UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

LIDIANE DA SILVA ARAÚJO

***Busca de álcool desidrogenases para
aplicação em oxidação enantiosseletiva
de álcoois***

Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade

São Paulo

Data de Depósito na SPG:

04/05/2010

LIDIANE DA SILVA ARAÚJO

***Busca de álcool desidrogenases para aplicação em
oxidação enantiosseletiva de álcoois***

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de **Mestre** em
Química (Química Orgânica)*

Orientador: Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade

São Paulo
2010

Lidiane da Silva Araújo

Busca de álcool desidrogenases para aplicação em oxidação enantiosseletiva de álcoois.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de **Mestre** em
Química (Química Orgânica)

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

*Aos meus pais, irmãos, cunhada e amigos, pelo
carinho, disposição e apoio em toda
a trajetória.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar, me iluminar e me conceder forças para superar as dificuldades.

Ao Prof. Dr. Leandro Helgueira Andrade pela orientação, oportunidade, incentivo, ótimos conselhos, liberdade e confiança durante esses 2 anos.

Aos meus queridos pais: Antônio Filho e Iraci, por serem durante toda a vida, minha base de apoio. Pai, obrigada pelos conselhos sábios nos momentos que mais precisei e pelo seu carinho! E a você mãe, agradeço pelas orações e por me incentivar sempre e nunca me deixar desanimar. Vocês são maravilhosos, guerreiros e meus anjos protetores!

À minha irmã Jeanes e irmão Antônio. Muito obrigada pelo apoio, incentivo, confiança e carinho! Independente de serem únicos, não poderia existir no mundo irmãos melhores que vocês.

À minha cunhada Maria Rita. Obrigada pelo apoio, incentivo nos momentos difíceis, conselhos e por sempre estar ao meu lado como uma irmã.

À minha avó Rosa, pelas orações, conselhos e pelas palavras de carinho.

Ao meu namorado, Daniel Augusto, pelo companheirismo, paciência, compreensão, incentivo e dedicação que foram muito importantes nesta fase de minha vida.

Aos amigos e colegas do grupo: Alessandra, Alexandre, Ana Carolina, Camila, Caterina, Edna, Eliane, Felipe, Henrique, Joel, Larissa, Lya, Mônica, Natássia, Patrícia, Piovani, Priscila, Thiago, Thaís. Edna, obrigada pelos ensinamentos microbiológicos e pela ajuda nos experimentos. Priscila, obrigada por me incentivar com suas palavras, suas contribuições com minhas dificuldades,

angústias e pela amizade. Thaís obrigada pela ajuda nos experimentos e pelo carinho.

Da minha “terrinha”, Campo Maior-PI, os meus amigos, vizinhos e minha família, que suportam tanta saudade, mas sempre me deram força e carinho mesmo estando distante.

Aos meus amigos e “conterrâneos” Rafael e Mariana. Obrigada pela atenção, apoio, incentivo e carinho.

Um agradecimento especial aos Professores Dr. Marcos Carlos e Dra. Maria da Conceição da Universidade Federal do Ceará. Obrigada por me iniciarem neste mundo maravilhoso da Química Orgânica e pelas palavras de incentivo.

Aos funcionários e professores do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Ao CNPq pela bolsa concedida; CAPES, FAPESP (Biota-Bioprospecta) pelo suporte financeiro e ao PROANTAR.

E, finalmente, a todos meus familiares e amigos que de maneira geral contribuíram para que este trabalho se realizasse.

MUITO OBRIGADA!

Epígrafe

*Se a riqueza é um bem desejável na vida, que há de mais rico que a Sabedoria, que realiza todas as coisas?
Decidi, pois, tomá-la por companheira de minha vida, sabendo que me seria conselheira para o bem e conforto nas preocupações e na tristeza.*

Sabedoria, 8; 5, 9

RESUMO

Araújo, L. S. **Busca de álcool desidrogenases para aplicação em oxidação enantiosseletiva de álcoois**. 2010 (116p.) Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós- Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Diante da biodiversidade de micro-organismos existentes na natureza e da necessidade de descobrir novos biocatalisadores para a síntese de bloco de construções quirais e de produtos químicos de alto valor agregado, o presente trabalho teve como objetivo realizar a bioprospeção de micro-organismos para aplicação em reações de oxidação enantiosseletiva de álcoois. Os micro-organismos foram obtidos pelo processo de isolamento induzido de amostras de solo/sedimento coletadas no Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR) e na Antártica. A partir das amostras coletadas (43 de solo e 13 de sedimento) foram isolados 130 micro-organismos mesofílicos (isolados de amostras de solo do PETAR) e 232 micro-organismos psicofílicos/psicotróficos (isolados de amostras de solo/sedimento da Antártica). Realizamos também a avaliação do espectro de atividade enzimática dos micro-organismos em reações de oxidação enantiosseletiva, e para isso empregamos derivados *para* substituídos do (*R,S*)-1-(fenil)etanol. Dentre os micro-organismos estudados, 15 psicofílicos/psicotróficos e 11 micro-organismos mesofílicos apresentaram álcool desidrogenases que catalisaram a oxidação do enantiômero (*S*) do álcool racêmico à sua correspondente cetona. Nesses casos, as linhagens possuem atividade de álcool desidrogenase em que o rendimento de obtenção da cetona foi > 10 % e excesso enantiomérico > 60 %. Por outro lado 6 micro-organismos mesofílicos apresentaram álcool desidrogenases que catalisam a oxidação do enantiômero (*R*) do álcool racêmico à sua correspondente cetona. Foi realizada a caracterização taxonômica para alguns micro-organismos através do sequenciamento do 16S rDNA. Dentre os micro-organismos caracterizados, destacaram-se as bactérias *Flavobacterium* sp., *Arthrobacter* sp., *Acinetobacter* sp., e o *Bacillus* sp. por apresentar excelente atividade enzimática. *Flavobacterium* sp. e a *Arthrobacter* sp. foram selecionadas para o estudo de otimização da reação de oxidação do (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol. Nesse processo foram utilizadas as células ressuspensas em tampão fosfato em diferentes temperaturas (5-30 °C) e tempos reacionais (24-72 horas). A

partir desse estudo, observou-se que a *Flavobacterium* sp. possui uma excelente atividade enzimática a 10 °C e a *Arthrobacter* sp. a 25 °C. Foram determinadas curvas de crescimentos destas bactérias em 15, 20 e 25 °C, em que ambas apresentaram crescimento ótimo a 25 °C, indicando que estas bactérias são psicrotróficas.

Palavras-chave: Álcool desidrogenases, álcoois quirais, psicrófilicos, mesófilicos, oxidação.

