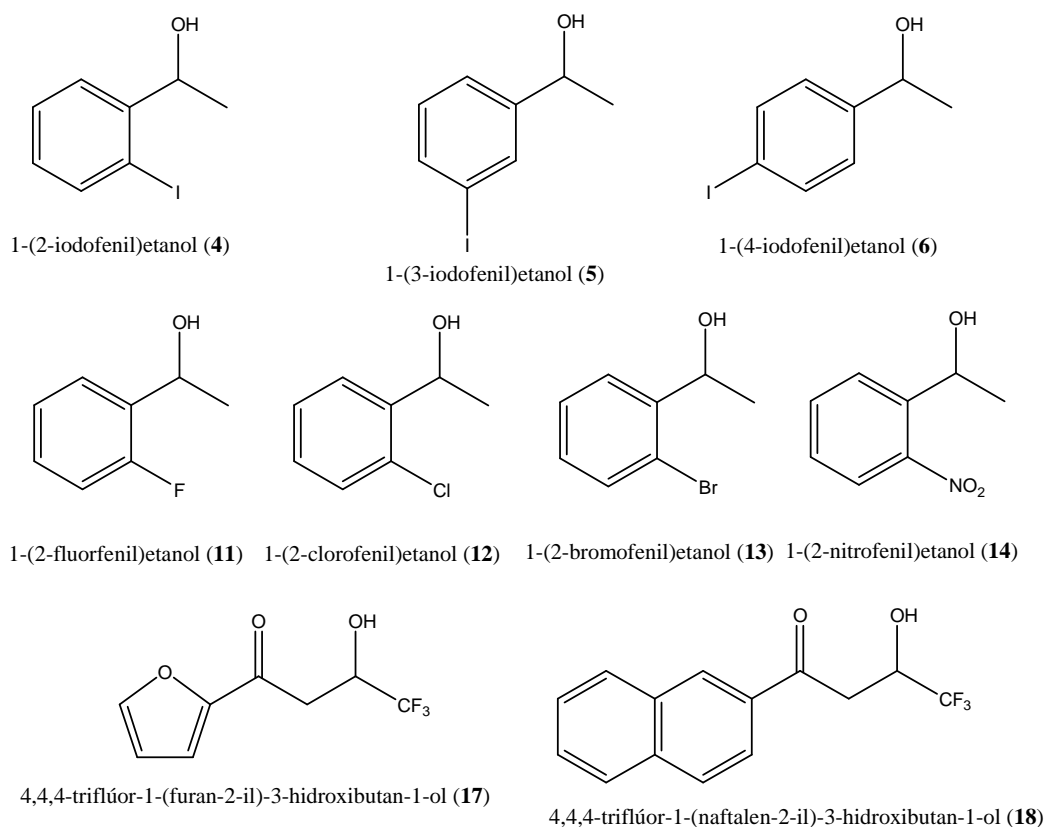


Figura 2. alcoóis racêmicos

Algas Bostrychia tenella e Bostrychia radicans

A coleta das algas *B. tenella* e *B. radicans* foi realizada pela Profa. Dra. Hosana M. Deboni da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP). A identificação das espécies foi realizada pela Dra. Nair S. Yokoya do Instituto de Botânica de São Paulo (IB/SP). As algas foram coletadas em setembro de 2007 no Manguezal da Praia Brava em Ubatuba, litoral de Norte do Estado de São Paulo. Foram coletados 2 Kg de algas, as quais foram armazenadas separadamente em pequenas porções em embalagens plásticas sob refrigeração em sacos plásticos (-14 °C).

Isolamento de bactérias das algas B. tenella e B. radicans

As algas foram descongeladas em refrigerador sob temperatura de 4 °C, mantendo-as embaladas e imersas em água destilada. Em seguida foram lavadas em água do mar artificial (pH 8) e imersas por 30 s em solução de hipoclorito de sódio 0,01% e por fim, lavadas com água destilada. Em seguida em frascos erlenmeyers adicionaram-se 100 mL de água esterilizada (pH 8) e 5 g das algas *B. tenella* e *B. radicans*. A mistura foi mantida sob agitação orbital (150 rpm, 32 °C, 5 dias). A seguir transferiram-se com uma alça de inoculação porções do caldo contendo fragmentos de alga para placas de Petri contendo meio de cultura de extrato de malte 2%. As placas foram mantidas em estufa (~30 °C) onde observou-se o crescimento dos microorganismos por um período máximo de 8 dias. Utilizou-se extrato de malte 2% com o objetivo de isolar linhagens fúngicas. Entretanto, foi observado o crescimento uniforme de uma colônia de bactéria filamentosa para os inóculos provenientes das algas *B. tenella* e *B. radicans*. As bactérias foram nomeadas de Bt-01 e Br-01 e estão sendo identificadas no Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrárias (CPQBA/UNICAMP) pela Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini.

Isolamento de fungos da alga Sargassum sp.

A coleta da alga *Sargassum* sp. e o isolamento dos fungos foram realizados pelo grupo do Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck (IQSC/USP) e da Profa. Dra. Mirna H. R. Selegim (UFSCar). A alga *Sargassum* sp. utilizada neste trabalho foi coletada em São Sebastião/SP e em janeiro de 2007. O material biológico foi colocado em sacolas de plástico esterilizadas, as quais foram imediatamente transportadas para o laboratório de

apoio nas dependências do Centro de Biologia Marinha (CEBIMar/USP). Os talos das algas foram submetidos à esterilização superficial através de sucessivas lavagens com solução de $0,001 \text{ g.L}^{-1}$ de HgCl_2 em etanol 5% por 1 minuto, seguido de três lavagens com água estéril.

Após a esterilização superficial foram realizados três procedimentos diferentes de inóculos, em todos os casos foram utilizados meios de cultura apropriados para o crescimento de fungos.

(a) O primeiro inóculo consistiu em transferir fragmentos da alga (1 cm^2) para placas de Petri contendo dois meios de cultura (Malte 2% e GPY).

(b) O segundo inóculo consistiu em triturar a alga em água destilada estéril obtendo-se um extrato aquoso, o qual foi inoculado em placas de Petri tanto sem diluição, quanto diluído para 10^{-2} nos meios de cultura de malte 2% e GPY.

(c) O terceiro procedimento realizou-se um esfregaço dos fragmentos da alga na superfície dos meios de cultura de malte 2% e GPY.

Todos os meios de cultura foram preparados com água do mar artificial esterilizada. Após a inoculação nas placas de Petri no laboratório do CEBIMar (USP), estas foram levadas para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e incubadas em uma estufa ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) por 7 dias. O isolamento dos fungos foi realizado pela Profa. Dra. Mirna H. R. Selegim e pela Mestranda Stelamar Romminger (Stelamar, 2008).

A composição dos meios de cultura utilizados para os inóculos foram o meio GPY [glicose (1 g), peptona de carne de soja (0,5 g), extrato de levedura (0,1 g), agar (15 g), água do mar artificial (1 L)] e o meio de MA2 [extrato de malte (2 g), agar (15 g), água do mar artificial (1L)].

As placas foram examinadas a intervalos regulares para facilitar o isolamento das linhagens de fungos que cresceram a partir dos fragmentos e extratos da alga. A purificação das linhagens isoladas foi realizada pelo método de esgotamento por estrias em placas de Petri contendo meio agarizado, por sucessivos repiques até obter-se as colônias puras. Estas colônias foram caracterizadas de acordo com suas principais características macroscópicas: coloração da colônia, aspecto algodinoso ou pulverulento e pela presença de presença de micélio aéreo.

Em seguida as colônias foram nomeadas de acordo com os critérios:

- a) organismo a partir do qual as linhagens foram isoladas;
- b) meio de cultura original do isolamento;
- c) método de isolamento;
- d) linhagem.

Os fungos foram nomeados de SMA2-C, SMA2-8, SMA2-58 e SGPY-41 e estão sendo identificados no Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrárias (CPQBA/UNICAMP) pela Dra. Lara D. Sette.

*Isolamento de fungos da alga *Bostrychia radicans**

O isolamento dos fungos endofíticos foi realizado pelos alunos do grupo de pesquisa do Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho (FCFRP/USP), sob a orientação da Profa. Dra. Hosana M. Deboni.

A alga *B. radicans* foi lavada com água do mar para remoção de impurezas (areia, folhas). A desinfecção superficial deste material para o isolamento dos micro-organismos foi realizada por três diferentes metodologias:

- (a) Incubação em etanol 70% por 15 segundos e três lavagens em água do mar

esterilizada.

- (b) Incubação em etanol 70% por 10 segundos, incubação em hipoclorito de sódio 0,01% por 5 segundos e três lavagens em água do mar esterilizada.
- (c) Incubação em etanol 70% por 5 segundos, incubação em hipoclorito de sódio 0,01% por 15 segundos e três lavagens em água do mar esterilizada.

As amostras esterilizadas foram fragmentadas com uso de pinça e bisturi cirúrgico estéreis e os fragmentos foram transferidos para placas de Petri com meios de cultivo sólidos de agar-alga e batata-dextrose-agar (BDA).

O meio agar-alga foi preparado pesando-se 20 g de alga *B. radicans*, os quais foram fragmentados em liquidificador com 200 mL de água do mar esterilizada. Em seguida foram adicionados cloranfenicol (200 mg), agar (15 g) e água do mar (1 L). As placas foram incubadas em estufa a 28 °C e os micro-organismos que se desenvolveram nas placas foram sucessivamente repicados até a obtenção das linhagens puras. Algumas linhagens foram avaliadas frente às reduções de cetonas. Os fungos foram nomeados de Br-09, Br-23, Br-27 e Br-53 e estão sendo identificados no Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrárias (CPQBA/UNICAMP) pela Dra. Lara D. Sette.

Fungos marinhos

Os fungos marinhos foram isolados das esponjas *Chelonaplysilla erecta* e *Geodia corticostylifera* os quais fazem parte da coleção do Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck (IQSC). O isolamento foi realizado pelo grupo da Profa. Dra. Mirna H. R. Selegim e as cepas encontram-se depositadas no laboratório de Microbiologia (UFSCar). A identificação das espécies foi realizada pela Dra. Lara D. Sette (curadora (CBQBA/UNICAMP) (Da Rocha *et al.*, 2009).

Meios de cultivo pra crescimento dos micro-organismos

Meio líquido de extrato de malte 2% (MA2): em frascos erlenmeyers de 250 mL foram adicionados água do mar artificial (100 mL) e extrato de malte (2 g). O pH da solução foi ajustado em 8 com solução de KOH 2M e o meio foi autoclavado (120 °C, 20 minutos).

Meio sólido de extrato de malte 2% (MA2): em um frasco tipo *shott* foram adicionados extrato de malte (30 g), peptona de farinha de soja (3 g), agar (15 g) e água do mar artificial (1 L). O pH do meio foi ajustado em 8 com solução de KOH 2M e o meio foi autoclavado (120 °C, 20 minutos).

Meio sólido *nutrient broth* (NB): em um frasco tipo *shott* foram adicionados extrato *nutrient broth* (3 g), peptona de farinha de soja (5 g), agar (15 g) e água do mar artificial (100 mL). O pH do meio foi ajustado em 8 com solução de KOH 2M e o meio foi autoclavado (120 °C, 20 minutos).

Todos os micro-organismos foram cultivados em meio líquido de extrato de malte 2%, os quais foram utilizados para realizar as reações de redução de cetonas. O meio sólido NB foi somente utilizado para cultivar as bactérias Br-01 e Bt-01 para identificação.

Água do mar artificial

Composição da água do mar artificial (1L): CaCl₂.2H₂O (1,26 g), MgCl₂.6H₂O (9,68 g), KCl (0,61 g), NaCl (30,0 g), Na₂HPO₄ (0,014 mg), Na₂SO₄ (3,47 g), NaHCO₃ (0,17 g), KBr (0,1 g), SrCl₂.6H₂O (0,040 g), H₃BO₃(0,030 g).

Reações de biocatálise com algas B. tenella e B. radicans

As algas foram descongeladas em refrigerador sob temperatura de 4 °C, mantendo embaladas e imersas em água destilada. Em seguida foram lavadas em água do mar artificial (pH 8) e imersas por 30 s em solução de hipoclorito de sódio 0,01% e por último lavadas com água destilada. Em frascos erlenmeyers de 250 mL foi adicionada água destilada (100 mL), as algas (5 g) e as cetonas (10 – 50 mg) dissolvidas em 300 µL de DMSO. As reações foram mantidas sob agitação orbital (150 rpm, 32 °C). Alíquotas foram retiradas em tempos fixados e analisadas por cromatografia gasosa utilizando-se coluna quiral de ciclodextrina.

Reações de biocatálise com as bactérias e fungos isolados das algas (B. tenella, B. radicans e Sargassum sp) e com os fungos marinhos

Em frascos erlenmeyers de 250 mL foi adicionado o meio de cultura de extrato de malte 2% (100 mL). Cultivaram-se as bactérias (Bt-01, Bt-02), os fungos (SMA2-C, SMA2-8, SMA2-58, SGPY-41, F-09, F-23, F-27, F-61) por 2-3 dias em agitação orbital (150 rpm, 32 °C). Após este tempo adicionou-se ao meio de cultivo as cetonas (10 – 50 mg) dissolvidas em 300 µL de DMSO. As reações foram mantidas sob agitação (150 rpm, 32 °C). Alíquotas foram retiradas em tempos fixados e analisadas por cromatografia gasosa utilizando-se coluna quiral de ciclodextrina.

O mesmo procedimento foi realizado para os fungos marinhos, (*Aspergillus sydowii* Ce15, *Aspergillus sydowii* Ce19, *Aspergillus sydowii* Gc12, *Bionectria* sp Ce5, *Penicillium raistrickii* Ce16, *Penicillium miczynskii* Gc5 e o *Trichoderma* sp Gc1), porém estes foram cultivados por 5 dias.

Extração das reações para determinação dos rendimentos

Após as reações serem completadas, foi realizada uma filtração a vácuo (fungos) em capela de fluxo laminar e os produtos obtidos das reações biocatalisadas foram extraídos com acetato de etila (3 x 30 mL) em funil de separação. À fase orgânica adicionou-se sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente sob pressão reduzida. O rendimento foi obtido após purificação por cromatografia em coluna utilizando sílica gel como fase estacionária e hexano /acetato de etila como eluentes. Os rendimentos para algumas reações estão sumarizados na tabela 1.

Tabela 1. Rendimento das reações biorredução

Biocatalisador	t (dias)	Cetona	Álcool (%)
alga <i>B. radicans</i>	7	1 (50 mg; 0,20 mmol)	15
bactéria Bt-01	8	1 (50 mg; 0,20 mmol)	20
fungo SMA2-09	10	1 (50 mg; 0,20 mmol)	32
fungo SMA2-61	10	1 (50 mg; 0,20 mmol)	40
bactéria Bt-01	8	2 (50 mg; 0,20 mmol)	19
alga <i>B. tenella</i>	8	3 (50 mg; 0,20 mmol)	15
fungo SAM2-C	10	7 (50 mg; 0,36 mmol)	34
fungo SAM2-09	10	8 (50 mg; 0,32 mmol)	50
fungo SMA2-61	10	8 (50 mg; 0,32 mmol)	55
fungo SMA2-58	10	8 (50 mg; 0,32 mmol)	44
bactéria Bt-01	10	9 (50 mg; 0,25 mmol)	15
fungo SAM2-09	10	9 (50 mg; 0,25 mmol)	54
bactéria Bt-01	10	10 (50 mg; 0,30 mmol)	23
fungo SAM2-09	10	10 (50 mg; 0,30 mmol)	40
fungo SMA2-61	10	10 (50 mg; 0,30 mmol)	46
fungo Gc12	7	15 (50 mg; 0,24 mmol)	60
fungo Gc1	7	16 (50 mg; 0,18 mmol)	30

Cromatografia em coluna

As cromatografias em coluna (CC) foram realizadas utilizando-se sílica gel 60 230-400 mesh da Across e cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄ da Sorbent Technologies para cromatografia em camada delgada (CCD). As cromatofolhas foram analisadas em uma câmara com luz UV (254 nm) e reveladas com de solução de anisaldeído (100 mL de ácido acético, 1 mL de *p*-anisaldeído, 1 mL de ácido sulfúrico) ou com solução alcoólica de vanilina (135 mL de H₂O destilada, 30 mL de ácido sulfúrico, 35 mL de metanol, 3 g de vanilina). Como fase móvel, utilizou-se misturas de solventes (hexano e acetato de etila).

Evaporadores rotativos

Para remoção dos solventes foram utilizados rotaevaporadores da marcas Fisaton e Tecnal T-210, equipados com bomba de vácuo TE-058 e refrigeração Tecnal modelo TE-2005.

Agitador orbital rotativo termostatizado

O crescimento dos fungos e as reações de biorredução de cetonas foram realizadas em agitador rotativo modelo Tecnal TE-421 ou Superhom.

Outros equipamentos

Balança analítica modelo AY-220 marca Shimadzu, capela de fluxo laminar marca Veco, autoclave vertical modelo Phoenix, pHmetro modelo 8010 da marca Qualxtron.

Rotação óptica e configuração absoluta

As medidas de rotação óptica foram realizadas no Departamento de Química-UFSCar em um Polarímetro Perkin-Elmer modelo 241 (Waltham MA, USA) equipado com lâmpada de Na (λ 589 nm). As amostras foram diluídas em 1 mL de CHCl_3 grau HPLC e os experimentos foram realizados a 25 °C. Os dados de rotação óptica estão sumarizados na tabela 2. Todos os alcoóis tiveram sua configuração absoluta determinada, exceto para o 4,4,4-trifluór-1-(naftalen-2-il)-3-hidroxiбутan-1-ol (**18**).

Tabela 2. Dados de rotação óptica e tempo de retenção dos enantiômeros dos alcoóis em coluna quiral CP-Chirasil-Dex-CB-Varian (25 m x 0,25 mm x 0,39 μm)

Composto	$[\alpha]_D^{25}$ exp.	$[\alpha]_D^{25}$ lit.	t_r (min)	Ref.
1-(2-iodofenil)etanol (4)	(<i>S</i>) -17,6° (<i>c</i> 1,7; CHCl_3)	(<i>R</i>) +37,7° (<i>c</i> 0,934; CHCl_3)	(<i>R</i>)18,0 (<i>S</i>) 20,0	[a]
1-(3-iodofenil)etanol (5)	Ca	(<i>S</i>) -12,9° (<i>c</i> 2,4; CHCl_3)	(<i>R</i>)21,0 (<i>S</i>) 22,5	[b]
1-(4-iodofenil)etanol (6)	Ca	(<i>S</i>) -32,7° (<i>c</i> 5,99; CHCl_3)	(<i>R</i>) 20,0 (<i>S</i>) 22,5	[c]
1-(2-fluorofenil)etanol (11)	(<i>S</i>) -45,5° (<i>c</i> 2,0; CHCl_3)	(<i>S</i>) -43,5° (<i>c</i> 1,39; CHCl_3)	(<i>R</i>) 21,1 (<i>S</i>) 22,5	[d]
1-(2-clorofenil)etanol (12)	Ca	(<i>S</i>) -57,7° (<i>c</i> 1,46; CHCl_3)	(<i>R</i>) 23,0 (<i>S</i>) 25,0	[d]
1-(2-bromofenil)etanol (13)	(<i>R</i>) +26° (<i>c</i> 2,5; CHCl_3)	(<i>S</i>) -50,45° (<i>c</i> 1,33; CHCl_3)	(<i>R</i>) 24,0 (<i>S</i>) 26,0	[d]
1-(2-nitrofenil)etanol (14)	(<i>S</i>) +17° (<i>c</i> 1,8; CHCl_3)	(<i>S</i>) +18,5° (<i>c</i> 0,23; MeOH)	(<i>R</i>) 26,0 (<i>S</i>) 27,5	[e]
4,4,4-trifluór-1-(furan-2-il)-3-hidroxiбутan-1-ol (17)	(<i>R</i>) +10,6° (<i>c</i> 1,6; CHCl_3)	(<i>R</i>) +18,3° (CHCl_3)	(<i>S</i>) 17,5 (<i>R</i>)18,3	[f]
4,4,4-trifluór-1-(naftalen-2-il)-3-hidroxiбутan-1-ol (18)	-6° (<i>c</i> 2,1; CHCl_3)	Nd [g]	19,3 20,0	

[a] Izumi, T.; Itou, O.; Kodera, K. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **1996**, 67, 89

[b] Da Rocha, L.C. Redução de derivados de acetofenonas com fungos de origem marinha. Dissertação de mestrado. IQSC, USP, 2008.

[c] Salvi, N.A.; Chattopadhyay, S. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 2833

[d] Salvi, N.A.; Chattopadhyay, S. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1992

[e] Barros-Filho, B.A.; De Oliveira, M.C.F.; Lemos, T.L.G.; De Mattos, M.C.; De Gonzalo, G.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1057

[f] Forni, A.; Moretti, I.; Prati, F.; Torre, G. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 11995

[g]Nd = Não determinado

Ca = configuração absoluta determinada pelo tempo de retenção de cada enantiômero

exp. = dado de rotação óptica experimental; lit. = dado de rotação óptica experimental; t_r = tempo de retenção em coluna quiral para cada enantiômero

Cromatografia a gás

Todas as reações de biocatálise foram analisadas por cromatografia gasosa utilizando coluna quiral com fase estacionária CP-Chirasil-Dex-CB-Varian Capillary Column com EZ-GRIP™ (25 m x 0,25 mm x 0,39 μ m). O gás de arraste foi nitrogênio. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo a gás da Marca Shimadzu, Modelo GC2010 com auto-injetor AOC-20i. Na tabela 3 têm-se os dados da programação utilizadas no cromatógrafo a gás com coluna quiral de ciclodextrina.

Tabela 3. Programação utilizada no CG para as análises das reações

Composto	T _i	t _i	T _f	t _f	r	t _r
1	115	2	175	8	3	11,0
4	115	2	175	8	3	18,0 e 20,0
2	120	2	190	8	3	11,3
5	120	2	190	8	2	21,0 e 22,5
3	120	2	165	8	2	11,5
6	120	2	165	8	2	21,0 e 22,0
7	100	2	180	5	2	7,5
11	100	2	180	5	2	21,0 e 22,0
8	100	2	180	5	2	11,5
12	60	2	180	5	2	23,0 e 25,0
9	90	2	140	6	2	10,5
13	90	2	140	6	2	24,0 e 26,0
10	100	2	150	6	2	16,0
14	100	2	150	6	2	26,0 e 27,0
15	110	2	180	6	2	13,0
17	110	2	180	6	2	17,5 e 183
16	120	2	180	6	2	16,0
18	120	2	180	6	2	19,0 e 20,0

T_i (°C) = temperatura inicial; T_f (°C) = Temperatura final; t_i (min.) = tempo inicial; t_f (min.) = tempo final; r (°C /min.) = taxa de aquecimento; t_r (min.) tempo de retenção

Biocatalisadores de origem marinha (algas, bactérias e fungos) para
redução estereosseletiva de cetonas

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Ana Maria Mouad

Prof. Dr. André L.M. Porto

ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS ÀS ALGAS *Bostrychia tenella* e *Bostrychia radicans*

As algas *Bostrychia tenella* e *Bostrychia radicans* coletadas mantidas no laboratório, foram descongeladas e lavadas com água do mar artificial, filtradas em peneira, sendo em seguida imersas em solução de hipoclorito de sódio 0,01% por 30 s. Após as lavagens, as algas (5 g) foram transferidas para frascos erlenmeyers de 250 mL contendo água esterilizada (100 mL). Os frascos foram levados para um agitador orbital por 5 dias (150 rpm, 32 °C). Após este período de incubação, retirou-se com auxílio de um alça de inoculação amostras do caldo, transferindo-as para placas de Petri contendo o meio de cultura de extrato de malte 2%.

Neste isolamento optou-se pelo uso do meio de cultura de extrato de malte 2% para selecionar preferencialmente o crescimento de fungos. Após os inóculos, as placas foram incubadas em estufa (30 °C) por até 8 dias, onde obteve-se um crescimento microbiano uniforme. Contudo, as colônias que se desenvolveram no extrato de malte foram de bactérias filamentosas. Assim, realizou-se o cultivo destes isolados em meio de cultura de ágar nutriente (*Nutrient Broth*). As colônias destes microrganismos isolados também cresceram de forma uniforme e com filamentos. Amostras destes foram enviadas para identificação no Centro de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP) sob responsabilidade da Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini.

As bactérias isoladas (Malte 2%) foram submetidas às reações de biocatálise para avaliar a presença de enzimas álcool desidrogenases utilizando-se cetonas como substratos.

Na figura 1 têm-se as algas *Bostrychia radicans* e *tenella* suspensas em água esterilizada. Na figura 2 têm-se colônias das bactérias isolados das algas marinhas *B. tenella* (Bt-01) e *B. radicans* (Br-01) em meio de cultura NB.

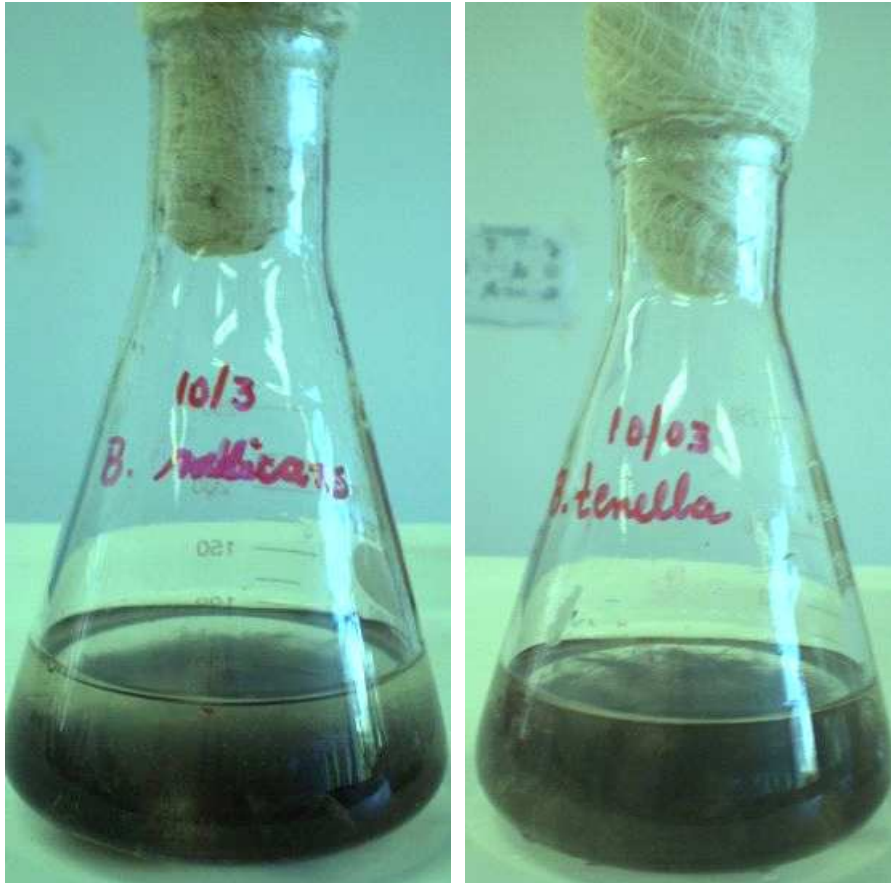


Figura 1. Algas *Bostrychia radicans* e *B. tenella* suspensas em água esterilizada.



Figura 2. Bactérias isoladas das algas marinhas *B. radicans* (Br-01) e *B. tenella* (Bt-01) em meio de cultura NB (*nutrient broth*)

Pelo grupo da Profa. Dra. Hosana M. Deboni foram realizados isolamentos de fungos presentes na alga *B. radicans*. A alga *B. radicans* após esterilização foi cortada em pequenos fragmentos os quais foram transferidos assepticamente para placas de Petri contendo meio de cultura apropriado. Após a incubação da placa em estufa a 28 °C por até 8 dias obteve-se o crescimento de várias colônias de microrganismos. A partir de sucessivos repiques chegou-se a obtenção de colônias puras. Os fungos isolados (Br-09, Br-23, Br-27 e Br-62) em meio de cultura de batata foram mantidos no laboratório e utilizados para as reações de biocatálise em meio de extrato de malte 2%.

Na figura 3, têm-se o crescimento de colônias de fungos oriundos da alga *B. radicans*. Na figura 4, têm-se os fungos isolados de *B. radicans*, os quais foram obtidos por novos repiques realizados no laboratório de Biocatálise /IQSC, para este trabalho, e que foram utilizados como fontes biocatalíticas em reações de redução de cetonas.



Figura 3. Colônias de microrganismos obtidas da alga *Bostrychia radicans* em meio de batata



Linhagem Br-09



Linhagem Br-23



Linhagem Br-27



Linhagem Br-62*



Linhagem Br-61



Linhagem Br-61

Figura 4. Fungos isolados da alga *Bostrychia radicans* e cultivados em meio de cultura de extrato de malte. *linhagem Br-62 não utilizada nas reações de biocatálise

REDUÇÃO DE IODOACETOFENONAS COM A ALGA MARINHA

Bostrychia tenella

As primeiras reações de redução com a alga marinha *Bostrychia tenella* foram realizadas com as iodoacetofenonas **1 - 3**.

Nestes ensaios foram realizados 5 experimentos, variando-se a concentração de iodoacetofenonas **1 - 3** adicionadas: 10 mg (0,041 mmol); 20 mg (0,082 mmol); 30 mg (0,12 mol); 40 mg (0,16 mmol); 50 mg (0,20 mmol).

Após o preparo das reações, os frascos foram levados ao agitador rotativo (150 rpm, 32°C) e as reações foram mantidas sob agitação em tempos fixados. Amostras das reações foram retiradas com pipetas de Pasteur, filtradas e extraídas com acetato de etila e analisadas por cromatografia gasosa utilizando-se coluna capilar com fase estacionária quiral de ciclodextrina. Os resultados das reações com a alga *B. tenella* encontram-se sumarizados na tabela 1.

Tabela 1. Redução de iodoacetofenonas **1** – **3** com a alga marinha *Bostrychia tenella*

orto-I (**1**)
meta-I (**2**)
para-I (**3**)

alga
Bostrychia tenella

orto-I (**4**)
meta-I (**5**)
para-I (**6**)
(S)

Linhas	Cetonas	Tempo (dias)	c (%) cetonas	c (%) alcoóis	ee (%) alcoóis (ca)
Experimento 1 (10 mg; 0,041 mmol)					
1	<i>o</i> -iodo	7	80	20	99 (S)
2	<i>m</i> -iodo	7	-	-	-
3	<i>p</i> -iodo	7	-	-	-
Experimento 2 (20 mg; 0,082 mmol)					
4	<i>o</i> -iodo	7	78	22	99 (S)
5	<i>m</i> -iodo	7	-	-	-
6	<i>p</i> -iodo	7	-	-	-
Experimento 3 (30 mg; 0,12 mmol)					
7	<i>o</i> -iodo	7	70	30	99 (S)
8	<i>m</i> -iodo	7	-	-	-
9	<i>p</i> -iodo	7	88	12	99 (S)
Experimento 4 (40 mg; 0,16 mmol)					
10	<i>o</i> -iodo	7	52	48	99 (S)
11	<i>m</i> -iodo	7	97	3	99 (S)
12	<i>p</i> -iodo	7	90	10	99 (S)
Experimento 5 (50 mg; 0,20 mmol)					
13	<i>o</i> -iodo	3	70	30	99 (S)
14		8	60	40	99 (S)
15	<i>m</i> -iodo	3	-	-	-
16		8	95	5	99 (S)
17	<i>p</i> -iodo	3	89	11	99 (S)
18		8	84	16	99 (S)

Condições reacionais: em frascos erlenmeyers de 250 mL foram adicionados água esterilizada (100 mL), alga *B. tenella* (5 g), iodoacetofenonas **1** – **3** (10 – 50 mg) dissolvidas em 300 μ L de DMSO. As reações foram mantidas sob agitação orbital (150 rpm, 32 °C). Alíquotas foram retiradas em tempos fixados e analisadas por cromatografia gasosa utilizando-se coluna quiral de ciclodextrina. c (%): concentração determinada por CG; ee (%): excesso enantiomérico; ca: configuração absoluta.

Pelos dados obtidos na tabela 1 pode-se observar que as iodoacetofenonas **1 e 3** foram reduzidas nos respectivos alcoóis em até 8 dias de reação. Em todos os casos os alcoóis **4 – 6** apresentaram excelentes seletividades, pois os excessos enantioméricos foram superiores a 98%. Observou-se que a *o*-iodoacetofenona **1** apresentou melhores resultados, pois em 8 dias de reação obteve-se 48% da cetona remanescente (Linha 14, Tabela 1). Constatou-se que as conversões da *o*-iodoacetofenona **1** foram dependentes da quantidade de cetona adicionada, pois a concentração do álcool (*S*)-**4** formado aumentou de 20 para 52% (concentrações de 0,041 mmol a 0,20 mmol). (Linhas 1, 4, 7, 10 e 14, Tabela 1).

A *m*-iodoacetofenona **2** teve uma discreta redução, obtendo-se entre 3 - 5% do álcool (*S*)-**5**, mesmo prolongando-se o tempo reacional por 8 dias (Linhas 11 e 16, Tabela 1). Inclusive em quantidades inferiores adicionadas (10 - 30 mg) de cetona **2** não se observou a formação do álcool **5**.

O mesmo ocorreu para a *p*-iodoacetofenona **3**, ou seja, em menores quantidades de cetona adicionada, não foram observadas conversões. Enquanto que em concentrações superiores obteve-se uma maior conversão, porém não ultrapassando 13% (Linhas 9, 12 e 18, Tabela 1).

Os alcoóis **4 – 6** foram obtidos com seletividade Prelog, pois apresentaram configurações absolutas *S*. A configuração absoluta foi determinada pela medida da rotação óptica e comparada com a literatura (Parte II, Materiais e Métodos).

Concluiu-se através destes experimentos que a alga marinha *Bostrychia tenella* tem potencial para redução das iodoacetofenonas **1 – 3**, pois os álcoois apresentaram excelentes excessos enantioméricos. Como estas reações envolvem a redução de grupos proquirais, a seletividade das reações independe da conversão. Portanto, as enzimas

presentes na alga *B. tenella* apresentam excelentes seletividades para estas reações de redução.

Nas figuras 5 - 7 têm-se os cromatogramas dos padrões das iodoacetofenonas **1** - **3** e dos álcoois racêmicos **4** - **6** obtidos por cromatografia gasosa em coluna quiral de ciclodextrina.