ABSTRACT

Araújo, L. S. **Searching for alcohol dehydrogenases for application in enantioselective oxidation of alcohols.** 2010. (116p.) Master Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In the view of the microorganisms biodiversity in nature and the necessity to discover new biocatalysts for chiral synthesis of building blocks and high value-added chemical products, the present work was aimed at making the bioprospection of microorganisms for application in enantioselective oxidation reactions of alcohols. Microorganisms were isolated by enrichment technique from soil/sediment samples collected from the State Park of Alto Ribeira (PETAR) and Antarctic. 130 Mesophilic microorganisms were isolated from soil samples of PETAR, and 232 psychrophilic/psychrotrophic microorganisms from soil/sediment samples of Antarctic. We also evaluated the enzymatic activity of the microorganisms in enantioselective oxidation reactions, by using derivatives of substituted *para* (*RS*)-1-phenylethanol as substrates. Among the studied microorganisms, 15 psychrophile/psychrotrophic and 11 mesophilic strains contain alcohol dehydrogenases that catalyze the (*S*)-enantiomer oxidation of racemic alcohols to its corresponding ketone. In these cases, the strains showed alcohol dehydrogenase activity in which the ketone yields were higher than 10 % and the enantiomeric excess >60 %. Moreover, 6 mesophilic microorganisms showed alcohol dehydrogenases that catalyze the (*R*)-enantiomer oxidation of racemic alcohols to its corresponding ketone. It was performed taxonomic characterization for some microorganisms by sequencing the 16S rDNA. Among the characterized microorganisms, *Flavobacterium* sp., *Arthrobacter* sp., *Acinetobacter* sp. and *Bacillus* sp. showed excellent enzymatic activity. The *Flavobacterium* sp. and *Arthrobacter* sp. were selected for optimization study of oxidation of the (*R,S*)-1-(4-methyl-phenyl)ethanol. In this process, bacterial cells were resuspended in phosphate buffer at different temperatures (5-30 °C) and reaction times (24-72 h). From these studies, it was observed that the *Flavobacterium* sp. has an excellent enzymatic activity at 10 °C and *Arthrobacter* sp. at 25 °C. We determined the growth curves of these bacteria in 15, 20 and 25 °C. Both strains showed optimum growth at 25 °C, indicating that these bacteria are psychrotrophics.

Keywords: Alcohol dehydrogenases, chiral alcohols, psychrophilic, mesophilic, oxidation.

Lista de Siglas, Abreviaturas e Símbolos

ADH: Álcool desidrogenase

CG: Cromatografia a gás

CG/DIC: Cromatografia a gás com detector de ionização por chama

CG/EM: Cromatografia a gás com detector de espectrometria de massas

CAL-B: Lipase B de *Candida antarctica*

DMF: *N,N*-dimetilformamida

ee.: excesso enantiomérico

IO-USP- Instituto de Oceanografia da Universidade de São Paulo

IV: Infravermelho

J: Constante de acoplamento (Hz)

ppm: partes por milhão

sec: secundário

rac: racêmico

RMN ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

THF: Tetra-hidrofurano

UV-vis: Ultravioleta-visível

δ: Deslocamento químico (ppm)

[α]_D: Rotação específica

Índice de Figuras

Figura 1. Diferenças de atividades entre isômeros ópticos de alguns compostos orgânicos.....	22
Figura 2. Compostos quirais de importância biológica.....	23
Figura 3. Interações que controlam a seletividade do produto formado através da utilização de reagentes quirais.....	25
Figura 4. Mecanismo de oxidação do (<i>R,S</i>)-1-feniletanol.....	31
Figura 5. Diagrama de energia de uma reação enantiosseletiva catalisada por enzima.....	35
Figura 6. Espectro de substrato de várias ADHs YADH = ADH de levedura (<i>Saccharomyce serevisiae</i>), GDH = Glicerol desidrogenase, TBADH = ADH de <i>Thermoanaerobium brockii</i> , HLADH = ADH de fígado de cavalo, HSADH = ADH de hidroxiesteróide.....	37
Figura 7. Curva de Crescimento Padrão, em um sistema fechado.....	41
Figura 8. Visão da Mata Atlântica; Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR).....	43
Figura 9. Visão da Baía do Almirantado, na Ilha Rei George (Antártica).....	45
Figura 10. Álcoois aromáticos racêmicos utilizados como substratos na avaliação enzimática em reações de oxidação enantiosseletiva e como padrões nas análises em CG.....	50
Figura 11. a) Cromatograma do (<i>R,S</i>)-1-(4-metoxifenil)-etanol com 4-metoxiacetofenona; b) Cromatograma obtido da reação do composto 9 com o	

micro-organismo HK1D9.....	60
Figura 12. a) Cromatograma do (R,S)-1-(4-metilfenil)-etanol com 4-metilacetofenona; b) Cromatograma obtido da reação do composto 8 com o micro-organismo BAL1C1.....	61
Figura 13. a) Cromatograma do (R,S)-1-(4-metilfenil)-etanol com 4-metilcetofenona; b) Cromatograma obtido da reação do composto 8 com o micro-organismo LB5D2.; c) Cromatograma obtido da reação do composto 8 com o micro-organismo LB1D2.1.....	64
Figura 14. Análise espectrofotométrica da Densidade Óptica (D.O.) da cultura de <i>Flavobacterium</i> sp. Meio de cultura mínimo (600 mL), feniletanol (1 mmol/L), agitação 160 rpm.....	75
Figura 15. Análise espectrofotométrica da Densidade Óptica (D.O.) da cultura de <i>Arthrobacter</i> sp. Meio de cultura mínimo (600 mL), feniletanol (1 mmol/L), agitação 160 rpm.....	79
Figura 16. Resumo da etapa de isolamento induzido de micro-organismos. (I) Microplaca contendo meio de cultura MCFE7. (II) Microplaca contendo meio de cultura MCBE7.....	97
Figura 17. Repique de micro-organismos em placas de Petri com auxílio de uma alça de platina.....	98
Figura 18. Resumo da etapa de avaliação do espectro de atividade enzimática enantiosseletiva dos micro-organismos, realizadas em duplicatas. (I) Micro-organismo 1. (II) Micro-organismo 2.....	99

Índice de Tabelas

Tabela 1. Classificação de micro-organismos de acordo com a temperatura de crescimento.....	40
Tabela 2. Micro-organismos isolados de amostras de solo e sedimento da Antártica.....	48
Tabela 3. Micro-organismos isolados de amostras de solo do PETAR.....	49
Tabela 4. Estudo com os micro-organismos <i>NS2D2</i> e <i>NS3D2</i> em reações de oxidação utilizando os substratos (<i>R,S</i>)- (7-12) em Etanol e DMF.....	52
Tabela 5. Estudo das concentrações dos substratos (<i>R,S</i>)-(7-12) em DMF para os micro-organismos <i>NS2D2</i> e <i>NS3D2</i>	54
Tabela 6. Avaliação da enantiosseletividade da ADH de alguns micro-organismos psicrófilicos isolados de amostras da Antártica.....	57
Tabela 7. Avaliação da enantiosseletividade da ADH dos micro-organismos na oxidação do (<i>R,S</i>)-1-(4-metilfenil)etanol.....	63
Tabela 8. Estudo com o micro-organismo <i>NS2D5</i> em reações de redução utilizando os substratos (1-6).....	66
Tabela 9. Estudo com o micro-organismo <i>NS4B1</i> em reações de oxidação utilizando os substratos (<i>R,S</i>)- (7-12).....	67
Tabela 10. Avaliação da enantiosseletividade da ADH de <i>Flavobacterium</i> sp. na oxidação do (<i>R,S</i>)-1-(4-metilfenil)etanol em diferentes temperaturas de crescimento bacteriano e tempos reacionais.....	70
Tabela 11. Crescimento da <i>Flavobacterium</i> sp. a 25 °C e avaliação da enantiosseletividade de sua ADH na oxidação do (<i>R,S</i>)-1-(4-metilfenil)etanol em diferentes temperaturas.....	72

Tabela 12. Crescimento da <i>Flavobacterium</i> sp. a 15 °C e avaliação da enantiosseletividade de sua ADH na oxidação (R,S)-1-(4-metilfenil)etanol em diferentes temperaturas.....	73
Tabela 13. Avaliação da enantiosseletividade da ADH da <i>Arthrobacter</i> sp. em diferentes temperaturas e tempos reacionais.....	77
Tabela 14. Relação dos reagentes e solventes utilizados com as respectivas procedências e grau de pureza.....	82
Tabela 15. Locais de coletas na Antártica.....	90
Tabela 16. Locais de coletas no PETAR.....	92