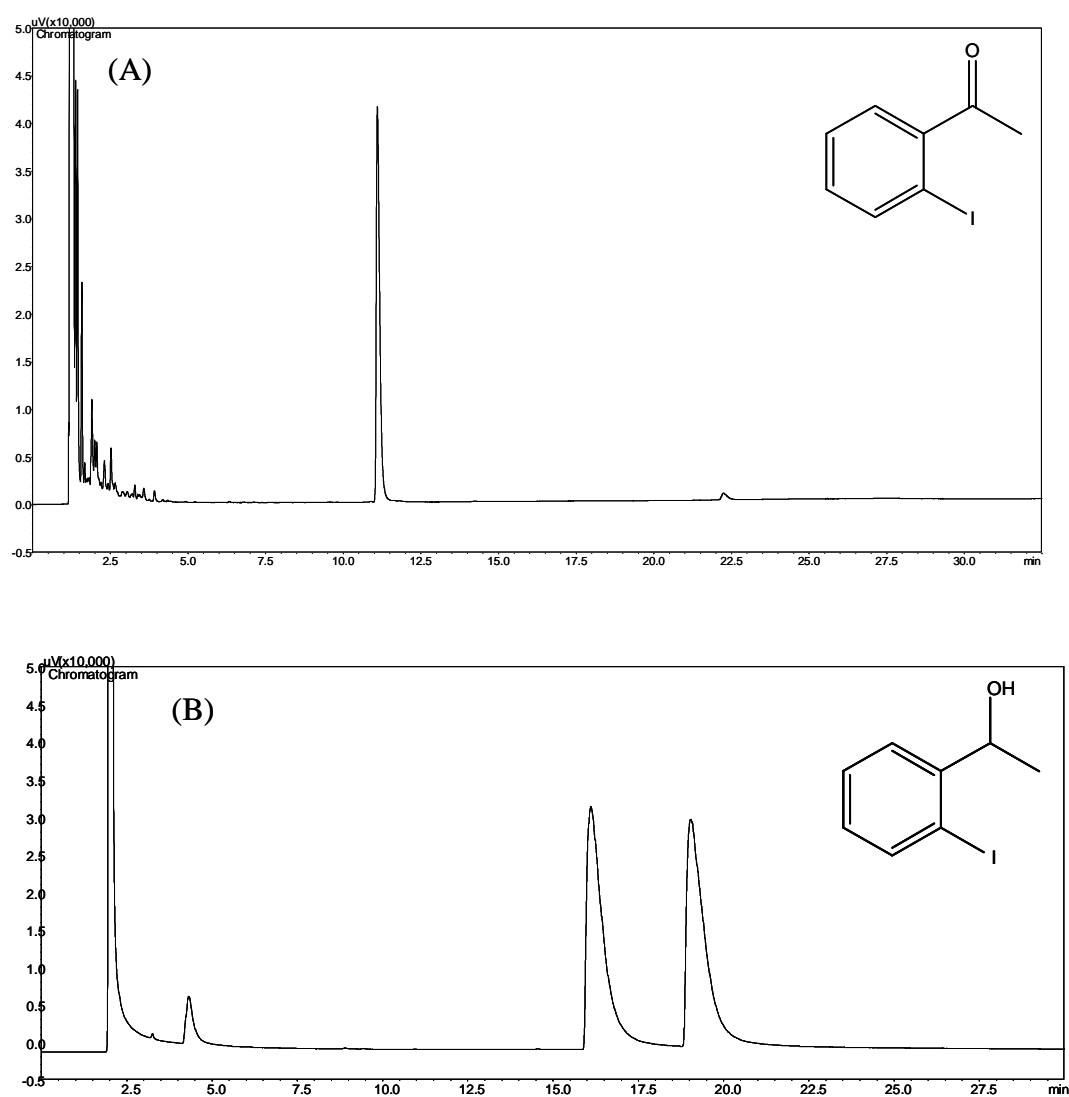


Figura 5. Cromatogramas obtidos por CG. (A) padrão da *o*-iodoacetofenona **1**
(B) padrão do 1-(2-iodofenil)etanol *rac*-**4**

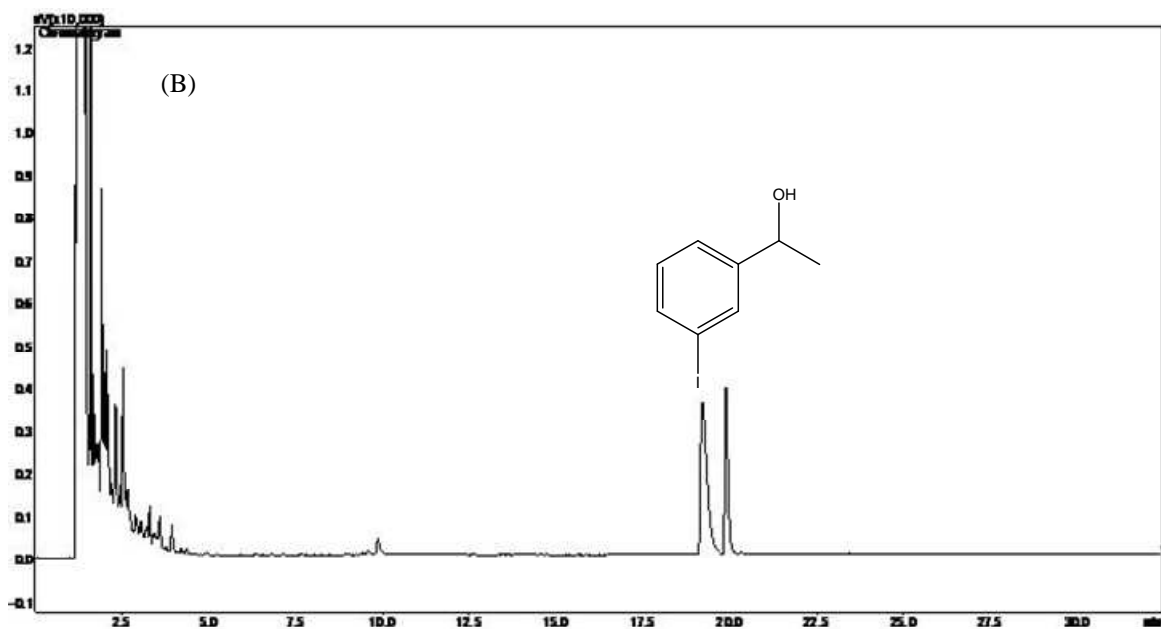
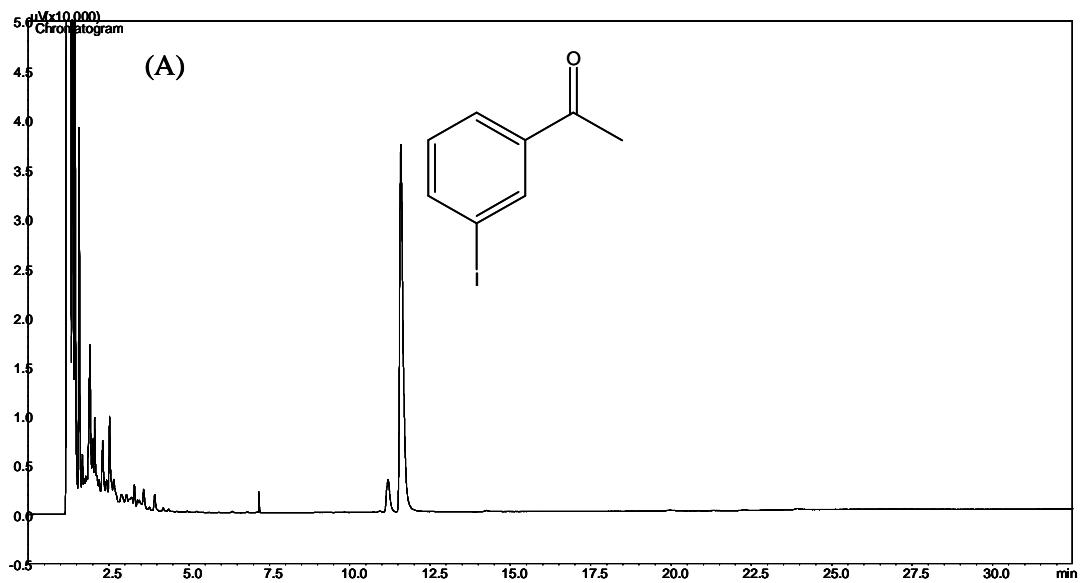


Figura 6. Cromatogramas obtidos por CG. (A) padrão da *m*-iodoacetofenona **2**
(B) padrão do 1-(3-iodofenil)etanol *rac*-**5**

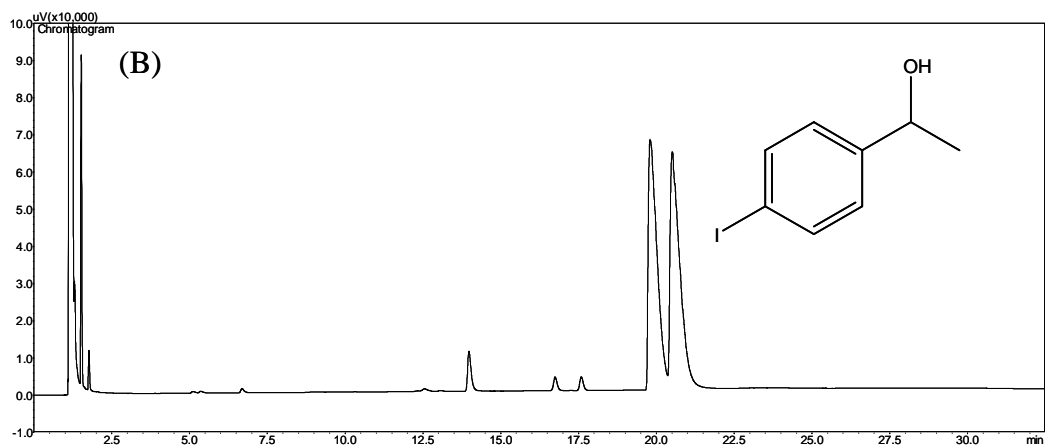
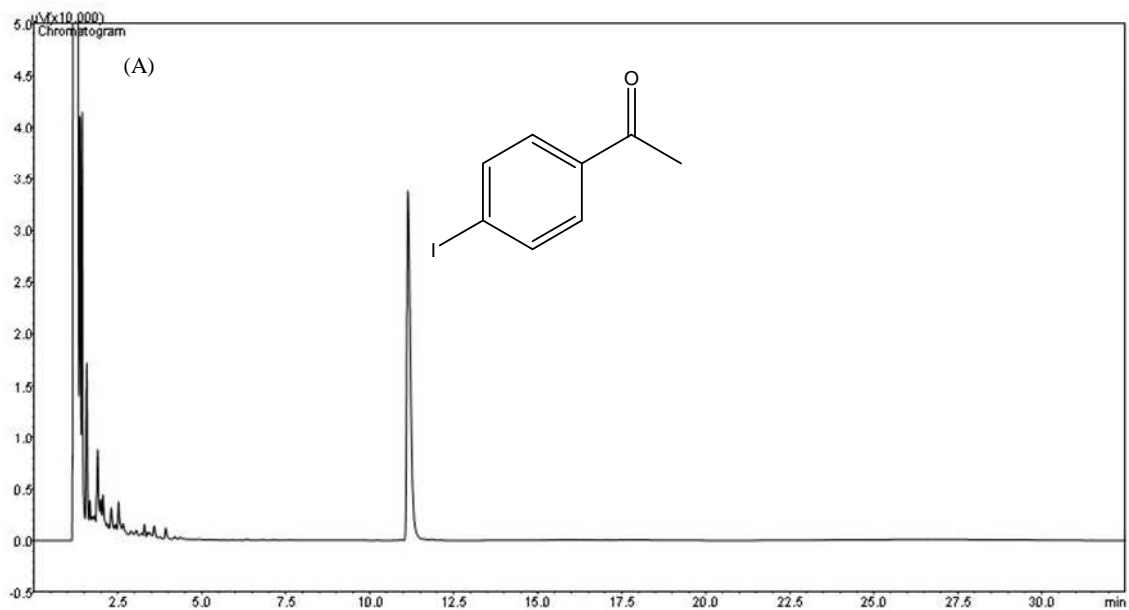


Figura 7. Cromatogramas obtidos por CG. (A) padrão da *p*-iodoacetofenona **3**
(B) padrão do 1-(2-iodofenil)etanol *rac*-**6**

REDUÇÃO DE IODOACETOFENONAS COM A ALGA MARINHA

Bostrychia radicans

Dando continuidade aos experimentos, realizaram-se as reações com a alga marinha *Bostrychia radicans* utilizando as iodoacetofenonas **1 - 3** com o objetivo de comparar o potencial biocatalítico das duas algas. Estas reações foram realizadas seguindo os mesmos procedimentos das reações com a alga *Bostrychia tenella*.

Os resultados das reações com a alga *B. radicans* encontram-se sumarizados na tabela 2. Os resultados das reações com a alga *B. radicans* demonstraram que a cetona **1** prosseguiu com a melhor reatividade para este biocatalisador entre esta série de cetonas. Observou-se que em todas as concentrações a cetona foi convertida, porém com um pequeno decréscimo em relação às reações com a alga *B.tenella*. No entanto, na adição de 50 mg deste substrato, a concentração do álcool (*S*)-**4** obtida foi 42%, muito similar ao resultado com *B.tenella* (Linhas 14, Tabela 2).

. No caso da cetona **2**, os resultados prosseguiram com pequenos valores de conversão, mesmo com o aumento das concentrações. Em relação a *p*-iodoacetofenona, as conversões foram observadas a partir das concentrações iniciais, porém com valores pouco expressivos.

Como observado, os resultados de conversão das cetonas **1 – 3** aumentaram com quantidade de cetonas adicionadas, isto pode ter ocorrido devido uma maior interação dos compostos com o biocatalisador. Este estudo torna claro não apenas a forte influência da posição dos substituintes nos compostos, como o fato de cada alga apresentar propriedades características em reações com esta série de cetonas. Entretanto, ambos biocatalisadores foram estereosseletivos, pois formaram alcoóis com excelentes excessos enantioméricos.

Tabela 2. Redução de iodoacetofenonas **1 – 3** com a alga marinha *Bostrychia radicans*

I -C₆H₄-C(=O)CH₃ $\xrightarrow[\text{Bostrychia radicans}]{\text{alga}}$ I -C₆H₄-C(OH)CH₃ (S)

orto-I (**1**)
meta-I (**2**)
para-I (**3**)

orto-I (**4**)
meta-I (**5**)
para-I (**6**)

Linhas	Cetonas	Tempo (dias)	c (%) cetonas	c (%) alcoóis	<i>ee</i> (%) alcoóis (ca)
Experimento 1 (10 mg; 0,041 mmol)					
1	<i>o</i> -iodo	7	90	10	99 (S)
2	<i>m</i> -iodo	7	-	-	-
3	<i>p</i> -iodo	7	93	7	99(S)
Experimento 2 (20 mg; 0,082 mmol)					
4	<i>o</i> -iodo	7	88	12	99 (S)
5	<i>m</i> -iodo	7	-	-	-
6	<i>p</i> -iodo	7	93	7	99(S)
Experimento 3 (30 mg; 0,12 mmol)					
7	<i>o</i> -iodo	7	85	15	99 (S)
8	<i>m</i> -iodo	7	-	-	-
9	<i>p</i> -iodo	7	90	10	99 (S)
Experimento 4 (40 mg; 0,16 mmol)					
10	<i>o</i> -iodo	7	77	23	99 (S)
11	<i>m</i> -iodo	7	97	3	99 (S)
12	<i>p</i> -iodo	7	86	14	99 (S)
Experimento 5 (50 mg; 0,20 mmol)					
13	<i>o</i> -iodo	3	87	13	93 (S)
14		8	58	42	99 (S)
15	<i>m</i> -iodo	3	95	5	94 (S)
16		8	92	8	99 (S)
17	<i>p</i> -iodo	3	90	10	99 (S)
18		8	83	17	99 (S)

Condições reacionais: em frascos erlenmeyers de 250 mL foram adicionadas água esterilizada (100 mL), alga *B. radicans* (5 g), iodoacetofenonas **1 – 3** (10 – 50 mg) dissolvidas em 300 µL de DMSO. As reações foram mantidas sob agitação orbital (150 rpm, 32 °C). Alíquotas foram retiradas em tempos fixados e analisadas por cromatografia gasosa utilizando-se coluna quiral de ciclodextrina. c (%): concentração determinada por CG; *ee* (%): excesso enantiomérico; ca: configuração absoluta.

REDUÇÃO DE IODOACETOFENONAS COM AS BACTÉRIAS ASSOCIADAS ÀS ALGAS MARINHAS *Bostrychia tenella* e *Bostrychia radicans*

Embora os resultados obtidos nos experimentos de 1 – 5 apresentados nas tabelas 1 e 2 pudessem ser otimizados (com adição de co-substratos, alteração de pH e temperatura e adição de co-solventes) com o objetivo de aumentar a produção dos alcoóis, optou-se em realizar o isolamento de possíveis microrganismos associados às algas.

O isolamento das bactérias associadas às algas *Bostrychia tenella* e *Bostrychia radicans* foi realizado em um tópico específico descrito anteriormente (Parte II, Materiais e Métodos). Aqui serão discutidas as reações biocatalíticas com a bactéria Bt-01 isolada da alga *B. tenella* e a bactéria Br-01 isolada da alga *B. radicans*.

Após a obtenção das bactérias Bt-01 e Br-01, estas foram mantidas em incubadoras em meio sólido contendo extrato de malte 2%. Embora sejam bactérias, todas as reações foram realizadas em meio de cultura de extrato de malte 2%.

Em frascos erlenmeyers de 250 mL foram adicionados 100 mL do meio de cultura preparado em água do mar artificial. Em seguida realizou-se o repique e o inóculo da bactéria Bt-01. Após 2-3 dias de cultivo adicionaram-se as iodoacetofenonas **1- 3** (50 mg; 0,20 mmol) no meio contendo o caldo e as células da bactéria Bt-01. Os resultados destas reações estão sumarizados na tabela 3.

Tabela 3. Redução de iodoacetofenonas **1** – **3** com a bactéria Bt-01 isolada da alga marinha *Bostrychia tenella*

bactéria Bt-01
isolada de *B. tenella*

orto-I (**1**)
meta-I (**2**)
para-I (**3**)

orto-I (**4**)
meta-I (**5**)
para-I (**6**)

Linhas	Cetonas	Tempo (dias)	c (%) cetonas	c (%) alcoóis	<i>ee</i> (%) alcoóis (ca)
1	<i>o</i> -iodo	4	94	6	99 (<i>S</i>)
2		8	70	30	99 (<i>S</i>)
3	<i>m</i> -iodo	4	92	8	99 (<i>S</i>)
4		8	87	13	99 (<i>S</i>)
5	<i>p</i> -iodo	4	91	9	99 (<i>S</i>)
6		8	80	20	99 (<i>S</i>)

Condições reacionais: Em frascos erlenmeyers de 250 mL foi adicionado o meio de cultura de extrato de malte 2% (100 mL). Cultivou-se a bactéria por 2-3 dias em agitação orbital (150 rpm, 32 °C). Após este tempo adicionou-se ao meio de cultivo 50 mg (0,20 mmol) das cetonas **1** – **3** dissolvidas em 300 µL de DMSO. As reações foram mantidas sob agitação (150 rpm, 32 °C). Alíquotas foram retiradas em tempos fixados e analisadas por cromatografia gasosa utilizando-se coluna quiral de ciclodextrina. *c* (%): concentração determinada por CG; *ee* (%): excesso enantiomérico; ca: configuração absoluta.