Índice de Esquemas

Esquema 1. Síntese assimétrica via reagentes quirais.....	24
Esquema 2. Uso de BINAL- H como redutor quiral.....	26
Esquema 3. Uso do catalisador Noyori na redução de cetona.....	27
Esquema 4. Redução assimétrica biocatalítica de compostos carbonílicos com [NAD(P)H] na presença de ADH.....	31
Esquema 5. Sistemas de reciclagem de co-fator nicotinamida (a) Uma única enzima realiza ambas as reações: para o substrato e co-substrato (b) Duas enzimas envolvidas no processo: uma para o substrato e outra para o co-produto..	33
Esquema 6. Exemplo de uma reação de desracemização.....	34
Esquema 7. Exemplo de uma reação de uma resolução cinética enzimática via oxidação com reciclagem da cetona.....	34
Esquema 8. Reação de oxidação enantiosseletiva do (R,S)-1-(fenil)etanol e derivados na presença de micro-organismos.....	51
Esquema 9: Reação de oxidação do (R,S)-1-(4-metoxifenil)etanol catalisada por ADH.....	59
Esquema 10. Reação de desracemização com <i>Flavobacterium</i> sp.....	71
Esquema 11: Reação de desracemização com <i>Arthrobacter</i> sp.....	78

Sumário

1. Introdução	21
1.1. Álcoois quirais	22
1.2. Biocatálise	27
1.2.1. Vantagens e desvantagens dos biocatalisadores	28
1.2.2. Reações catalisadas por álcool desidrogenase (ADH)	30
1.2.3. Fontes de álcool desidrogenase	36
1.3. Busca de novos micro-organismos	37
1.3.1. Álcool desidrogenases provenientes de micro-organismos psicrófilos e mesófilos	42
2. Objetivos	46
2.1. Objetivo geral	46
3. Resultados e Discussão	47
3.1. Coleta de solo e sedimento	47
3.2. Isolamento induzido de micro-organismos	47
3.2.1. Indução de crescimento de micro-organismos (técnica de enriquecimento)	47
3.3. Síntese e separação enantiomérica dos álcoois racêmicos via cromatografia gasosa (CG)	50
3.4. Avaliação da atividade enzimática enantiosseletiva (Álcool desidrogenase) dos micro-organismos	50
3.4.1. Estudo da influência do tipo de co-solvente na reação de oxidação	52
3.4.2. Estudo da influência da concentração dos substratos na reação de	

oxidação.....	54
3.4.3. Avaliação enzimática de micro-organismos mesofílicos.....	62
3.5. Caracterização taxonômica de micro-organismos.....	68
3.6. Otimização das reações de oxidação enantiosseletiva utilizando a <i>Flavobacterium</i> sp.....	68
3.7. Otimização das reações de oxidação enantiosseletiva utilizando a <i>Arthrobacter</i> sp.....	76
4. Conclusões.....	80
5. Parte Experimental.....	82
5.1. Solventes e reagentes.....	82
5.2. Materiais e métodos.....	83
5.2.1. Materiais e equipamentos que foram utilizados.....	83
5.3. Obtenção dos álcoois racêmicos.....	84
5.3.1. Preparo dos alcoóis secundários derivados do (<i>R,S</i>)-1-(fenil)etanol 7-12	84
5.4. Isolamento induzido de micro-organismos de solo.....	89
5.4.1 Preparo da solução tampão fosfato utilizada nas reações biocatalisadas.....	95
5.4.2. Preparo da solução do indutor.....	95
5.4.3. Preparo das soluções dos álcoois racêmicos.....	95
5.5. Estudo da influência do tipo de co-solvente na reação de oxidação.....	98
5.6. Avaliação da atividade enzimática (ADH) dos micro-organismos.....	100
5.6.1. Análise das reações de biocatálise.....	101
5.6.2. Avaliação das reações de biocatálise.....	101
5.6.3. Atribuição da configuração absoluta dos álcoois.....	101

5.7. Caracterização taxonômica de micro-organismos.....	102
5.8. Otimização das reações de oxidação da <i>Flavobacterium</i> sp. e <i>Arthrobacter</i> sp.....	102
5.8.1. Crescimento da <i>Flavobacterium</i> sp. a 15 e 25 °C em diferentes temperaturas reacionais.....	104
5.8.2. Determinação da curva de crescimento da <i>Flavobacterium</i> sp. e <i>Arthrobacter</i> sp.....	104
6. Referências Bibliográficas.....	106

1- INTRODUÇÃO

Nos últimos anos têm-se aumentado o interesse por substâncias enantiomericamente puras. Essa tendência pode ser observada tanto na comunidade acadêmica quanto no setor industrial. Atualmente a maior demanda por substâncias enantiomericamente puras provém principalmente das indústrias farmacêuticas, alimentícias, perfumarias e indústrias de defensivos agrícolas (THALL, 1996; TANG, ZHAO 2009; WARD, BAKER 2008). Uma vez que, estes segmentos industriais usam principalmente matérias-primas de origem sintética, pode-se constatar como resposta a esta demanda, um grande desenvolvimento de metodologias, visando à preparação destas substâncias. Esta demanda está intrinsecamente ligada ao número crescente de estudos relacionados com as propriedades biológicas de novos compostos químicos e a quiralidade molecular (SHELDON, 1993).

A quiralidade é uma designação associada à Química, mas simultaneamente é um fenômeno que se manifesta principalmente em todos os seres vivos, em que os compostos quirais interagem com os sítios ativos receptores destes seres, portanto, os estereoisômeros podem ter funções diferentes no organismo (AGRANAT *et al.* 1994; NATARAJAN, BASAK 2009). Vários exemplos desta relação estão mostrados na Figura 1.

Figura 1: Diferenças de atividades entre isômeros ópticos de alguns compostos orgânicos.

O limoneno é um exemplo clássico da diferença de características em relação à configuração. Enquanto o enantiômero (*R*) apresenta o odor de laranja, o enantiômero (*S*) apresenta o odor de limão. A atividade de fármacos também depende da quiralidade: a talidomida causou a má formação de milhares de fetos, quando administrada, na década de 1960, a várias gestantes. Descobriu-se que apenas o enantiômero (*S*) causava a má formação congênita, enquanto que o (*R*) não era prejudicial. No caso do ibuprofeno, apenas o enantiômero (*S*) possui atividade, sendo este fármaco comercializado na forma racêmica, já que o outro enantiômero não é tóxico. O enantiômero (*S*) do propanolol possui uma eficiência 100 vezes maior que o enantiômero (*R*). Dessa forma o propanolol mais ativo (*S*) é administrado em doses menores (HALGAS, 1992).

A preparação de compostos quirais pode ser feita utilizando substratos quirais de fontes naturais (por exemplo: aminoácidos, monossacarídeos, terpenos, dentre outros) ou realizando uma reação estereoespecífica em certa etapa de síntese quando são utilizados substratos opticamente inativos (HALGAS, 1992).

Há um crescente desenvolvimento tecnológico na produção de substâncias com pureza enantiomérica elevada, entre estes métodos a obtenção de álcoois quirais enantiomericamente puros têm recebido grande interesse pela comunidade científica.

1.1- ÁLCOOIS QUIRAIS

Os álcoois quirais não são geralmente conhecidos como precursores quirais naturais usuais, entretanto, eles podem servir como intermediários ou como blocos de construção quiral (“chiral building blocks”) na síntese de diversos compostos quirais de importância biológica (Figura 2) (TEMBA *et al.* 2003). Como exemplos podem ser citados: (S)-(-)-3-hidróxi-butanoato de etila (I), um dos álcoois quirais mais utilizados como precursor quiral em síntese orgânica; o (S)-(+)-sulcatol (II), importante insumo para a síntese de outros produtos naturais; (R)-lavandulol (III), importante aditivo na indústria de perfumes; (R)-(+)-recifeiolídeo (IV), macrolídeo natural isolado do *Cephalosporum recifei*, (R,R)-(-)-grahamimicina (V), macrodiolídeo de atividade antibiótica reconhecida (TEMBA *et al.* 2003).

Figura 2: Compostos quirais com importância biológica.

A preparação de álcoois quirais pode ser efetuada por diferentes vias sintéticas (ELIEL *et al.* 1994; KAGAN, 1982; HO, 1992; NOYORI, 1992; NOYORI 1994a; NOYORI 1994b; SINGH, 1992). O método amplamente usado consiste na reação de um composto carbonílico pró-quiral (R_1COR_2) com um agente redutor quiral, por exemplo, a alpinoborana (Y) (Esquema 1), que poderá conferir enantiosseletividade a reação (MIDLAND, 1989; BROWN, RAMACHANDRAN 1992; BURKHARDT, MATOS 2006).

R_L = Substituinte volumoso (*n*-hexila, Ph)

R_S = Substituinte pouco volumoso (Me, CH_2Br)

Esquema 1: Síntese assimétrica via reagentes quirais (MIDLAND, 1989; BROWN, 1992).

A redução da carbonila ocorre de maneira enantiosseletiva, pois há uma diferença de energia entre os estados de transições (ET) formados durante a transferência do hidreto pela face *re* em relação à face *si*, conforme mostrado na Figura 3.

Figura 3: Interações que controlam a seletividade do produto formado através da utilização de reagentes quirais (MIDLAND, 1989; BROWN, 1992).

As interações mostradas (ET_{face si} e ET_{face re}), referente à adição do hidreto pelas diferentes faces da carbonila, apresentam energias diferentes. Isso ocorre porque a energia da interação repulsiva entre a metila da alpinoborana e o grupo R_L ou R_S da cetona (nos respectivos estados de transição) é significativamente maior quando a metila está próxima do grupo mais volumoso (R_L). Analisando esse exemplo, temos que essa reação ocorre, mais favoravelmente, através do ataque do hidreto pela face *re*, levando à formação de um ET de menor energia (ET_{face re}), e, consequentemente, levando preferencialmente ao produto de forma enantiosseletiva (MIDLAND, 1989; BROWN, RAMACHANDRAN 1992).

Dentre os diversos reagentes quirais existentes para a obtenção de álcoois quirais a partir de cetonas pró-quirais tem-se, por exemplo, complexo de Alumínio e Rutênio.

- **Obtenção de álcoois quirais por uso de redutores quirais de alumínio**

O derivado binaftílico conhecido como BINAL-H [redutor assimétrico formado *in situ* pela reação do auxiliar quiral (*R*)- ou (*S*)- 1,1'-bis-2,2'-naftol, ambos comerciais, com hidreto de lítio e alumínio em tetra-hidrofurano (THF)] está entre os derivados de organo-alumínio mais utilizados na redução de compostos carbonílicos (Esquema 2), fornecendo excelentes resultados de 95-100 % de excesso enantiomérico (TOMIOKA, 1990).

Esquema 2: Uso de BINAL- H como redutor quiral.

- **Uso de complexos de rutênio**

O catalisador A, (Esquema 3) é bem conhecido por sua habilidade em reduzir cetonas por hidrogenação direta com elevada enantiosseletividade (ADAIR, WILLIAMS, 2005; NOYORI, 2001).

Esquema 3: Uso do catalisador Noyori na redução de cetona.

Complexos de metais de transição com ligantes quirais são bastante utilizados como catalisadores. No entanto, o custo elevado e a toxicidade dos metais são os principais obstáculos para sua utilização.

Diante da importância da “tecnologia quiral” e da preocupação ambiental, à biocatálise apresenta-se como ferramenta na obtenção de compostos opticamente puros, pois está mais intimamente relacionada à “química verde”.

1.2- BIOCATÁLISE

A biocatálise consiste na utilização de enzimas que são produzidas por seres vivos com a finalidade de catalisar reações químicas. Estes biocatalisadores (enzimas) podem ser empregados na forma purificada, na forma imobilizada em superfícies poliméricas (por exemplo, polímero de acrílico) ou ainda, na forma natural a partir das células de micro-organismos para a catálise e transformação de compostos naturais ou xenobióticos. As reações de biocatálise podem ser realizadas com:

a) **células em crescimento**: os substratos são adicionados ao meio de cultura simultaneamente à inoculação ou durante a fase de crescimento do micro-organismo (FABER, 2004);

b) **células em repouso**: o micro-organismo é cultivado até seu crescimento ótimo, a biomassa é filtrada ou centrifugada e ressuspensa em soluções ou solventes adequados, com posterior adição de substrato (FABER, 2004);

c) **enzimas imobilizadas**: as enzimas estão ligadas a suportes inertes insolúveis, por meios físicos ou químicos (FABER, 2004);

d) **enzimas isoladas**: as enzimas são adicionadas diretamente no meio reacional; dependendo da enzima há necessidade da adição de co-fator (FABER, 2004).

Os biocatalisadores podem ser utilizados para produzir uma variedade de produtos para a indústria de alimentos (pães, queijos, cervejas, adoçantes), produtos farmacêuticos (antivirais e descongestionantes), cosméticos, aromas, fragrâncias, defensivos agrícolas, agroquímicos e materiais fotográficos (PANKE *et al.* 2004; SIMEO, SINISTERRA 2009).

1.2.1- VANTAGENS E DESVANTAGENS DOS BIOCATALISADORES

Os biocatalisadores apresentam vantagens como:

- . **São catalisadores muito eficientes**: catalisam reações freqüentemente $10^6 - 10^{14}$ vezes mais rápido do que a correspondente reação não catalisada, que é um valor bastante acima dos obtidos através de catalisadores comuns (FERREIRA, 2002), podendo transformar de 100 a 1000 moléculas de substrato em produto por minuto de reação.
- . **São ecologicamente corretos**: não geram resíduos de alta toxicidade e são

altamente biodegradados quando expostos ao meio ambiente.

. **Atuam sob condições reacionais suaves:** efetuam a catálise na faixa de 5-8 de pH e em temperaturas de 20 °C a 40 °C sob pressão ambiente (1 atm).

. **Podem catalisar uma ampla faixa de reações químicas.**

. **São catalisadores seletivos:** Alguns biocatalisadores podem realizar reações difíceis de ocorrer por métodos tradicionais em química orgânica. Isto se deve a aspectos de seletividade das reações enzimáticas (FABER, 2004). São elas:

- **Quimiosseletividade-** as enzimas atuam com grupos funcionais específicos, conseqüentemente outras funcionalidades permanecem inalteradas.

- **Regiosseletividade-** as enzimas podem distinguir entre grupos funcionais idênticos localizados em regiões diferentes de uma mesma molécula.

- **Enantiosseletividade e Diastereosseletividade-** as enzimas são catalisadores quirais, conseqüentemente o sítio ativo poderá reconhecer moléculas quirais e pró-quirais:

a- Na seletividade enantiomérica (ou diastereoisomérica) a enzima é capaz de diferenciar um enantiômero (ou diastereoisômero) do outro.

b- Na seletividade estereotópica há o reconhecimento pela enzima de grupos enantiotópicos (ou diastereotópicos) dentro da mesma molécula.