Os resultados da redução biocatalítica das iodoacetofenonas **1** – **3** com a bactéria Bt-01 apresentaram excelentes seletividades, pois os alcoóis **4** – **6** foram obtidos com excessos enantioméricos superiores a 98% (Tabela 3).

Os resultados das reduções das iodoacetofenonas **1** – **3** com a bactéria Bt-01 foram semelhantes aos obtidos com a alga *B. tenella* (Tabela 1). A redução da *o*-iodoacetofenona **1** após 8 dias de reação apresentou uma conversão de 30% no respectivo álcool (*S*)-**4** (Linha 2, Tabela 3). A redução da *m*-iodoacetofenona **2** também continuou apresentando baixa conversão, sendo neste caso de 13% (Entrada 4, Tabela

3). Enquanto que para a *p*-iodoacetofenona **3** houve um pequeno acréscimo no valor da conversão, atingindo um máximo de 20% (Linha 6, Tabela 3).

Conclui-se que os resultados obtidos tanto pela redução com a alga *B. tenella* quanto pela bactéria Bt-01 podem ser utilizados para estas reações. Entretanto a limitação do uso destes biocatalisadores restringe-se às baixas concentrações dos alcoóis formados. A baixa produção dos alcoóis pode ser ocasionada por diferentes fatores, como por exemplo, baixa concentração da enzima presente nos biocatalisadores (alga e bactéria Bt-01) e condições reacionais.

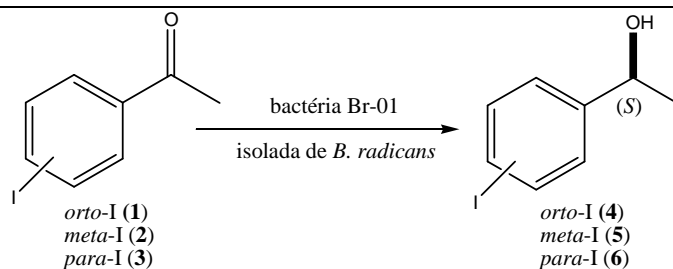
As reações de redução das iodoacetofenonas **1** – **3** também foram realizadas com a bactéria Br-01 isolada da alga *Bostrychia radicans*. Os resultados para estas reações estão sumarizados na tabela 4. Pode-se observar que a *orto*-iodoacetofenona **1** apresentou uma boa conversão e alto excesso enantiomérico para o álcool (*S*)-**4** (Linha 2, Tabela 4). Inclusive este resultado foi superior ao obtido pela bactéria Bt-01 (Linha 2, Tabela 3).

A redução da *m*-iodoacetofenona **2** foi similar tanto para a bactéria Br-01 quanto para a bactéria Bt-01, ou seja, baixas conversões foram obtidas (Linha 4, Tabela 4). Contudo, estes resultados foram superiores aos obtidos com as algas.

A redução da *p*-iodoacetofenona **3** com a bactéria Br-01 apresentou melhor conversão, atingindo 48% (Linha 6, Tabela 4), quando comparado com a bactéria Bt-01 que foi de 20% (Linha 6, Tabela 3).

Na figura 8 têm-se o cromatograma da reação da *o*-iodoacetofenona **1** com a bactéria Br-01 obtido por cromatografia gasosa em coluna quiral de ciclodextrina.

Tabela 4. Redução de iodoacetofenonas **1** – **3** com a bactéria Br-01 isolada da alga marinha *Bostrychia radicans*



Linhas	Cetonas	Tempo (dias)	c (%)	c (%)	<i>ee</i> (%)
			cetonas	alcoóis	alcoóis (<i>ca</i>)
1	<i>o</i> -iodo	4	97	3	99 (<i>S</i>)
2		8	54	46	99 (<i>S</i>)
3	<i>m</i> -iodo	4	98	2	99 (<i>S</i>)
4		8	83	17	99 (<i>S</i>)
5	<i>p</i> -iodo	4	96	4	99 (<i>S</i>)
6		8	52	48	99 (<i>S</i>)

Condições reacionais: em frascos erlenmeyers de 250 mL foi adicionado o meio de cultura de extrato de malte 2% em 100 mL de água do mar artificial (pH 8). Cultivou-se a bactéria por 2-3 dias em agitação orbital (150 rpm, 32 °C). Após este tempo adicionou-se 50 mg (0,20 mmol) das cetonas **1** – **3** dissolvidas em 300 μ L de DMSO. As reações foram mantidas sob agitação (150 rpm, 32 °C). Alíquotas foram retiradas em tempos fixados e analisadas por cromatografia gasosa utilizando-se coluna quiral de ciclodextrina. *c* (%): concentração determinada por CG; *ee* (%): excesso enantiomérico; *ca*: configuração absoluta.

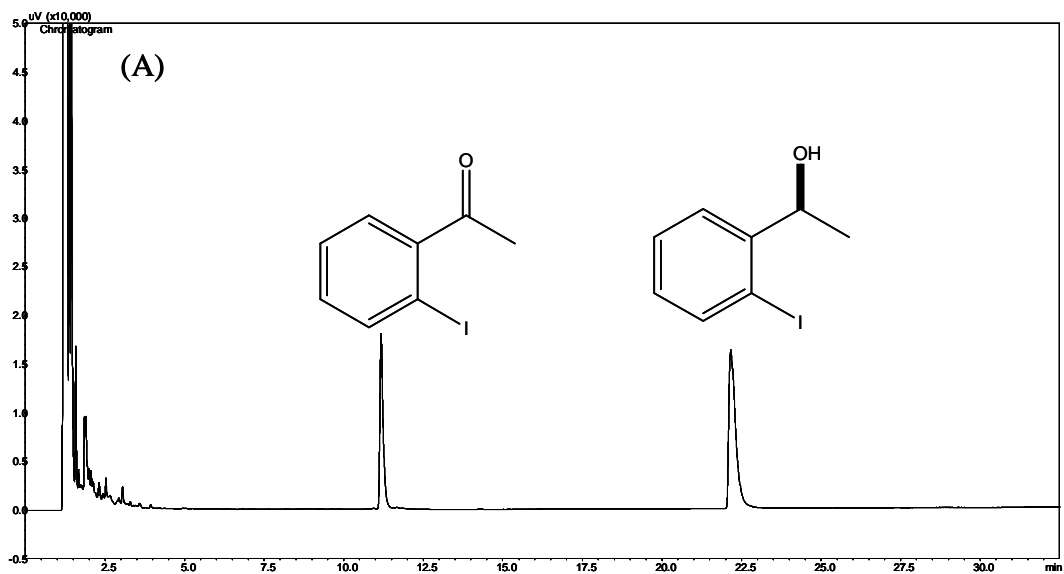


Figura 8. (A) Cromatograma obtido por CG. Reação da *o*-iodoacetofenona **1** com a bactéria Br-01 isolada da alga *Bostrychia radicans* (8 dias de reação)

REDUÇÃO DE *ORTO*-ACETOFENONAS COM A ALGA MARINHA

Bostrychia tenella

Embora os resultados alcançados nas reduções das iodoacetofenonas **1 – 3** com as algas *B. tenella* e *B. radicans* foram interessantes, observou-se que ocorreram baixas conversões, principalmente quando o substituinte iodo estava ligado nas posições *meta* e *para* do anel aromático. Assim, resolveu-se ampliar estes estudos com novos substratos contendo diferentes substituintes, porém somente na posição *orto*, uma vez que a *o*-iodoacetofenona **1** apresentou melhores resultados, quando comparados com os grupamentos em posições *meta* e *para*.

As cetonas utilizadas foram selecionadas em função da disponibilidade e da resolução enantiomérica dos alcoóis em coluna quiral, uma vez que o objetivo deste trabalho foi investigar o potencial enzimático das algas e dos microrganismos marinhos na produção de alcoóis enantiomericamente puros. As cetonas empregadas foram a *o*-fluoroacetofenona **7**, *o*-cloroacetofenona **8**, *o*-bromoacetofenona **9** e a *o*-nitroacetofenona **10**.

As reações enzimáticas com os novos derivados de *o*-acetofenonas **7 – 10** foram conduzidas em frascos erlenmeyers de 250 mL onde se adicionou 100 mL de água esterilizada e a alga *B. tenella* (5 g). As quantidades de cetonas adicionadas foram: cetona **7** (**50 mg; 0,36 mmol**); **8** (**50 mg; 0,32 mmol**); **9** (**50 mg; 0,25 mmol**); **10** (**50 mg; 0,30 mmol**).

Após o preparo das reações, os frascos foram mantidos sob agitação orbital (150 rpm, 32°C). Amostras das reações foram retiradas em tempos determinados com pipetas de Pasteur, filtradas, extraídas com acetato de etila e analisadas por cromatografia

gasosa com coluna capilar de ciclodextrina. Os resultados destas reações encontram-se sumarizados na tabela 5.

Tabela 5. Redução de *orto*-acetofenonas **7** – **10** com a alga marinha *Bostrychia tenella*

Linhas	Cetonas	Tempo (dias)	c (%)	c (%)	<i>ee</i> (%)
			cetonas	alcoóis	alcoóis (ca)
1	<i>o</i> -flúor	4	67	33	99 (<i>S</i>)
2		8	48	52	95 (<i>S</i>)
3	<i>o</i> -cloro	4	93	7	99 (<i>S</i>)
4		8	80	20	98 (<i>S</i>)
5	<i>o</i> -bromo	4	95	5	99 (<i>S</i>)
6		8	90	10	99 (<i>S</i>)
7	<i>o</i> -nitro	4	100	0	0
8		8	87	13	99 (<i>S</i>)

Condições reacionais: em frascos erlenmeyers de 250 mL foram adicionados 100 mL de água esterilizada, a alga *B. tenella* (5 g) e 50 mg das cetonas **7** – **10** dissolvidas em 300 μ L de DMSO. As reações foram conduzidas em agitação orbital (150 rpm, 32 °C). Alíquotas foram retiradas em tempos fixados e analisadas por cromatografia gasosa utilizando-se coluna quiral de ciclodextrina. *c* (%): concentração determinada por CG; *ee* (%): excesso enantiomérico; ca: configuração absoluta.

De acordo com os dados obtidos observaram-se também altas seletividades para os alcoóis **11** – **14**. Entretanto, para a *o*-fluoroacetofenona **7** ocorreu um pequeno decréscimo no excesso enantiomérico (Linha 2, Tabela 5). Enquanto que a *o*-cloroacetofenona **8**, *o*-bromoacetofenona **9** e *o*-nitroacetofenona **10** foram reduzidas nos respectivos alcoóis com excessos enantioméricos superiores a 98%, porém com baixas conversões (Linhas 4, 6, e 8, Tabela 5).

Nas figuras 9 – 12 têm-se os cromatogramas das cetonas **7 – 10** e dos alcoóis racêmicos **11 – 14** obtidos por cromatografia gasosa em coluna capilar de ciclodextrina.

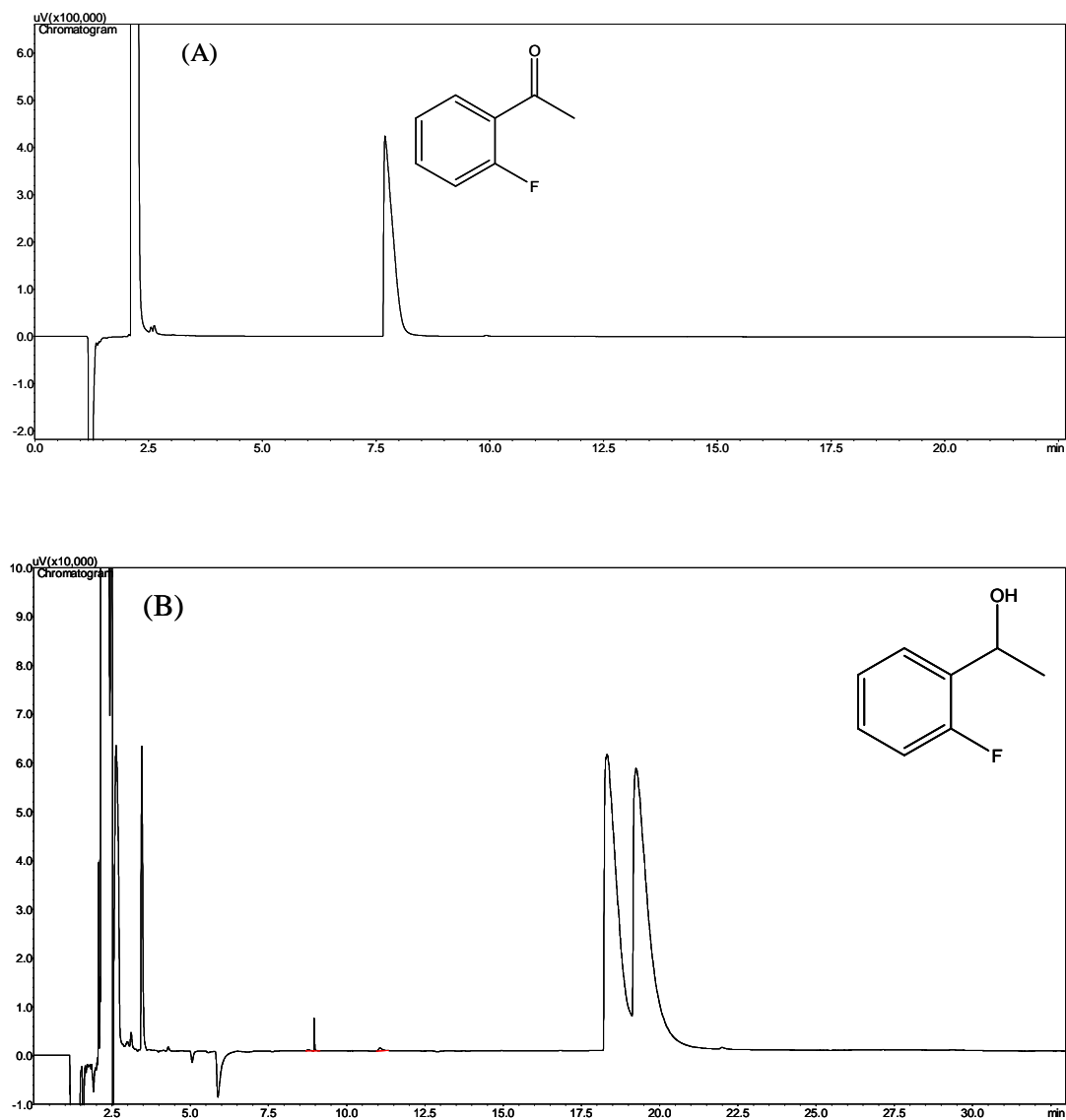


Figura 9. Cromatogramas obtidos por CG. (A) padrão da *o*-fluoroacetofenona **7**
(B) padrão do 1-(2-fluorfenil)etanol *rac*-**11**

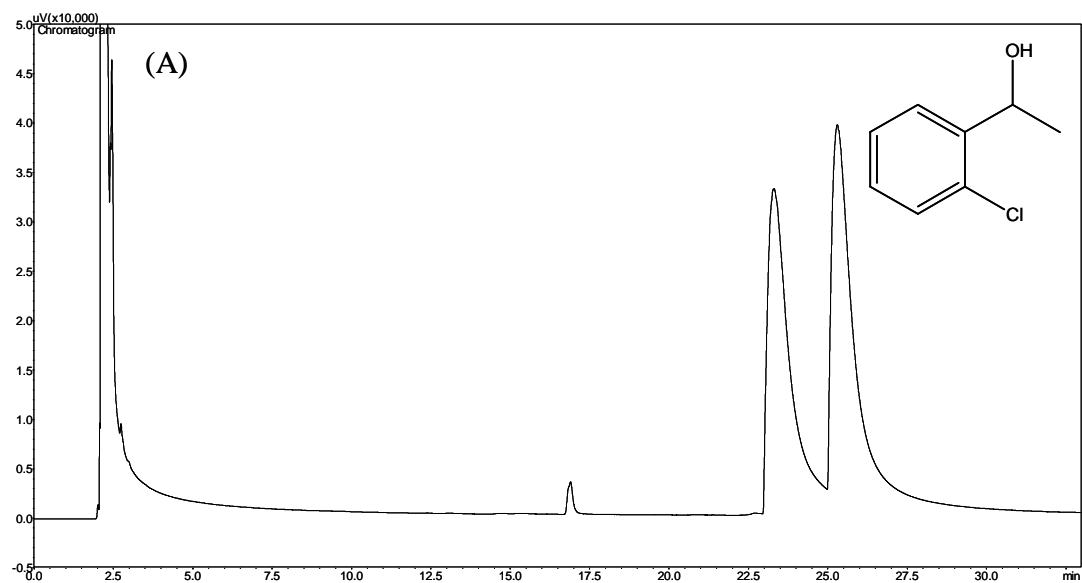
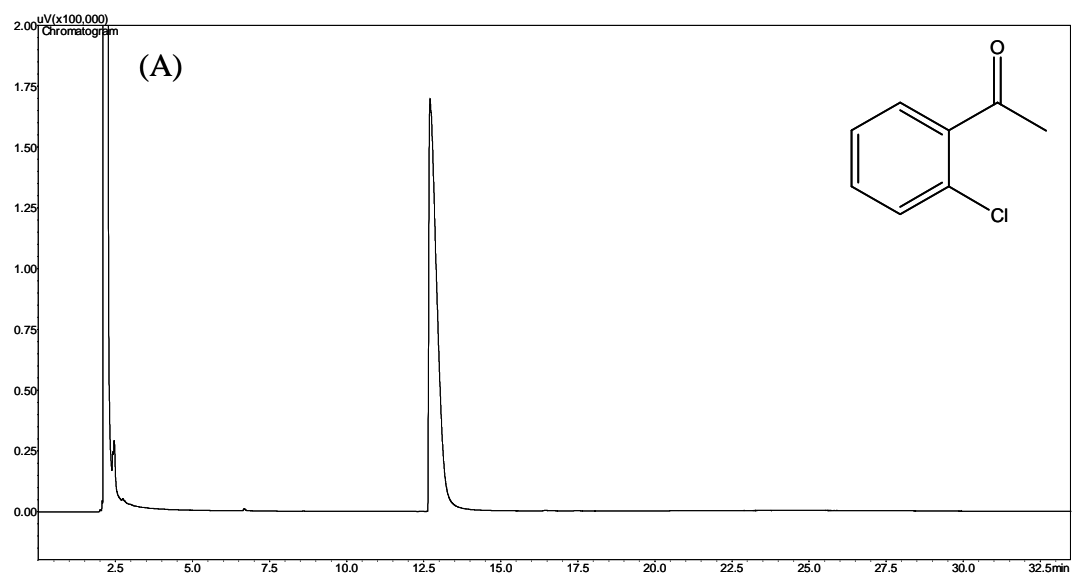


Figura 10. Cromatogramas obtidos por CG. (A) padrão da *o*-cloroacetofenona **8**

(B) padrão do 1-(2-clorofenil)etanol *rac*-**12**

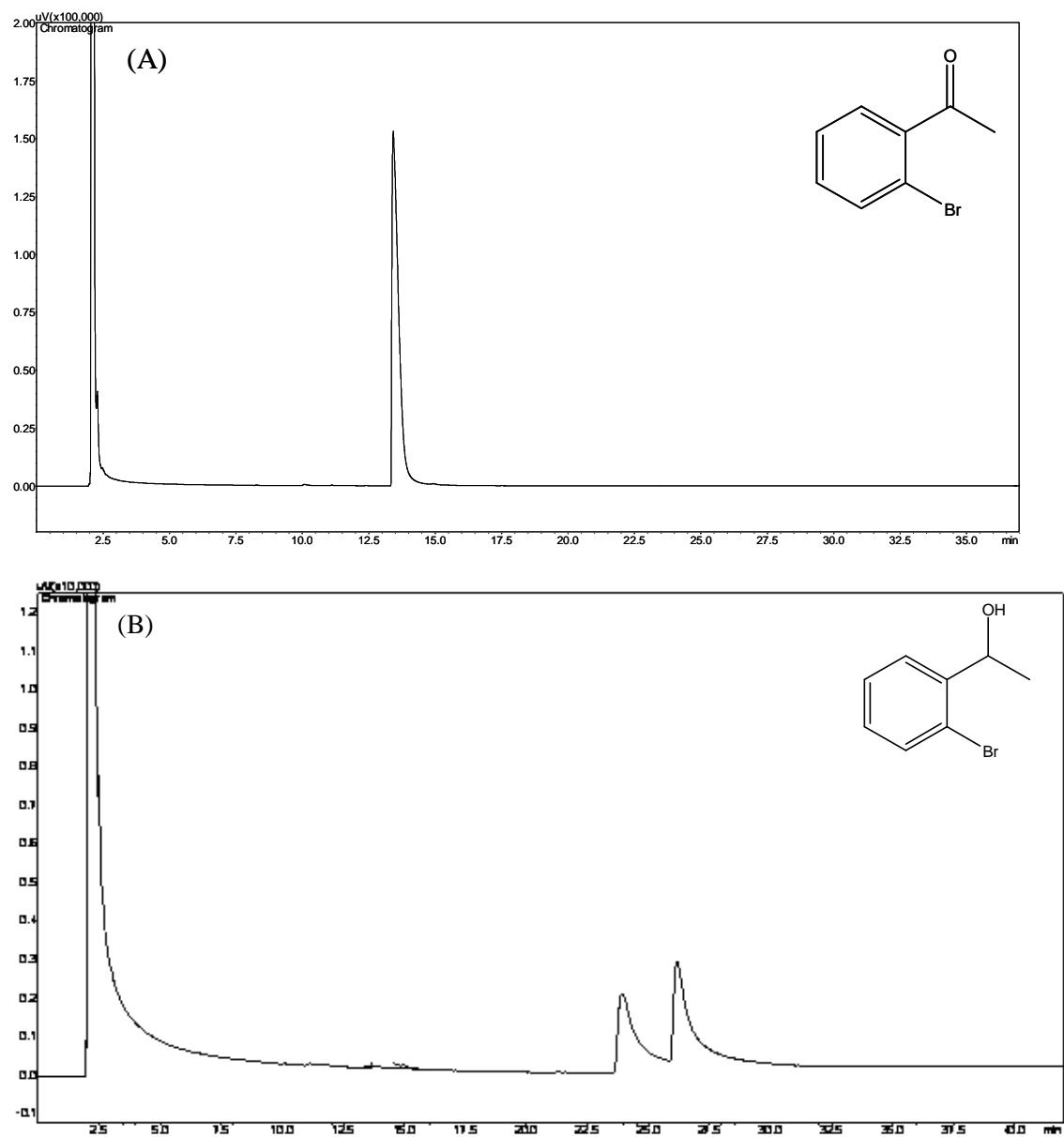


Figura 11. Cromatogramas obtidos por CG. (A) padrão da *o*-bromoacetofenona **9**
(B) padrão do 1-(2-bromofenil)etanol *rac*-**13**

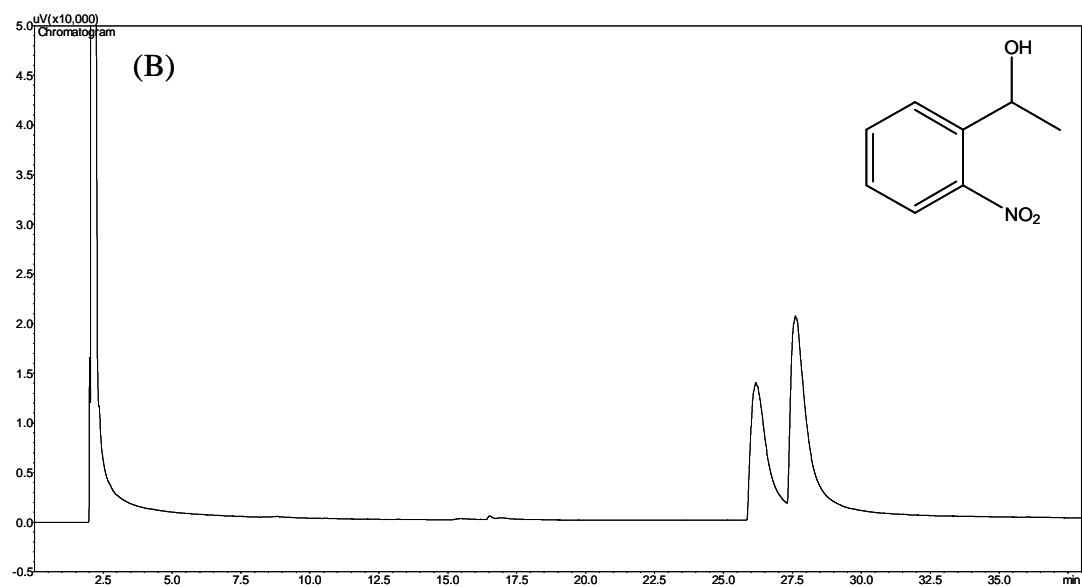
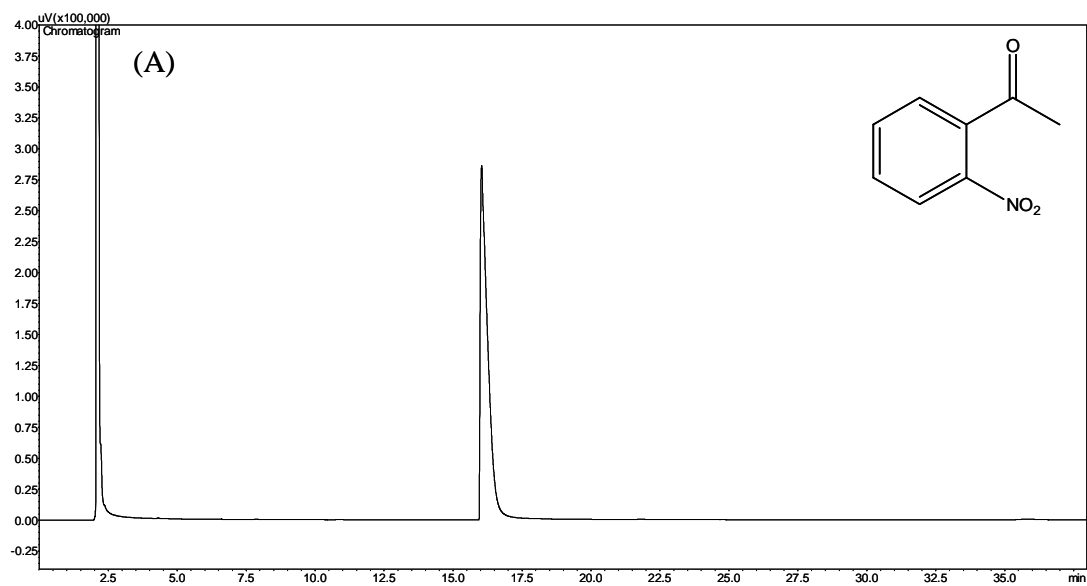


Figura 12. Cromatogramas obtidos por CG. (A) padrão da *o*-nitroacetofenona **10**
(B) padrão do 1-(2-nitrofenil)etanol *rac*-**14**

**REDUÇÃO DE DERIVADOS DE ACETOFENONAS COM OS
MICRORGANISMOS ISOLADOS DA ALGA MARINHA**

Bostrychia radicans

Como descrito em materiais e métodos anteriormente, realizou-se também as reações de biocatálise com os microrganismos isolados da alga *B. radicans* (bactéria Br-01 e os fungos Br-09, Br-23, Br-27 e Br-61). As reações de redução foram realizadas com as *o*-acetofenonas **7 - 10**. Na tabela 6, encontram-se os dados das reações de redução das *o*-acetofenonas **7 - 10** com a bactéria Br-01.

Tabela 6. Redução de *o*-acetofenonas **7 - 10** com a bactéria Br-01 isolada da alga marinha *Bostrychia radicans*

Linhas	Cetonas	Tempo (dias)	c (%) cetonas	c (%) alcoóis	ee (%) alcoóis (ca)
1	<i>o</i> -flúor	10	27	73	99 (<i>S</i>)
2	<i>o</i> -cloro	10	51	49	99 (<i>S</i>)
3	<i>o</i> -bromo	10	5	95	99 (<i>S</i>)
4	<i>o</i> -nitro	10	93	7	10 (<i>S</i>)

Condições reacionais: em frascos erlenmeyers de 250 mL foi adicionado o de meio de cultura de extrato de malte 2% (100 mL). Cultivou-se a bactéria Br-01 por 2-3 dias em agitação orbital (150 rpm, 32 °C). Após este período adicionou-se 50 mg das cetonas **7 - 10** dissolvidas em 300 µL de DMSO. As reações foram mantidas em agitação orbital (150 rpm, 32 °C). Alíquotas foram retiradas em tempos fixados e analisadas por cromatografia gasosa utilizando-se coluna quiral de ciclodextrina. c (%): concentração determinada por CG; ee (%): excesso enantiomérico; ca: configuração absoluta.

A bactéria Br-01 reduziu as *orto*-acetofenonas **7 – 9** com excelentes excessos enantioméricos e com boas taxas de conversões (Linhas 1 - 3, Tabela 6). Enquanto que a *p*-nitroacetofenona **10** foi discretamente reduzida, obtendo-se 7% de conversão e 10% de excesso enantiomérico para o correspondente álcool formado (Linha 4, tabela 6). O melhor resultado foi com *o*-bromoacetofenona **9**, pois foi reduzida no álcool (*S*)-**13** com 95% de conversão e 99% de excesso enantiomérico. Conclui-se que a bactéria Br-01 isolada da alga marinha *Bostrychia radicans* tem potencial para reduzir derivados de *o*-acetofenonas. Assim, este trabalho demonstra que a busca por novas enzimas para atuarem como biocatalisadores é promissor.

Ainda, dando continuidade aos trabalhos, reações de redução das iodoacetofenonas **1 – 3** e *orto*-acetofenonas **7 – 10** foram realizadas com as linhagens de fungos (Br-09, Br-23, Br-27 e Br-61) isolados da alga *B. radicans*.

As reações de biocatálise foram realizadas fazendo-se os inóculos dos fungos em meio de cultura líquido de extrato de malte 2%. Após o crescimento dos fungos por 3 dias em agitação orbital adicionaram-se 50 mg das cetonas (**1 – 3** e **7 -10**) dissolvidas em dimetilsufóxido (DMSO). As reações foram mantidas sob agitação e temperatura controladas (150 rpm, 32 °C). Alíquotas foram retiradas em tempos determinados e analisados por cromatografia gasosa utilizando-se como fase estacionária coluna quiral de ciclodextrina. Os resultados obtidos estão sumarizados nas tabelas 7 e 8.

As linhagens de fungos Br-09 e Br-61 catalisaram a redução da *o*-iodoacetofenona **1** no correspondente álcool (*R*)-**11** com excelentes valores de excessos enantioméricos (Linhas 1 e 4, Tabela 7). Entretanto a conversão do álcool (*R*)-**11** com a linhagem Br-09 foi superior à linhagem Br-61 (Linhas 1 e 4, Tabela 7). Este álcool apresentou seletividade anti-Prelog, pois sua configuração absoluta foi *R*.

A reação da *p*-iodoacetofenona **3** com a linhagem Br-09 apresentou altos valores de conversão e excesso enantiomérico para o álcool (*S*)-**14** (Linha 3, Tabela 7). Contudo, com a linhagem Br-61 ocorreu um acentuado decréscimo na conversão e na seletividade (Linha 6, Tabela 7). Nestes experimentos, não foram realizadas reações com a *m*-iodoacetofenona **2** com os fungos Br-09 e Br-61.

Tabela 7. Redução de iodoacetofenonas **1 – 3** com os fungos Br-09 e Br-61 isolados da alga marinha *Bostrychia radicans*

I (ortho-I (1)
meta-I (2)
para-I (3)) $\xrightarrow[\text{de } Bostrychia \text{ radicans}]{\text{fungos isolados}}$ I (ortho-I (4)
meta-I (5)
para-I (6)) (R) ou (S)

Linhas	Cetonas	Tempo (dias)	c (%) cetonas	c (%) alcoóis	<i>ee</i> (%) alcoóis (ca)
Fungo Br-09					
1	<i>o</i> -iodo	10	0	100	99 (<i>R</i>)
2	<i>m</i> -iodo	-	-	-	-
3	<i>p</i> -iodo	10	2	98	99 (<i>S</i>)
Fungo Br-61					
4	<i>o</i> -iodo	10	32	68	99 (<i>R</i>)
5	<i>m</i> -iodo	-	-	-	-
6	<i>p</i> -iodo	10	70	30	42 (<i>S</i>)

Condições reacionais: em frascos erlenmeyers de 250 mL foi adicionado o meio de cultura de extrato de malte 2% em água do mar artificial (100 mL). Cultivaram-se os fungos por 2-3 dias em agitação orbital (150 rpm, 32 °C). Após este tempo adicionou-se 50 mg (0,20 mmol) das cetonas **1 – 3** dissolvidas em 300 μ L de DMSO. As reações foram mantidas em agitação orbital (150 rpm, 32 °C). Alíquotas foram retiradas em tempos fixados e analisadas por cromatografia gasosa utilizando-se coluna quiral de ciclodextrina. c (%): concentração determinada por CG; *ee* (%): excesso enantiomérico; ca: configuração absoluta.

As reações com as *o*-acetofenonas **7 -10** apresentaram bons resultados de conversões e seletividades com as quatro linhagens de fungos utilizadas. Os resultados destas reações estão sumarizados na tabela 8.

O fungo **Br-09** reduziu todas as *o*-acetofenonas **7 – 10** com excelentes conversões (Linhas 1 - 4, Tabela 8). Este fungo foi que apresentou melhores conversões para todos os substratos utilizados no decorrer deste trabalho. As seletividades também foram excelentes, sendo todas superiores a 98%, exceto para a *o*-fluoracetofenona **7** que foi de 42% (Linha 1, Tabela 8).

O fungo Br-23 também apresentou excelentes conversões e seletividades para as reações que catalisaram (Linhas 5 - 8, Tabela 8), exceto para a *o*-cloroacetofenona **8** que apresentou uma baixa conversão no álcool (Linha 6, Tabela 8). Este fungo também apresentou uma boa seletividade para o álcool *o*-fluorfeniletanol **11**, cujo excesso enantiomérico foi de 90% (Linha 5, Tabela 8).

O fungo Br-27 apresentou um resultado similar ao microrganismo Br-23, ou seja, bons valores de seletividades e conversões para as reações, exceto para *o*-cloroacetofenona **8**, cuja conversão foi de 4% (Linhas 9 -12, Tabela 8). O *o*-bromofeniletanol **13** foi o único álcool obtido com configuração absoluta *R* com os fungos Br-23 e Br-27.

O fungo Br-61 reduziu com boas seletividades e conversões a *o*-fluoracetofenona **7** e a *o*-nitroacetofenona **10**. Enquanto a *o*-cloroacetofenona **8** e a *o*-bromoacetofenona **9** não foram convertidas.

A *o*-fluoracetofenona **4** foi o único substrato que levou a um decréscimo no excesso enantiomérico do álcool (*S*)-**8** formado, possivelmente devido ao menor tamanho do átomo de flúor em posição *orto*.

Na figura 14 tem-se os cromatogramas das reações de redução da *o*-fluoracetofenona **7** e *o*-nitroacetofenona **10** obtidos com o fungo Br-09 isolado da alga marinha *B. radicans*.