Estas últimas propriedades demonstram a especificidade de uma enzima, considerada a mais importante de suas capacidades, pois pode promover importantes sínteses (quirais) assimétricas.

As enzimas são catalisadores privilegiados na síntese de moléculas com atividade biológica, em conseqüência de sua regiosseletividade e estereoespecificidade, que em muitas vezes não tem paralelo na síntese química (CABRAL *et al.* 2003).

Algumas desvantagens apresentadas pelas reações biocatalisadas:

- **São sensíveis a condições energéticas:** requerem sempre condições brandas de operação, exceção os sistemas termoestáveis.
- **Algumas enzimas podem possuir custos elevados;**
- **Enzimas possuem atividade máxima em água:** a maioria dos substratos orgânicos é insolúvel ou pouco solúvel em água.
- **Muitas enzimas necessitam de co-fatores:** os co-fatores são caros e de difícil recuperação. O alto custo dos co-fatores faz com que sejam utilizados em quantidades catalíticas e reciclados *in situ*.

A utilização de enzimas isoladas, especialmente as intracelulares, que requerem a adição de co-fatores, torna as reações biocatalisadas menos atrativas do ponto de vista econômico. Por outro lado, as reações com células íntegras de micro-organismos, representam uma alternativa mais acessível, uma vez que seu sistema enzimático contém os co-fatores necessários, bem como os caminhos metabólicos para a sua regeneração (NAKAMURA *et al.* 1991).

1.2.2- REAÇÕES CATALISADAS POR ÁLCOOL DESIDROGENASE (ADH)

Faremos neste item uma breve descrição da enzima (ADH) utilizada como catalisador nas reações empregadas neste trabalho.

As álcoois desidrogenases são classificadas como EC.1.1.1.1, sendo responsáveis por catalisar a redução de compostos carbonílicos a álcoois, e oxidação de álcoois aos compostos carbonílicos, (SCHOMBURG, SALZMANN, 1990) Esquema 4.

R= Alquila, arila, hidrogênio

Esquema 4: Redução assimétrica biocatalítica de compostos carbonílicos com [NAD(P)H] na presença de ADH.

Para exibirem atividades catalíticas, as álcool desidrogenases necessitam de co-fatores nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) ou nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) para reação de redução e NAD^+ ou $NADP^+$ para reação de oxidação.

O papel da ADH é proporcionar uma interação do substrato com o co-fator de forma termodinamicamente favorável para que a reação ocorra. Na reação de oxidação de álcool o $NAD(P)^+$ não é capaz de receber o hidreto do álcool sem a presença da enzima (Figura 4) (BRUICE, 1998).

Figura 4: Mecanismo de oxidação do (R,S)-1-(fenil)etanol.

A álcool desidrogenase atua coordenando o (R,S)-1-(fenil)etanol e o NAD(P)⁺ ao seu sítio ativo, em que a enantiosseletividade vai depender da interação dos enantiômeros *R* e *S* do feniletanol com a álcool desidrogenase, onde B é um resíduo de aminoácido básico dessa enzima (Figura 4).

Como essas reações necessitam de co-fatores em quantidades estequiométricas esses processos têm sido realizados com sistemas de reciclagem de co-fatores (ROZZELL, 1999; NAKAMURA *et al.* 2003).

No caso da bio-redução de cetonas a reciclagem dos co-fatores pode ocorrer por um sistema que faz uso de uma única enzima, a qual transforma substrato e co-substrato (Esquema 5a). Este co-substrato geralmente é um álcool secundário de baixo custo (2-propanol). O grande desafio é encontrar uma enzima que realize reações de oxidação/redução simultaneamente para substrato/co-substrato. A maior desvantagem desse sistema é a possível inibição causada pelo co-substrato à ação catalítica da enzima (KROUTIL, 2004b). Para contornar essa dificuldade, a reciclagem de co-fatores pode ser realizada por meio de uma segunda (e de preferência irreversível) reação catalisada por outra enzima (Esquema 5 b).

O benefício adicional dos sistemas de substrato-acoplado é que o mesmo pode ser usado tanto para reação de oxidação quanto de redução (KROUTIL, 2004b).

Esquema 5: Sistemas de reciclagem de co-fator nicotinamida (a) Uma única enzima realiza ambas as reações: para o substrato e co-substrato (b) Duas enzimas envolvidas no processo: uma para o substrato e outra para o co-produto (KROUTIL, 2004b).

Os substratos naturais das ADHs são álcoois semelhantes ao etanol, lactato e glicerol e seus correspondentes compostos carbonílicos.

Como as álcool desidrogenases são capazes de oxidar uma variedade de substratos alcoólicos, elas foram identificadas, em particular em termos de sua especificidade aos substratos.

Os álcoois secundários na forma racêmica podem ser convertidos em sua forma enantiomericamente pura via estereoinversão. No Esquema 6, encontra-se um exemplo desse processo catalisado por ADH. Na etapa 1, um enantiômero de uma mistura racêmica de um álcool secundário é seletivamente oxidado à cetona correspondente, enquanto o outro se mantém inalterado. Na etapa 2, a cetona intermediária é reduzida por outra ADH levando a formação do álcool com a mesma configuração daquele enantiômero que se manteve inalterado na etapa 1. Este processo todo pode levar a formação de um único enantiômero a partir de uma mistura racêmica, podendo chegar a rendimento igual a 100 %.

Esquema 6: Exemplo de uma reação de desracemização.

Outro exemplo de obtenção de álcoois enantiomericamente puros é através de resolução cinética enzimática via oxidação enantiosseletiva, quando os micro-organismos não possuem enzimas (ADH) eficientes para a redução da cetona produzida na etapa de oxidação, dessa forma, ao final pode-se chegar a um álcool enantiomericamente enriquecido mais a cetona como subproduto. Esta cetona pode ser recuperada e reutilizada nesse mesmo processo após a redução química (Etapa 2, Esquema 7).

Esquema 7: Exemplo de uma reação de uma resolução cinética enzimática via oxidação com reciclagem da cetona.

A ADH pode interagir diferentemente com os enantiômeros de um substrato racêmico. Um dos enantiômeros acomoda-se melhor no sítio ativo da enzima, e então, este é convertido ao produto com maior velocidade, resultando numa resolução. Essa diferenciação pode ser explicada mais detalhadamente por razões termodinâmicas, Figura 5 (FABER, 1997a).

Figura 5: Diagrama de energia de uma reação enantiosseletiva catalisada por enzima.

A figura 5 mostra uma reação enantiosseletiva na qual dois substratos **R** e **S** (par de enantiômeros) competem pelo sítio ativo da enzima. Devido ao ambiente quiral do sítio ativo da enzima, complexos diastereoisoméricos enzima-substrato **[E-(R)]** e **[E-(S)]** são formados e estes contêm diferentes valores de energia livre (ΔG) para seus respectivos estados de transição **[E-(R)][‡]** e **[E-(S)][‡]**. O resultado é uma diferença na energia de ativação ($\Delta G^\ddagger$) para ambos os enantiômeros. Como consequência, um enantiômero irá ser transformado mais rapidamente que o outro. O valor de $\Delta\Delta G^\ddagger$ é uma medida direta para a seletividade da reação, pois este determina a pureza óptica do produto. Uma diferença de $\Delta\Delta G^\ddagger$ de 2,17 kcal/mol leva a um considerável excesso do produto enantiomericamente enriquecido (~ 90 %).

No entanto, quando uma alta pureza enantiomérica é desejada, o valor de $\Delta\Delta G^\ddagger$ deve ser consideravelmente elevado ($> 4,50$ kcal/mol) (FABER, 1997a).

A resolução cinética enzimática de um racemato consiste em separar enantiômeros existentes nessa mistura, portanto o rendimento será no máximo 50 %. Em um caso ideal, a diferença das velocidades de reação de ambos os enantiômeros deve ser alta o suficiente para que apenas um deles seja convertido rapidamente e o outro permaneça inalterado no tempo reacional apropriado (FABER, 1997a).

1.2.3- FONTES DE ÁLCOOL DESIDROGENASE

As álcool desidrogenases estão presentes em inúmeros organismos, pois participam de uma ampla variedade de processos celulares, como por exemplo, metabolismo de açúcares e lipídios. Devido à ocorrência natural dessas enzimas, as reações de biocatálise que necessitam desses catalisadores podem ser realizadas utilizando células de micro-organismos ou plantas.

Álcool desidrogenases comercialmente disponíveis originam-se de fígado de cavalo (HLADH) e micro-organismos, como *Thermoanaerobium brockii* (TBADH), levedura de pão (*Saccharomyces cerevisiae*, YADH), *Cândida boidii*, *Candida parapsilosis*, *Rhodococcus erythropolis*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus kefir* (KROUTIL *et al.* 2004a).

Os micro-organismos mais utilizados em reações de biorredução de cetonas na síntese de álcoois quirais são as leveduras (CSUK, GLANZER, 1991; RODRIGUES, MORAN, 2001). O micro-organismo *Rhodococcus ruber* tem sido eficientemente utilizado na oxidação de álcoois secundários. (VOSS *et al.* 2007).

Com o objetivo de visualizar a preferência usual de uma ADH, a Figura 6

mostra os substratos comumente empregados nas reações de oxidação catalisadas por esta enzima (KROUTIL *et al.* 2004a).

Figura 6: Espectro de substrato de várias ADHs YADH = ADH de levedura (*Saccharomyce serevisiae*), GDH = Glicerol desidrogenase, TBADH = ADH de *Thermoanaerobium brockii*, HLADH = ADH de fígado de cavalo, HSADH = ADH de hidroxiesteroide (KROUTIL *et al.* 2004a).

1.3- BUSCA DE NOVOS MICRO-ORGANISMOS

O isolamento de micro-organismos é muito importante para estudos de transformações microbianas de compostos químicos e exploração de novas enzimas, pois existe uma ampla diversidade biológica. Pouco se conhece sobre a especificidade de muitas enzimas frente a diferentes substratos, quando comparadas com os reagentes químicos comuns utilizados em síntese orgânica. As enzimas parecem ter evoluído no sentido de catalisar reações específicas com alta eficiência e algumas vezes perdem a especificidade para diversos substratos. Além disso, a velocidade das reações enzimáticas é muito afetada pelos substituintes vizinhos a função orgânica que se deseja transformar. Sendo assim, não é possível prever se um composto químico não natural será um bom substrato para a maioria

das enzimas. Portanto, a triagem de micro-organismos para busca de enzimas eficientes para uma determinada reação é constantemente estudada (ASANO, 2002; BAUER *et al.* 1994; CARDENAS *et al.* 2001).

Além disso, os recentes sucessos nas reações de biocatálise estão relacionados, também, às descobertas de micro-organismos e enzimas capazes de catalisar novas reações (FABER, KROUTIL, 2005).

Uma das formas de seleção de novos biocatalisadores/enzimas é a triagem (*screening*) em coleções de micro-organismos catalogados e identificados. Entretanto, existem outras técnicas empregadas para o isolamento de micro-organismos, seja para estudos de diversidade biológica ou de busca por produtores de enzimas de interesse biotecnológico. Por exemplo, a técnica de enriquecimento de cultura de micro-organismos é utilizada para isolar micro-organismos com características de crescimento especiais. Alguns micro-organismos crescem mais rápido que outros, em meio com quantidade limitada de nutrientes, alta temperatura, valores extremos de pH, etc. Micro-organismos que crescem mais rápido que outras espécies tornam-se dominantes depois de várias transferências de culturas. Uma outra metodologia de isolamento de micro-organismo utilizada é a técnica de aclimatização ou isolamento induzido. Essa técnica é aplicada quando um composto não natural ou tóxico é usado como substrato (composto de indução de crescimento). Usualmente leva-se mais tempo para isolar micro-organismos utilizando esta técnica. Uma adaptação para um meio sintético contendo um composto químico alvo, freqüentemente, resulta no isolamento de micro-organismos contendo novas enzimas. (NI, XU, 2002; LAYH *et al.* 1997; MIYAMOTO *et al.* 2004).

Geralmente as enzimas têm sido estudadas de micro-organismos mesófilos e menos comumente a partir de extremófilos (psicrofílicos, psicrotróficos, termofílicos e

termotróficos). No entanto, nos últimos anos tem havido um interesse em micro-organismos psicrófilos e psicrotróficos e suas enzimas adaptadas ao frio.

Os micro-organismos psicrófilos são organismos que tem a sua temperatura ideal de crescimento a uma temperatura abaixo de 15 °C, mas não são capazes de crescer em temperatura superior a 20 °C. Já os psicrotróficos crescem bem em temperaturas próximas a 0 °C, mas possuem taxas de crescimento maiores entre 20 °C a 40 °C, sendo esta uma característica específica destes micro-organismos. Estes micro-organismos produzem enzimas capazes de suportar a difícil situação causada pelas baixas temperaturas que os cercam, como a redução das velocidades reacionais e o aumento da viscosidade do meio. Em muitos casos, a adaptação do micro-organismo é conseguida através de uma redução na energia de ativação de cada reação química catalisada por uma determinada enzima, levando a uma alta eficiência catalítica, que possivelmente é originada de um aumento na flexibilidade de uma determinada região da enzima, ou de sua estrutura total. Esta flexibilidade é responsável pela fraca estabilidade térmica das enzimas adaptadas ao frio (GERDAY *et al.* 2000; FELLER, GERDAY 1997a; ZHAO *et al.* 2004).

Os micro-organismos mesofílicos, psicrófilos e termofílicos podem adaptar-se a ambientes diferentes, nos quais fatores como pH, temperatura, pressão e concentração de sal ultrapassam os valores considerados como padrões para a maioria dos seres vivos (LASA, BERENGER, 1993). Dentre esses fatores, a temperatura é o que mais influencia a função das biomoléculas e a manutenção das estruturas biológicas. Para todos os micro-organismos existem três temperaturas fundamentais: *temperatura mínima* abaixo da qual não há crescimento; *temperatura máxima* acima da qual não há crescimento; *temperatura ótima*, onde o crescimento é máximo. A temperatura ótima de crescimento microbiano varia com o tipo de

micro-organismo (Tabela 1) (GOUNO, 1986; GRIFFITHS, 1990; ADHIKARI, SINGHAL, 1992).

Tabela 1: Classificação de micro-organismos de acordo com a temperatura de crescimento.