Tabela 8. Redução de *o*-acetofenonas **7 – 10** com os fungos Br-09, Br-23, Br-27 e Br-61 isolados da alga marinha *Bostrychia radicans*

R = F (**7**)
Cl (**8**)
Br (**9**)
NO₂ (**10**)

R = F (**11**)
Cl (**12**)
Br (**13**)
NO₂ (**14**)

Linhas	Cetonas	Tempo (dias)	c (%) cetonas	c (%) alcoóis	ee (%) alcoóis(ca)
Fungo Br-09					
1	<i>o</i> -flúor	10	1	99	42 (<i>S</i>)
2	<i>o</i> -cloro	10	0	100	99 (<i>S</i>)
3	<i>o</i> -bromo	10	0	100	99 (<i>S</i>)
4	<i>o</i> -nitro	10	10	90	99 (<i>S</i>)
Fungo Br-23					
5	<i>o</i> -flúor	10	23	77	90 (<i>S</i>)
6	<i>o</i> -cloro	10	92	8	99 (<i>S</i>)
7	<i>o</i> -bromo	10	4	96	90 (<i>R</i>)
8	<i>o</i> -nitro	10	8	92	98 (<i>S</i>)
Fungo Br-27					
9	<i>o</i> -flúor	10	1	99	80 (<i>S</i>)
10	<i>o</i> -cloro	10	96	4	99 (<i>S</i>)
11	<i>o</i> -bromo	10	24	76	99 (<i>R</i>)
12	<i>o</i> -nitro	10	30	70	99 (<i>S</i>)
Fungo Br-61					
13	<i>o</i> -flúor	10	17	83	99 (<i>S</i>)
14	<i>o</i> -cloro	10	100	0	-
15	<i>o</i> -bromo	10	100	0	-
16	<i>o</i> -nitro	10	70	30	99 (<i>S</i>)

Condições reacionais: Em frascos erlenmeyers de 250 mL foi adicionado o meio de cultura de extrato de malte 2% em água do mar artificial (100 mL). Cultivaram-se os fungos por 2-3 dias em agitação orbital (150 rpm, 32 °C). Após este tempo adicionou-se 50 mg das cetonas **7 – 10** dissolvidas em 300 µL de

DMSO. As reações foram mantidas em agitação orbital (150 rpm, 32 °C). Alíquotas foram retiradas em tempos fixados e analisadas por cromatografia gasosa utilizando-se coluna quiral de ciclodextrina. c (%): concentração determinada por CG; *ee* (%): excesso enantiomérico; *ca*: configuração absoluta.

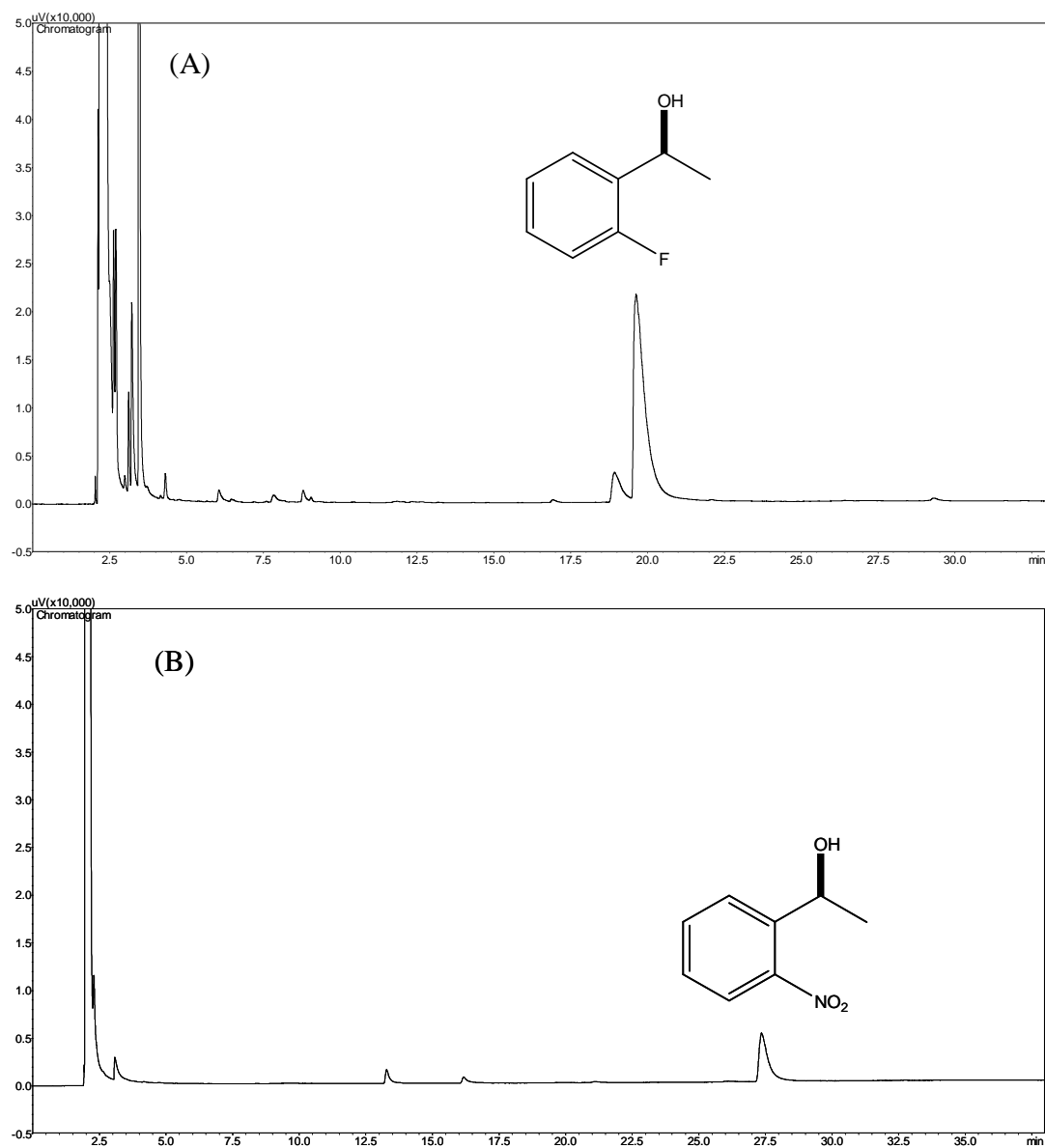


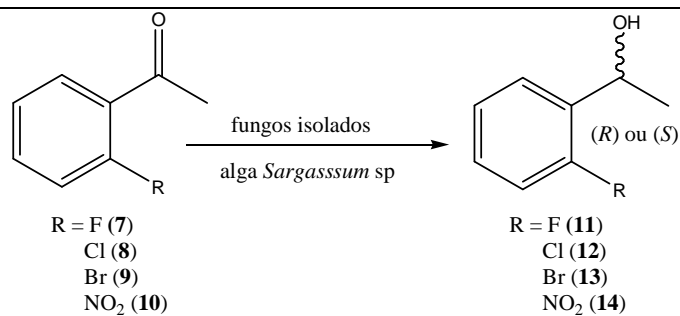
Figura 14. Cromatogramas obtidos por CG das reações de redução com o fungo Br-09 isolado da alga *B. radicans* com 10 dias de reação. (A) *o*-fluorfeniletanol **7** (B) *o*-nitrofeniletanol **10**

REDUÇÃO DE DERIVADOS DE ACETOFENONAS COM FUNGOS

ISOLADOS DA ALGA *Sargassum* sp.

O isolamento dos fungos da alga *Sargassum* sp. estão descritos em materiais e métodos. Foi realizada uma triagem com quatro fungos (SMA2-C, SMA2-8, SMA2-58, SGPY-41) isolados da alga *Sargassum* sp. frente a *o*-acetofenonas **7 – 10**. Realizaram-se os cultivos dos microrganismos em 100 mL de meio de extrato de malte 2% por 2-3 dias. Posteriormente adicionaram-se 50 mg das *o*-acetofenonas **7 – 10** solubilizadas em 300 µL de dimetilsulfóxido. As reações foram mantidas sob agitação (150 rpm, 32 °C) por 10 dias. Após este período as reações foram extraídas com acetato de etila e analisadas por cromatografia gasosa utilizando-se coluna quirál de ciclodextrina. Os resultados obtidos estão sumarizados na tabela 9.

Tabela 9. Redução de *o*-acetofenonas **7** – **10** com fungos isolados da alga marinha *Sargassum* sp.



Linhas	Cetonas	Tempo (dias)	c (%) cetonas	c (%) alcoóis	ee (%) alcoóis (ca)
Fungo SMA2-C					
1	<i>o</i> -flúor	10	2	98	80 (<i>R</i>)
2	<i>o</i> -cloro	10	22	78	99 (<i>S</i>)
3	<i>o</i> -bromo	10	93	7	99 (<i>S</i>)
4	<i>o</i> -nitro	10	95	5	99 (<i>S</i>)
Fungo SMA2-8					
5	<i>o</i> -flúor	10	15	85	94 (<i>R</i>)
6	<i>o</i> -cloro	10	2	98	99 (<i>S</i>)
7	<i>o</i> -bromo	10	54	46	99 (<i>S</i>)
8	<i>o</i> -nitro	10	85	15	98 (<i>S</i>)
Fungo SMA2-58					
9	<i>o</i> -flúor	10	2	98	77 (<i>S</i>)
10	<i>o</i> -cloro	10	3	97	99 (<i>S</i>)
11	<i>o</i> -bromo	10	68	32	99 (<i>S</i>)
12	<i>o</i> -nitro	10	90	10	98 (<i>S</i>)
Fungo SGPY-41					
13	<i>o</i> -flúor	10	2	98	80 (<i>S</i>)
14	<i>o</i> -cloro	10	22	78	99 (<i>S</i>)
15	<i>o</i> -bromo	10	93	7	99 (<i>S</i>)
16	<i>o</i> -nitro	10	95	5	98 (<i>S</i>)

Condições reacionais: em frascos erlenmeyers de 250 mL foi adicionado o meio de cultura de extrato de malte 2% em água do mar artificial (100 mL). Cultivaram-se os fungos por 2-3 dias em agitação orbital (150 rpm, 32 °C). Após este tempo adicionaram-se 50 mg das cetonas **7** – **10** dissolvidas em 300 µL de DMSO. As reações foram mantidas em agitação orbital (150 rpm, 32 °C). Alíquotas foram retiradas em tempos fixados e analisadas por cromatografia gasosa utilizando-se coluna quiral de ciclodextrina. c (%): concentração determinada por CG; ee (%): excesso enantiomérico; ca: configuração absoluta.

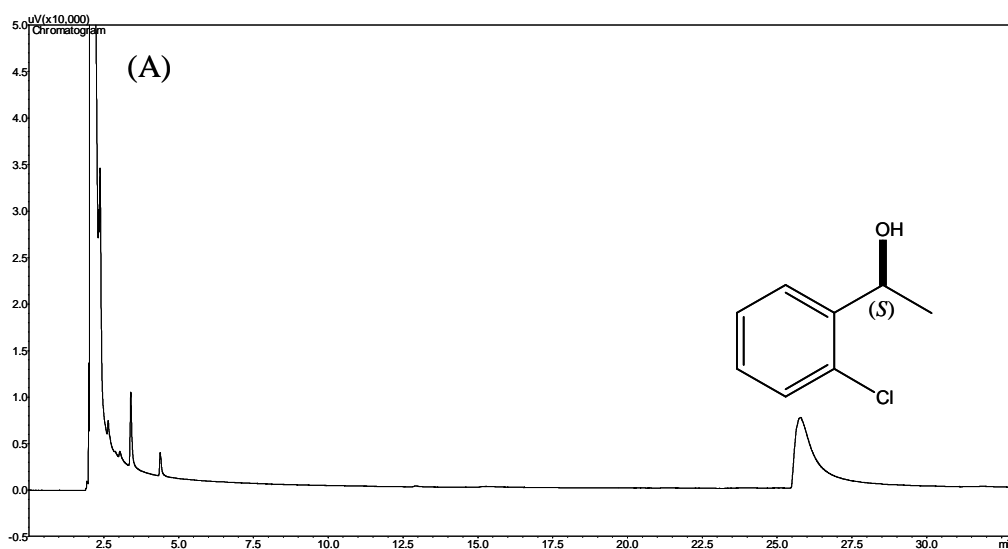
Todos os fungos isolados da alga *Sargassum* sp. (SMA2-C, SMA2-8, SMA2-58, GPY-41) catalisaram a redução da *o*-fluoroacetofenona **7** com excelente conversão, porém, os excessos enantioméricos foram inferiores a 98% para o correspondente álcool (*R*)-**11** (Linhas 1, 5, 9 e 13, Tabela 9). Todos os fungos levaram a formação preferencial do *R*-enantiômero.

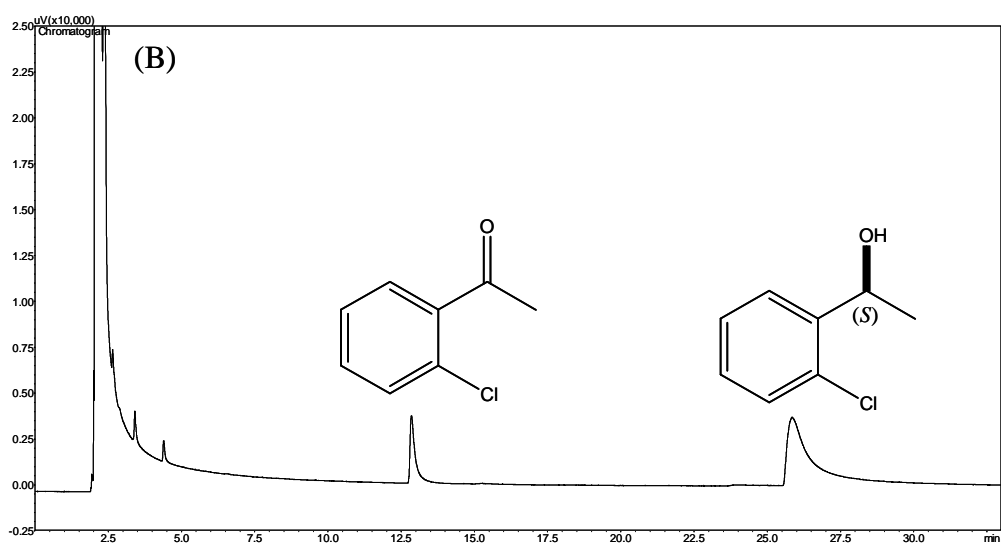
Os fungos SMA2-C e GPY-41 catalisaram a redução da *o*-cloroacetofenona **8** com menores conversões que os fungos SMA2-8 e SMA2-58, porém todos forneceram altos excessos enantioméricos para o álcool (*S*)-**12** (Linhas 2, 6, 10 e 14, Tabela 9).

O melhor resultado da cetona *o*-bromoacetofenona foi obtido com o fungo SMA2-8, com conversões de 46% ao respectivo **13** (*S*)-álcool, com 99% de excesso enantiomérico (Linha 7, Tabela 9).

Concluiu-se através destes experimentos que os quatro fungos isolados da alga *Sargassum* sp. catalisaram a redução das *o*-acetofenonas **7** – **10** em diferentes conversões e seletividades.

Na figura 15 têm-se os cromatogramas das reações de redução da *o*-cloroacetofenona **8** obtidos com os fungos SMA2-8 e SGPY-41 isolados da alga marinha *Sargassum* sp.



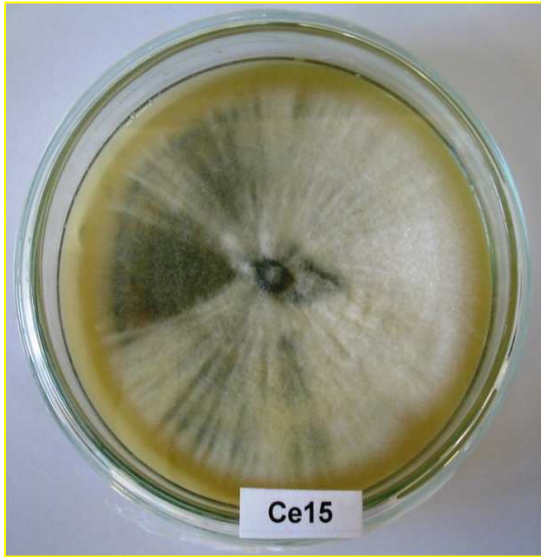


Figuras 15. Cromatogramas obtidos por CG das reações da *o*-cloroacetofenona **8** com fungos isolados da alga *Sargassum* sp com 10 dias de reação (A) fungo SMA2-8 (B) fungo SGPY-41.

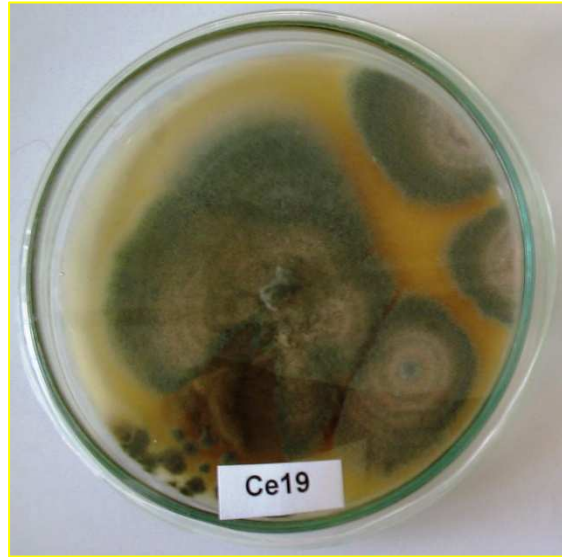
REDUÇÃO DE α -TRIFLUORMETILCETONAS COM FUNGOS MARINHOS

Nesta parte do trabalho realizou-se a redução de cetonas 1,3-dicarboniladas **15** – **16** com fungos marinhos. Os fungos foram isolados das esponjas marinhas *Chelonaplysilla erecta* e *Geodia corticostylifera*. As espécies utilizadas foram o *Aspergillus sydowii* Ce15, *Aspergillus sydowii* Ce19, *Aspergillus sydowii* Gc12, *Bionectria* sp Ce5, *Penicillium raistrickii* Ce16, *Penicillium miczynskii* Gc5 e o *Trichoderma* sp Gc1.

Na figura 16 têm-se as fotos de alguns fungos marinhos cultivados no laboratório e utilizados neste trabalho.