Micro-organismos	Temperatura Mínima (°C)	Temperatura Ótima (° C)	Temperatura Máxima (° C)
Psicrofílicos	-10	15	20
Psicrotróficos	0	20	40
Mesofílicos	30	32	60
Termotróficos	25	45	75
Termofílicos	30	50	80

O crescimento dos micro-organismos pode ser mensurado por diferentes técnicas (BROCK, MADIGAN 1991; CAPPUCCINO, SHERMAN, 1996; MADIGAN *et al.* 2003):

Curva de crescimento: é frequentemente acompanhado com base na curva que representa o crescimento de uma população de um determinado micro-organismo, em sistema fechado. Neste caso, um meio de cultura líquido contendo os nutrientes necessários ao crescimento celular é inoculado com uma população de células viáveis do micro-organismo e incubado em condições ambientais favoráveis à sua multiplicação. Se acompanharmos o crescimento da população de células ao longo do tempo e representarmos graficamente o logaritmo do número de células por unidade de volume (ou, da Densidade Óptica da cultura, D.O, ou da concentração da Biomassa Microbiana) em função do tempo, obter-se-á uma curva característica, como mostra Figura 7, que exhibe as várias fases do crescimento microbiano (BROCK, MADIGAN 1991; CAPPUCCINO, SHERMAN, 1996; MADIGAN *et al.* 2003).

Figura 7: Curva de Crescimento Padrão, em um sistema fechado (MADIGAN *et al.* 2003).

Contagem total de células: esta metodologia envolve a contagem direta das células em um microscópio, seja de amostras fixadas e coradas em lâminas ou analisadas a fresco, utilizando-se *câmaras de contagem* (MADIGAN *et al.* 2003). Há também os contadores eletrônicos (do tipo Coulter) que podem ser empregados na contagem de células microbianas.

Contagem de viáveis: Procedimento também conhecido como contagem em placa, que estima o número de células viáveis (isto é, capazes de se reproduzir) em uma amostra. Esta metodologia envolve a coleta de alíquotas de uma cultura microbiana em diferentes tempos de crescimento, as quais são, então, inoculadas em meio sólido. Após a incubação, geralmente por uma noite, o número de colônias é contado. Como uma colônia normalmente é originada a partir de um organismo, o total de colônias que se desenvolvem no meio corresponde ao número de células viáveis presentes na alíquota analisada (BROCK, MADIGAN 1991; CAPPUCCINO, SHERMAN, 1996; MADIGAN *et al.* 2003).

Massa de células: pode ser determinada a partir da estimativa do peso seco ou do peso úmido de uma cultura. Este tipo de procedimento é realizado quando não é necessário determinar o número preciso de células (BROCK, MADIGAN 1991;

CAPPUCCINO, SHERMAN, 1996; MADIGAN *et al.* 2003).

Turbidimetria: quantificação em espectrofotômetro ou colorímetro a 660 nm, uma vez que neste comprimento de onda, a cor geralmente parda dos meios de cultura não interfere com os resultados. Neste comprimento, a absorção de luz por componentes celulares corados é desprezível, mas, se necessário, outros comprimentos de onda podem ser usados. Embora a análise turbidimétrica seja menos sensível, é de rápida e fácil execução, não destruindo a amostra. Entretanto, não permite a determinação de células viáveis (BROCK, MADIGAN 1991; CAPPUCCINO, SHERMAN, 1996; MADIGAN *et al.* 2003).

Análises químicas: A partir da quantificação de proteínas ou de nitrogênio, ou por meio da análise de diferentes atividades metabólicas (BROCK, MADIGAN 1991; CAPPUCCINO, SHERMAN, 1996; MADIGAN *et al.* 2003).

1.3.1- ÁLCOOL DESIDROGENASES PROVENIENTES DE MICRO-ORGANISMOS PSICROFÍLICOS E MESOFÍLICOS

Dentre os ambientes mesofílicos e psicofílicos foram selecionados para estudo o Parque Estadual Alto do Ribeira (PETAR, Figura 8) e a Antártica (Região da Baía do Almirantado na Ilha Rei George, (Figura 9) como alvo de coleta de solo e sedimento.

O Parque Estadual Alto do Ribeira, região de Mata Atlântica, São Paulo é uma região de Mata Atlântica, sendo uma área de preservação ambiental que abriga várias formas de vida, incluindo milhares de espécies de animais, plantas e micro-organismos, muita delas ainda não descritas pela Ciência, que vivem nas encostas das montanhas, nos rios, nas cavernas, nos campos de altitude e nos outros ambientes que formam esta região e seus ecossistemas associados. O clima desta

região é o temperado úmido, devido à mata a temperatura média anual fica em torno de 21 °C, com máximas entre 24 °C e 27 °C, e mínimas entre 15 °C e 18 °C (BARBIERI,1993). No PETAR, encontram-se os micro-organismos mesofílicos. As enzimas provenientes destes micro-organismos são atualmente as mais intensamente estudadas. No Brasil existe pouco estudo com álcool desidrogenases em reações de oxidação enantiosseletiva de álcoois, sendo assim, esta região foi selecionada para busca de álcool desidrogenases para este estudo.

Figura 8: Visão da Mata Atlântica; Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR).

O continente antártico e as ilhas que o cercam perfazem uma área aproximada de 14 milhões km², que corresponde cerca de 10 % da superfície da Terra. Além disso, ele é inteiramente circundado pelo oceano Antártico ou Austral e é a maior área selvagem natural que resta no planeta.

A Antártica é o continente mais frio, mais seco e com a maior média de altitude e maior índice de ventos fortes do planeta, por apresentar a temperatura mais baixa da Terra (-89,2 °C). A temperatura média na costa, durante o verão, é de

apenas -10 °C. As formas de vida existentes neste continente evoluíram sob as condições de frio, vento, gelo e neve. O isolamento desse continente pelas massas de água e as condições especiais condicionaram o estabelecimento de espécies endêmicas. A vida está restrita a uma estreita faixa, próxima ao mar, que permanece livre de gelo durante o verão, e se restringe a pequenos invertebrados, micro-organismos, e uma flora abundante de líquens e musgos, além de fungos, algas e poucas gramíneas (WYNN, EDWARDS, 2000).

Os micro-organismos que habitam essas regiões são os psicrófilicos e os psicrotróficos, poucos estudados até o momento. As enzimas provenientes de micro-organismos psicrófilicos têm uma alta estabilidade, flexibilidade e atividade catalítica específica, que as tornam potencialmente únicas para inúmeras aplicações biotecnológicas (GERDAY *et al.* 2000; FELLER, GERDAY 1997a; ZHAO *et al.* 2004).

O uso de álcool desidrogenases como catalisadores de reações químicas enantiosseletivas que não necessitam de aquecimento é de grande importância, tendo em vista a economia energética desse tipo de processo. Tradicionalmente as reações catalisadas por álcool desidrogenases de micro-organismos mesófilicos e catalisadores químicos são realizadas sob temperaturas que variam de 30-60 °C. Sendo assim, essas reações químicas precisam de uma fonte de aquecimento, consequentemente um gasto energético adicional. Portanto, estudos de bioprospecção de enzimas psicrófilicas podem nos levar a novas enzimas com alta atividade catalítica.

Figura 9: Visão da Baía do Almirantado, na Ilha Rei George (Antártica).

2- OBJETIVOS

2.1- OBJETIVO GERAL

Devido a grande importância de álcool desidrogenases e álcoois quirais em síntese orgânica, nesse projeto realizou-se a busca de álcool desidrogenases de origem microbianas, isolados de amostras de solo e sedimento, para aplicação em reações de oxidação enantiosseletiva de álcoois secundários.