Aspergillus sydowii Ce15



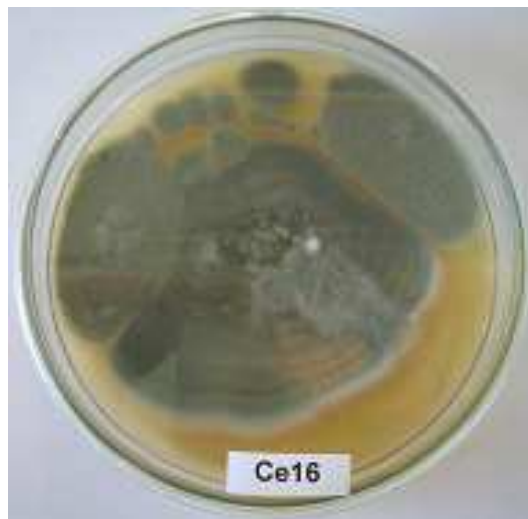
Aspergillus sydowii Ce19



Aspergillus sydowii Gc12



Trichoderma sp Gc1

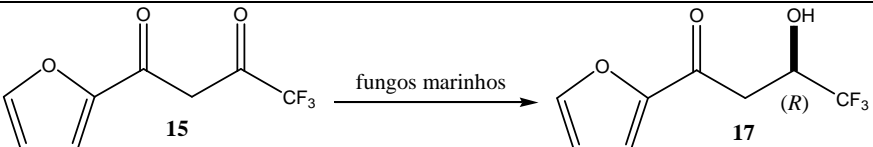


Penicillium raistrickii Ce16

Figura 16. Colônias de fungos marinhos cultivadas em extrato de malte 2%

Os fungos foram cultivados por 5 dias em frascos erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de extrato de malte 2% preparado em água do mar artificial. Após este período adicionou-se 50 mg das cetonas **15** – **16** dissolvidas em 300 µL de dimetilsulfóxido. As reações foram mantidas em agitação orbital. Alíquotas foram retiradas em tempos fixados e analisadas por cromatografia gasosa acoplada por cromatografia gasosa quiral. Os dados das reações de redução estão sumarizados nas tabelas 10 e 11.

Tabela 10. Redução da α -trifluormetilcetona **15** com os fungos marinhos

				
Linhas	Tempo (dias)	c (%) cetona	c (%) álcool	ee (%) álcool (ca)
<i>Aspergillus sydowii</i> Ce19				
1	4	86	24	61 (R)
2	7	5	95	70 (R)
<i>Aspergillus sydowii</i> Gc 12				
3	4	44	56	81 (R)
4	7	3	97	87 (R)
<i>Penicillium raistrickii</i> Ce16				
5	4	85	15	20 (R)
6	7	-	100	20 (R)
<i>Penicillium raistrickii</i> Gc5				
7	4	10	90	85 (R)
8	7	2	98	87 (R)

Condições reacionais: em frascos erlenmeyers de 250 mL foi adicionado o meio de cultura de extrato de malte 2% em água do mar artificial (100 mL). Cultivaram-se os fungos marinhos por 5 dias sob agitação orbital (150 rpm, 32 °C). Após este tempo adicionou-se ao meio de cultivo 50 mg (0,24 mmol) da cetona **15** dissolvida em 300 µL de DMSO. As reações foram mantidas sob agitação orbital (150 rpm, 32 °C). Alíquotas foram retiradas em tempos fixados e analisadas por cromatografia gasosa utilizando-se coluna quiral de ciclodextrina. c (%): concentração determinada por CG; ee (%): excesso enantiomérico; ca: configuração absoluta.

Como observado na tabela 10 todos os fungos marinhos reduziram a cetona **15** no correspondente álcool (*R*)-**17**. Os fungos marinhos *Aspergillus sydowii* Gc 12 e *Penicillium raistrickii* Gc5 isolados da esponja *Geodia corticostylifera* foram os que reduziram melhor o grupo α -trifluorometilcarbonílico da cetona **15** fornecendo altas conversões e bons valores de excessos enantioméricos para o álcool (*R*)-**17** (Linhas 4 e 8, Tabela 10). Enquanto os fungos *Aspergillus sydowii* Ce19 e *Penicillium raistrickii* Ce16 isolados da esponja *Chelonaplysilla erecta* apresentaram menores seletividades para o álcool (*R*)-**17** com 7 dias de reação (Linhas 2 - 6, Tabela 10).

As reduções catalisadas pelas enzimas dos fungos apresentaram regioseletividade e estereosseletividade, pois ocorreu somente a redução do grupo α -trifluorocarbonílico de **15** e com a formação preferencial do *S*-enantiômero do álcool **17**. A configuração absoluta do álcool (*R*)-**17** foi determinada por comparação com a rotação descrita na literatura (Parte II, Materiais e Métodos). Neste caso, as enzimas dos fungos marinhos promoveram o ataque pela face *si* da cetona **17**, formando o álcool com configuração (*R*), de acordo com a regra de Prelog (Figura 17).

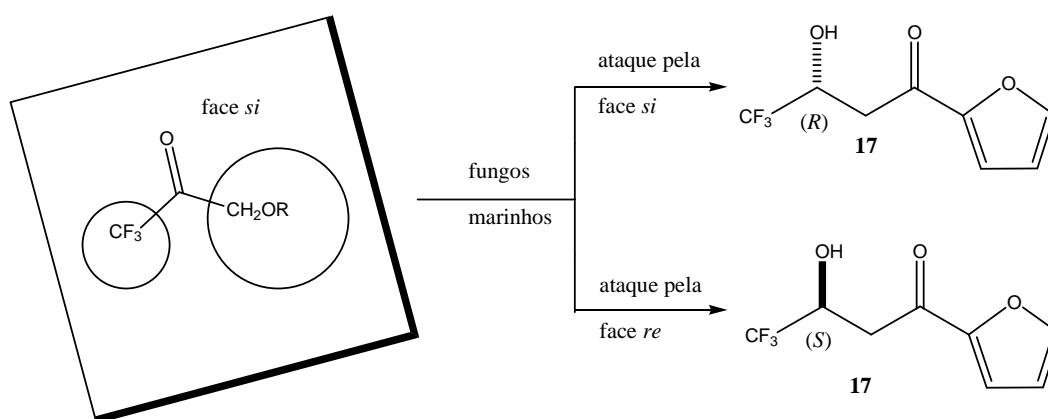


Figura 17. Regra de Prelog para a redução da cetona **17** com fungos marinhos

As reações de redução da cetona **16** foram realizadas com os fungos marinhos *Bionectria* sp Ce5, *Penicillium raistrickii* Gc5 e *Trichoderma* sp Gc1 (Tabela 11). Todos os fungos reduziram o grupo α -trifluormetilcarbonílico com boa seletividade, sendo que os melhores resultados foram com os fungos *Penicillium raistrickii* Gc5 e *Trichoderma* sp Gc1 (Linhas 4 e 6, Tabela 11). O fungo *Bionectria* sp Ce5 foi o que apresentou menor conversão (Linha 2, Tabela 11).

As reduções promovidas pelas enzimas destes fungos também foram regio- e estereosseletivas, pois ocorreu somente a redução do grupo α -trifluorocarbonílico de **16** obtendo preferencialmente um enantiômero do álcool **17**. Até o presente momento não foi determinada a configuração absoluta do álcool **17**.

Tabela 11. Redução da α -trifluormetilcetona **16** com os fungos marinhos

Linhas	Tempo (dias)	c (%) cetona	c (%) álcool	ee (%) álcool (ca)
<i>Bionectria</i> sp Ce5				
1	4	96	4	70
2	7	58	42	78
<i>Penicillium raistrickii</i> Gc5				
3	4	42	58	60
4	7	37	63	75
<i>Trichoderma</i> sp Gc1				
5	4	88	12	21
6	7	28	72	73

Condições reacionais: em frascos erlenmeyers de 250 mL foi adicionado o meio de cultura de extrato de malte 2% em água do mar artificial (100 mL). Cultivaram-se os fungos marinhos por 5 dias em agitação orbital (150 rpm, 32 °C). Após este tempo adicionou-se 50 mg (0,19 mmol) da cetona **16** dissolvida em 300 μ L de DMSO. As reações foram mantidas em agitação orbital (150 rpm, 32 °C). Alíquotas foram retiradas em tempos fixados e analisadas por cromatografia gasosa utilizando-se coluna quiral de

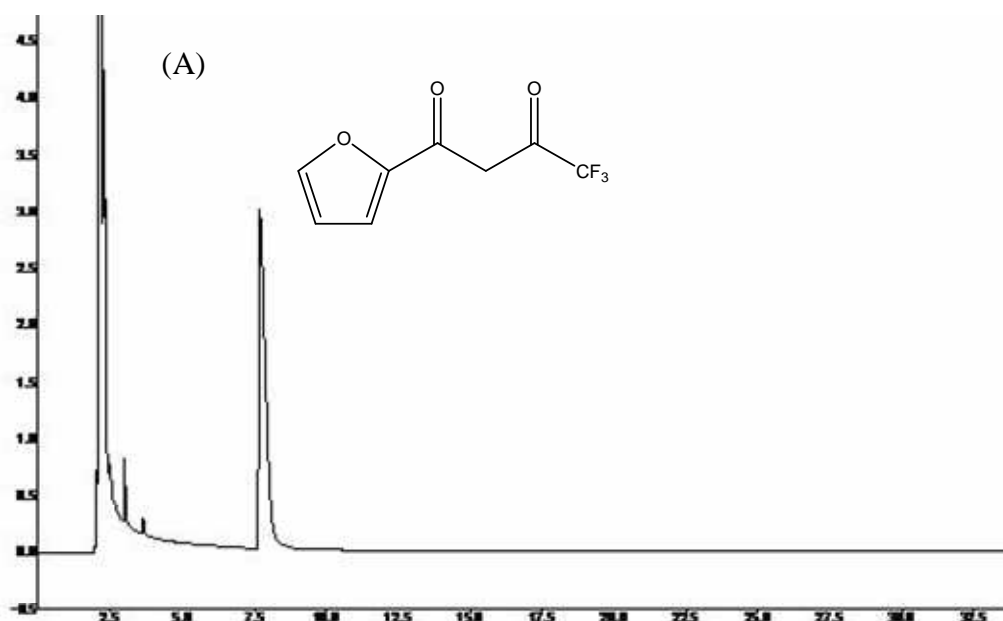
ciclodextrina.c (%): concentração determinada por CG; *ee* (%): excesso enantiomérico; ca: configuração absoluta não determinada.

Na figura 18 têm-se os cromatogramas da dicetona **15** e do álcool racêmico **17** obtidos por cromatografia gasosa em coluna capilar de ciclodextrina.

Na figura 19 têm-se os cromatogramas das reações de redução da dicetona **15** obtidos com os fungos marinhos *Penicillium raistrickii* Gc5 e *Aspergillus sydowii* Ce19.

Na figura 20 têm-se os cromatogramas da dicetona **16** e do álcool racêmico **18** obtidos por cromatografia gasosa em coluna capilar de ciclodextrina.

Na figura 21 têm-se os cromatogramas das reações de redução da dicetona **16** obtidos com os fungos marinhos *Penicillium raistrickii* Gc5 e *Bionectria* sp Ce5.



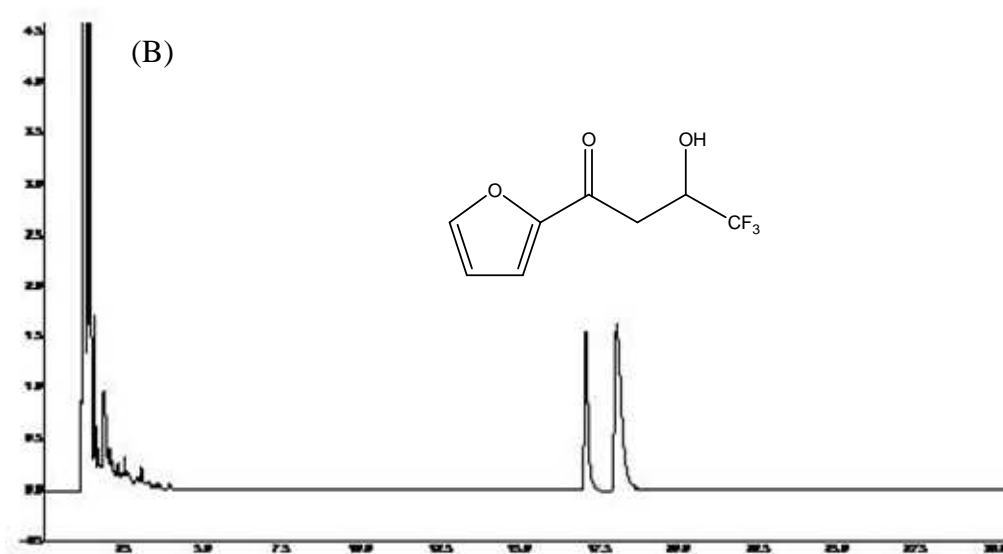
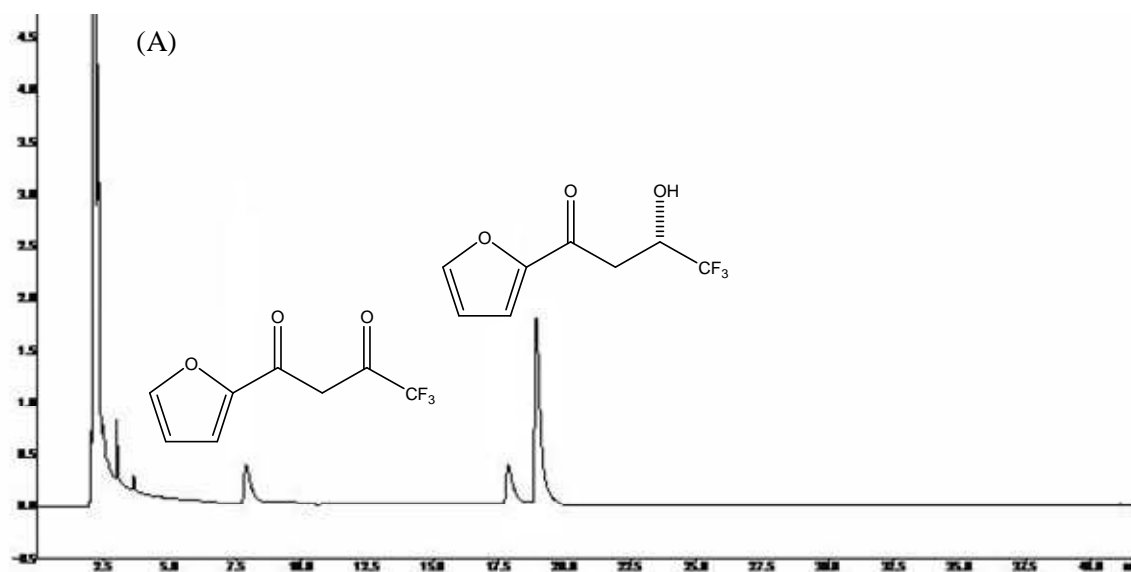


Figura 18. Cromatogramas obtidos por CG. (A) padrão da dicetona **15**
(B) padrão do álcool *rac*-**17**



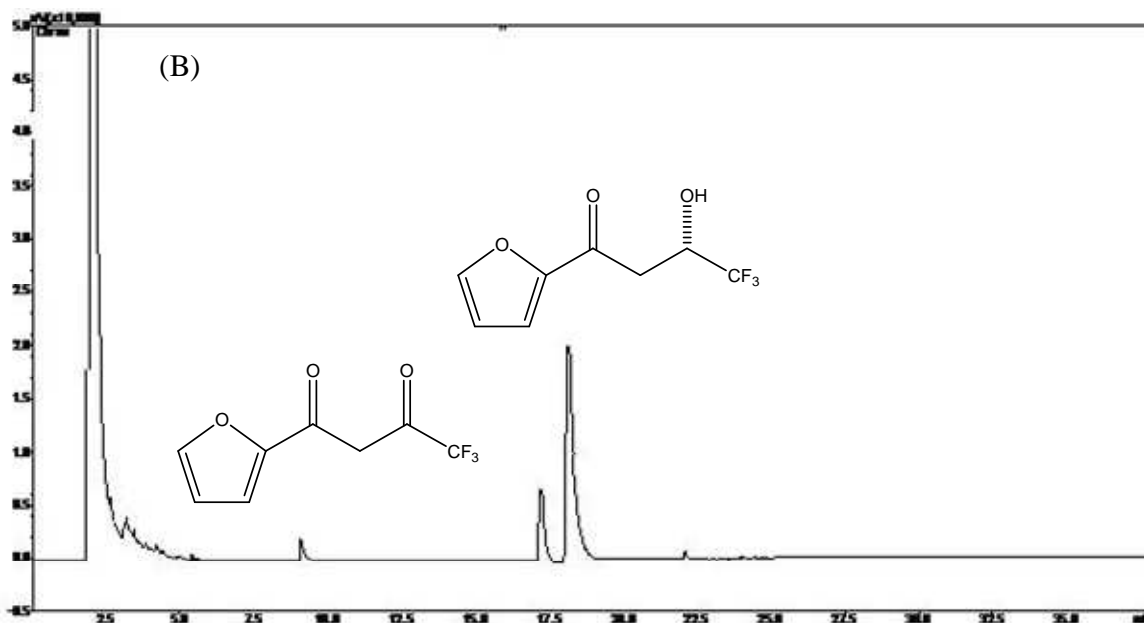
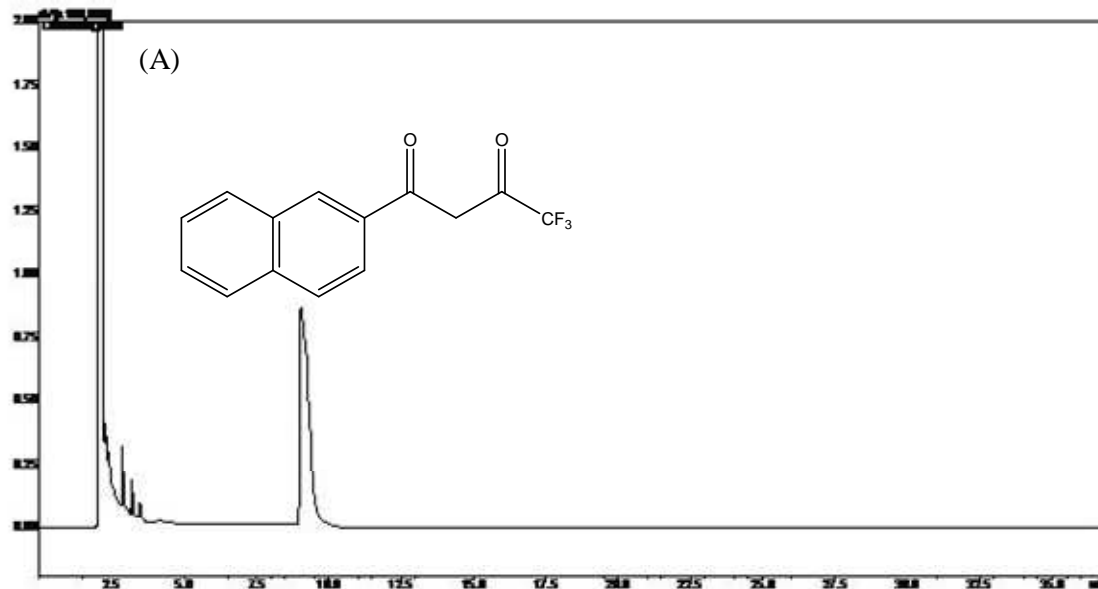


Figura 19. Cromatogramas obtidos por CG das reações da dicetona **15** com fungos marinhos com 7 dias de reação (A) *Penicillium raistrickii* Gc5 (B) *Aspergillus sydowii* Ce19



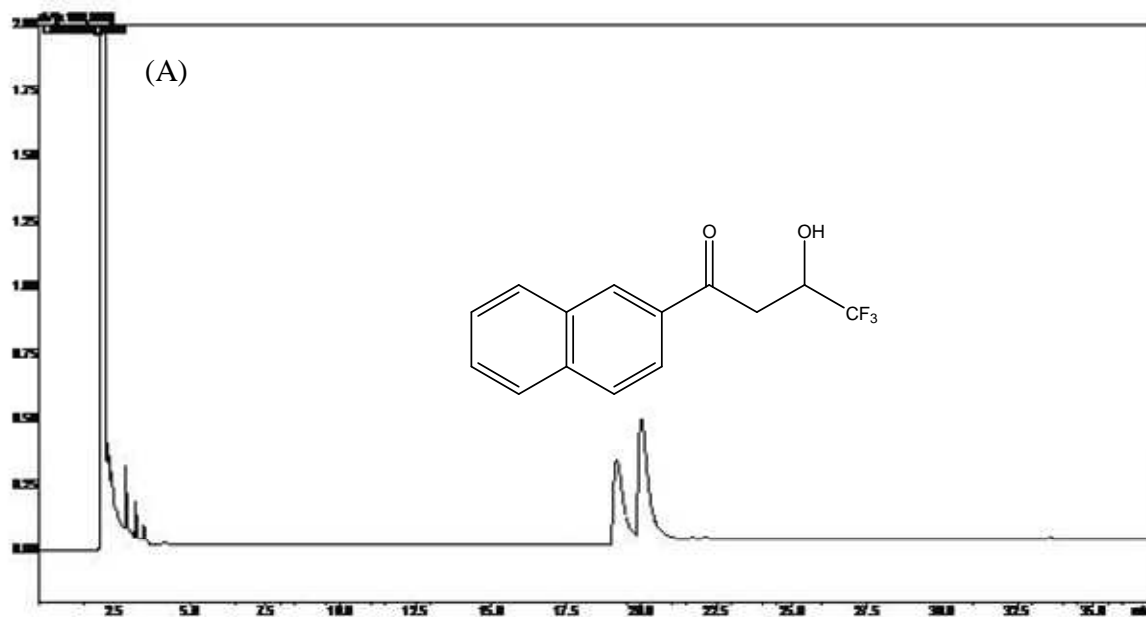


Figura 20. Cromatogramas obtidos por CG. (A) padrão da dicetona **16**
(B) padrão do álcool *rac*-**18**

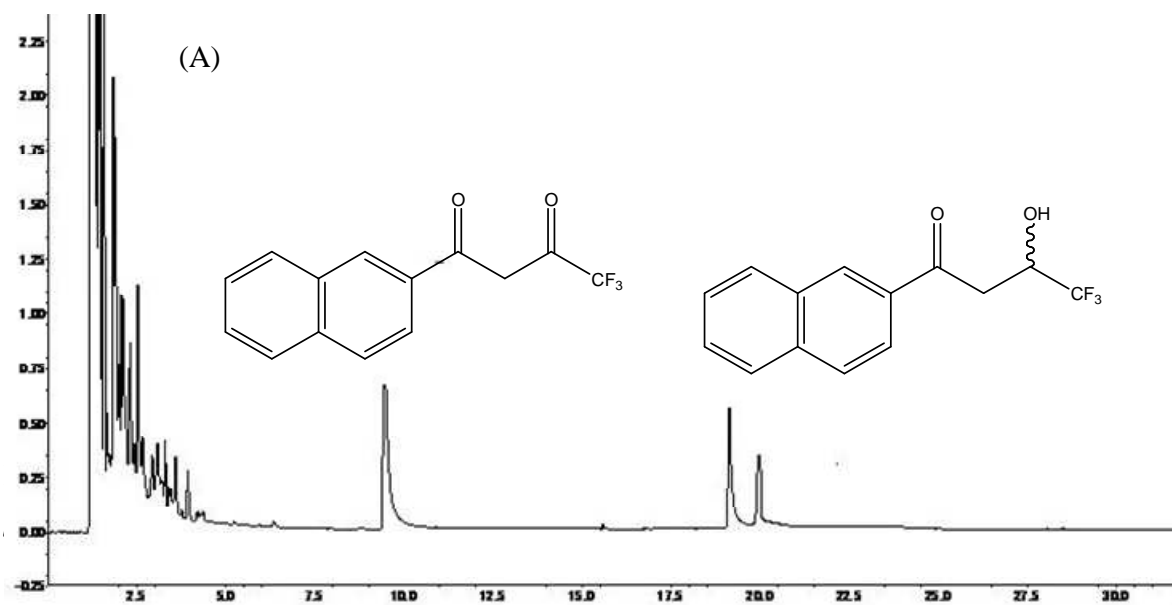


Figura 21. Cromatogramas obtidos por CG das reações da dicetona **15** com fungos marinhos em 7 dias de reação (A) *Penicillium raistrickii* Gc5

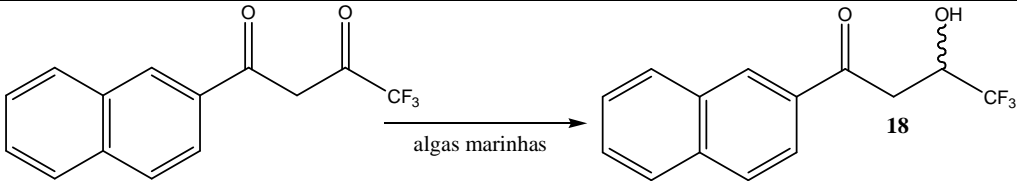
As cetonas dicarboniladas **15** - **16** também foram submetidas às reações biocatalíticas com as algas *Bostrychia tenella* e *Bostrychia radicans*. Os resultados das reações estão sumarizados nas tabelas 12 e 13.

Em todos os casos as algas *B. tenella* e *B. radicans* catalisaram as reações de redução das cetonas **15** - **16** com altas seletividades, porém com baixas conversões (Tabelas 12 - 13). Os baixos valores de conversões podem ser em função da baixas quantidades enzimas presentes nas algas.

Tabela 12. Redução da α -trifluormetilcetona **15** com as algas marinhas

Linhas	Tempo (dias)	c (%) cetona	c (%) álcool	ee (%) álcool (ca)
<i>Bostrychia tenella</i>				
1	4	96	4	99 (R)
2	8	90	10	99 (R)
<i>Bostrychia radicans</i>				
3	4	89	11	99 (R)
4	8	78	22	99 (R)

Condições reacionais: em frascos erlenmeyers de 250 mL foi adicionada água esterilizada (100 mL), alga *B. tenella* ou *B. radicans* (5 g), α -trifluormetilcetona **15** dissolvida em 300 μ L de DMSO. As reações foram mantidas sob agitação orbital (150 rpm, 32 °C). Alíquotas foram retiradas em tempos fixados e analisadas por cromatografia gasosa utilizando-se coluna quirral de ciclodextrina. c (%): concentração determinada por CG; ee (%): excesso enantiomérico; ca: configuração absoluta.

Tabela 13. Redução da α -trifluormetilcetona **16** com as algas marinhas

Linhas	Tempo (dias)	c (%) cetona	c (%) álcool	ee (%) álcool (ca)
<i>Bostrychia tenella</i>				
1	4	88	12	99
2	8	82	18	99
<i>Bostrychia radicans</i>				
3	4	91	9	99
4	8	87	13	99

Condições reacionais: em frascos erlenmeyers de 250 mL foi adicionada água esterilizada (100 mL), alga *B. tenella* ou *B. radicans* (5 g), α -trifluormetilcetona **16** dissolvida em 300 μ L de DMSO. As reações foram mantidas sob agitação orbital (150 rpm, 32 °C). Alíquotas foram retiradas em tempos fixados e analisadas por cromatografia gasosa utilizando-se coluna quiral de ciclodextrina. c (%): concentração determinada por CG; ee (%): excesso enantiomérico; ca: configuração absoluta não determinada.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo deste trabalho foi realizar reações de redução de cetonas proquirais com novos biocatalisadores. Apesar da grande extensão da costa marítima no país, o potencial biocatalítico de organismos marinhos (fungos, bactérias, algas) é pouco explorado. Neste sentido, o estudo realizado tem importância no que se refere ao emprego de algas e microrganismos marinhos como biocatalisadores, tornando-se um trabalho pioneiro.

Os resultados obtidos podem ser comparados com estudos realizados na literatura. Por exemplo, cinco espécies de algas marinhas foram estudadas em reações com derivados de acetofenonas. As algas *Chlorella minutissima*, *Nannochloris atomus*, *Porphyridium purpureum*, *Dunaliella parva* e *Isochrysis galbana* catalisaram a redução de cetonas com diferentes conversões e seletividades. A acetofenona foi reduzida no feniletanol após 5 dias de incubação com conversões de 65% e com excesso enantiomérico de 15% com a alga *C. minutissima* (Hook *et al.*, 2003). Enquanto que a *p*-metilacetofenona e a *p*-hidroxiacetofenona nem sequer foram reduzidas pela alga *C. minutissima* (Hook *et al.*, 2003). Estes resultados, de certa forma, são similares aos obtidos com as algas *B. tenella* e *B. radicans*, uma vez que de acordo com a estrutura dos substratos variou-se a seletividade e as conversões das reações.

CONCLUSÕES

Neste trabalho foram realizadas reações de redução de cetonas utilizando diferentes organismos marinhos como biocatalisadores (algas, fungos e bactérias). Foram utilizados como substratos sete derivados de acetofenonas (**1 -3** e **7 – 10**) e duas cetonas 1,3-dicarboniladas (**15 – 16**).

As algas *B. tenella* e *B. radicans* foram utilizados nas reações de redução das cetonas (**1 -3**, **7 – 10** e **15 - 16**) e levaram a formação dos correspondentes alcoóis com excelentes seletividades, contudo observaram-se modestas conversões.

Também foram isoladas no laboratório as bactérias Bt-01 e Bt-02 das algas *B. tenella* e *B. radicans*, respectivamente. Estas bactérias promoveram as reduções de derivados de acetofenonas (**1 -3** e **7 – 10**), cujos resultados foram similares aos obtidos com as algas, ou seja, altos excessos enantioméricos e baixas conversões.

Ainda, realizaram-se as reações de redução das cetonas (**1 -3** e **7 – 10**) utilizando-se quatro linhagens de fungos isolados da alga *Sargassum* sp. Os fungos (SMA2-C, SMA2-8, SMA2-58, SGPY-41) catalisaram as reações de redução das cetonas aos respectivos alcoóis com diferentes conversões e seletividades.

Realizaram-se as reduções de duas cetonas dicarboniladas com sete linhagens de fungos marinhos (*Aspergillus sydowii* Ce15, *Aspergillus sydowii* Ce19, *Aspergillus sydowii* Gc12, *Bionectria* sp Ce5, *Penicillium raistrickii* Ce16, *Penicillium miczynskii* Gc5 e o *Trichoderma* sp Gc1). Todos os micro-organismos promoveram a redução regioseletiva e estereosseletiva das cetonas dicarboniladas. Observou-se que o grupo α -trifluorocarbonílico foi reduzido preferencialmente, em boas conversões e seletividades.

Ainda, as algas marinhas *Bostrychia radicans* e *Bostrychia tenella* demonstraram bom potencial biocatalisador para a obtenção de (*S*)-alcoóis em reações

com derivados de acetofenonas. Através dos resultados obtidos, concluiu-se que as algas e seus micro-organismos associados têm potencial para serem utilizados como biocatalisadores em reações de redução. Portanto, estes organismos podem ser fontes de novas enzimas para processos biotecnológicos. Este trabalho foi o primeiro estudo realizado no país envolvendo algas marinhas e seus microrganismos associados.

BIOCATALISADORES DE ORIGEM MARINHA (ALGAS,
BACTÉRIAS E FUNGOS) PARA REDUÇÃO ESTEREOSSELETIVA
DE CETONAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

BONATO, S.P.; JABOR, V. A. P. Análise enantiosseletiva de fármacos: Contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Química Nova**, v.28, p.683-689, 2005.

COOPER, E. L. Commentary on traditional and modern biomedical prospecting: Part II. **Ecam**, v.1, n. 2, p. 207-209, 2004.

DA ROCHA, L.C. Redução de derivados de acetofenonas com fungos de origem marinha. Dissertação(Mestrado)-Instituto de Química de São Carlos, Univerisidade de São Paulo, 2008.

DE CONTI, R.; RODRIGUEZ, J. A.; MORAN, J.S. Biocatálise: avanços recentes. **Química Nova**, v.24, p.672-676, 2001.

DRAUZ, K.; WALDMANN, H. Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. **Biotechnology Advances**. v. 20, p. 239-267, 2002.

FABER, K. Biotransformations in organic chemistry. 5.ed. Berlin: Springer-Verlag, 2004.

GUTMANN, O.; SCHWERDTFEGER, R.; RIEKS, A.; ANTRANIKIAN, G; KASHE, V.; BRUNNER.G. Enzyme catalysed reactions, enantiosselectivity and stability under high hidrostatic pressure. **Process Technology Proceedings**. v.12, p. 127-131, 1996.

HATANAKA, Y.; KOBAYASHI, O.; HIGASHIHARA, M.; HIYAMA, K. Reduction of hydroxiacetone with NADPH regenerated through photosynthetic pathway of the halotolerant alga. **Journal of fermentation and Bioengineering**. V.81, p. 378-385, 1996.

HOOK, I.I.; RYAN, S.; SHERIDAN, H. Biotransformations of aliphatic and aromatic ketones, including several monoterpenois ketones and their derivatives by five species of marine microalgae. **Photochemistry**, v. 63, p. 31-39, 2003.

ITOH, K.; SAKAMURI, H.; NAKAMURA, K.; HORIUCHI, C.A. Biocatalytic assymetric reduction of 3-acetilsoxazoles. **Tetrahedron: Asymmetric**, v. 6, p. 1403-1410, 2005.

LEHNINGER, P.; DAVID, L.N.; MICHAEL, M.C. **Principles of biochemistry**. 4. ed. New York, Worth Publishers, 2000. p. 123

LILJEBLAD, A.; KANERVA, L.T. Biocatalysis as a profound tool in the preparation of highly enantiopure amino acids. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.62, p.711-715, 2006.

LIKA, K.; PAPADAKIS, I.A. Modeling the biodegradation of phenolic compounds by microalgae. **Journal of sea research**, v.62, p. 135-146, 2009.

MARGOLIN, A. L. Enzymes in the synthesis of chiral drugs. **Microbiology Technology**, v. 15, p. 266- 280, 1993.

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

MOLINARI, F; ROMANO, D; GANDOLFI, R; GUALANDRIS, R.;FERRARA, N. Biocatalysis for use in pharmaceutical manufacturing. **Journal of Biotechnology**, v.131, p.98-121, 2007.

MUSA, M. M.; ZIELGELMANN-FJELD, K. I.; VIEILLE, C.; ZEIKUS, G.; PHILLIPS, R.S. Assymmetric reduction and oxidation of aromatic ketones and alcohols using W110A secondary alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. **Journal of Organic chemistry**, v. 72, p. 30-34, 2007.

NAKAMURA, K.; YAMANAKA, R.; MATSUDA T.; HARADA T. Recent developments in assymmetric reduction of ketones with biocatalysts. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, p. 2659-2681, 2003.

NAKAMURA, K.; YAMANAKA, R.; MATSUDA T.; HARADA T. Recent developments in assymmetric reduction of ketones with biocatalysts. **Tetrehedron: Asymmetry**, v. 14, p. 2659-2681, 2003.

QUEZADA, M.A.; CARBALLEIRA, J.D.; SINISTERRA, J.V. Monaskus kaoling CBS 302.78 immobilized in polyurethane foam using iso- propanol as co-substrate: optimized immobilization conditions of a fungus as biocatalyst for the reduction of ketones. **Bioresource Technology**, v 100, p. 2018- 2025, 2009.

SAID, S.; PIETRO, C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 2

SILVA, L.M., A química para o desenvolvimento sustentável. **Revista Ciência do ambiente**.v.3, p.50-53. 2007.

UTSUKIHARA, T.; MISUMI, O.; KATO, N.; KUROIWA, T.; HORUCHI, C.A. Reduction of various ketones by red algae. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.17, p. 1179-1281, 2006.

UTSUKIHARA, T.; OKADA, S.; KATO, N.; HORIUCHI, C.A. Biotransformation of α -bromo and α -dibromo alkanone to α -hidroxiketone and α -diketone by *Spirulina platensis*. **Journal of Molecular Catalysis**, v.45, p. 68-72, 2007.

VIDOTTI, E.C.; ROLLEMBERG, M.C. Algas: Da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27, p. 139-145, 2004.

XU, F. Application of oxido-reductases: recent progress. **Industrial Biotechnology**, v.1. p. 38-50, 2005.