2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Realizar coletas de amostras de solo do Parque Estadual Turístico do Alto do Ribeira (PETAR) e de solo/sedimento da Baía do Almirantado na Ilha Rei George (Antártica). Nesse trabalho tivemos acesso a amostras de solo de região tropical e amostras de solo e sedimentos de região polar. Nesse último caso estávamos interessados em isolar micro-organismos/enzimas psicrófilicos/psicrótróficos.

b) Realizar o isolamento induzido de micro-organismos com a atividade enzimática desejada, álcool desidrogenase.

c) Avaliar o espectro de atividade enzimática dos micro-organismos isolados.

d) Realizar a caracterização taxonômica dos micro-organismos com excelente desempenho na reação de oxidação enantiosseletiva.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- COLETA DE SOLO E SEDIMENTO

Foram coletadas 23 amostras de solos, 7 de sedimentos marinho e 6 de sedimentos lacustre na Antártica. No PETAR foram coletadas 20 amostras de solo.

3.2- ISOLAMENTO INDUZIDO DE MICRO-ORGANISMOS

3.2.1- INDUÇÃO DE CRESCIMENTO DE MICRO-ORGANISMOS (TÉCNICA DE ENRIQUECIMENTO)

Para o isolamento dos micro-organismos foi utilizada a técnica de enriquecimento com um composto orgânico, o (*R,S*)-1-(fenil)etanol. Este composto foi adicionado ao meio de cultura utilizado para o crescimento dos micro-organismos. O uso deste meio pode resultar no isolamento de micro-organismos contendo novas álcool desidrogenase, que pode ter sido produzida durante o seu.

Com esta técnica foram isolados um total de 232 colônias de micro-organismos psicrófilicos/psicrótróficos e 130 de mesófilicos, sendo 192 colônias isoladas nos meios de cultura MCBE7 e as outras 170 dos meios de culturas MCFE7 (Tabelas 2 e 3). Para determinar a pureza das colônias, inicialmente, fez-se uma análise morfológica, no qual foi avaliado o tamanho, forma e cor das colônias e das células através da microscopia óptica (aumento de 1000 X).

Tabela 2: Micro-organismos isolados de amostras de solo e sedimento da Antártica

Amostras	Micro-organismos
BAL1	BAL1C1, BAL1C2, BAL1C3, BAL1C4, BAL1C5, BAL1C6, BAL1D1
BAL2	BAL2C1, BAL2C2, BAL2C3, BAL2D1
BAL3	BAL3C1, BAL3C2, BAL3C3, BAL3C4, BAL3D1, BAL3D2, BAL3D3, BAL3D4
YP	YPC1, YPD1, YPD2, YPD3, YPD4
IPA	IPAC1, IPAC2, IPAC3, IPAC4, IPAC5, IPAC6, IPAC7, IPAC8, IPAC9, IPAC10
EBYP	EBYPC1, EBYPC2, EBYPC3, EBYPC4, EBYPC5, EBYPC6, EBYPC7, EBYPD1, EBYPD2
EGR	EGRC1, EGRC2, EGRC3, EGRC4, EGRC5, EGRC6, EGRC7, EGRC8, EGRC9, EGRD1, EGRD2, EGRD3, EGRD4, EGRD5
GEL1	GEL1C1, GEL1C2, GEL1C3, GEL1C4, GEL1C5
GEL2	GEL2C1, GEL2C2, GEL2.1D1, GEL2.2D1
REF2.1	REF2.1C1, REF2.1C2, REF2.1C3, REF2.1C4, REF2.1C5, REF2.1C6
REF2.2	REF2.2C1, REF2.2C2, REF2.2C3, REF2.2C4, REF2.2C5
AK	AKC1, AKC2, AKC3, AKD1, AKD2, AKD3, AKD4
DP1	DP1C1, DP1C2, DP1C3, DP1C4, DP1D1, DP1D2, DP1D3
DP2	DP2C1, DP2C2, DP2C3, DP2D1, DP2D2
MP1	MP1C1, MP1C2, MP1D1
MP2	MP2C1, MP2C2, MP2C4, MP2C5, MP2C6, MP2C7, MP2D1, MP2D2, MP2D3, MP2D4
HK1	HK1C1, HK1C2, HK1C3, HK1C4, HK1C5, HK1C6, HK1C7, HK1C8, HK1D1, HK1D2, HK1D3, HK1D4, HK1D5, HK1D6, HK1D7, HK1D8, HK1D9, HK1D10, HK1D11
HK2	HK2C1, HK2C2, HK2C3, HK2D1, HK2D2
HK3	HK3C1, HK3C2, HK3C3, HK3C4, HK3C5, HK3C6, HK3D1, HK3D2, HK3D3, HK3D4, HK3D5
HK4	HK4C1, HK4D1, HK4D2, HK4D3, HK4D4, HK4D5
PYP	PYPC1, PYPC2, PYPD1, PYPD2, PYPD3, PYPD4, PYPD5, PYPD6, PYPD7, PYPD8, PYPD9
BOTS	BOTSC1, BOTSD1
SH	SHC1, SHC2, SHC3, SHC4, SHC5, SHC6
MPS2	MPS2C1
MP4	MP4C1, MPS4D1, MPS4D2, MPS4D3
MPS6	MPS6C1, MPS6D1
MPS8	MPS8C1, MPS8C2, MPS8C3, MPS8C4, MPS8D1, MPS8D2, MPS8D3, MPS8D4, MPS8D5
1B(500)	1B(500)D1
2B1(1100)	2B1(1100)C1

Tabela 2 continuação

Amostras	Micro-organismos
2B2(1100)	2B2(1100)C1
2B(300)	2B(300)D1
2B(500)	2B(500)D1, 2B(500)D2
3B(500)	3B(500)D1, 3B(500)D2
3B(300)	3B(300)D1
Micro-organismos isolados no meio de cultura MCBE7	
Micro-organismos isolados no meio de cultura MCFE7	

Tabela 3: Micro-organismos isolados de amostras de solo do PETAR

Amostras	Micro-organismos
NS1	NS1C1, NS1C2, NS1D1, NS1D2, NS1D3
NS2	NS2C1, NS2C2, NS2D1, NS2D2, NS2D3, NS2D4, NS2D5, NS2D6
NS3	NS3C1, NS3C2, NS3C3, NS3D1, NS3D2, NS3D3, NS3D4
NS4	NS4C1, NS4C2, NS4D1, NS4D2, NS4D3, NS4D4, NS5D5
NS5	NS5C1, NS5C2, NS5D1, NS5D2, NS5D3, NS5D4, NS5D5
NS6	NS6C1, NS6C2, NS6C3, NS6C4, NS6C5, NS6C6, NS6D1, NS6D2, NS6D3, NS6D4, NS6D5, NS6D6
NS7	NS7C1, NS7C2, NS7C3, NS7C4, NS7C5, NS7D1, NS7D2, NS7D3, NS7D4, NS7D5
NS8	NS8C1, NS8C2, NS8C3, NS8C4, NS8D1, NS8D2, NS8D3, NS8D4
NS9	NS9C1, NS9C2 e NS9C3, NS9C1, NS9C2, NS9C3, NS9D1, NS9D2, NS9D3, NS9D4
NS10	NS10C1, NS10C2, NS10D1, NS10D2, NS10D3
LB1	LB1C1, LB1C2, LB1C3, LB1C4, LB1C5, LB1D1, LB1D2, LB1D3, LB1D4, LB1D5, LB1D6, LB1D7, LB1D8
LB2	LB2C1, LB2C2, LB2C3, LB2C4, LB2D1, LB2D2, LB2D3, LB2D4, LB2D5, LB2D6, LB2D7, LB2D8, LB2D9
LB3	LB3C1, LB3C2, LB3C3, LB3D1, LB3D2, LB3D3, LB3D4
LB4	LB4C1, LB4C2, LB4C3, LB4C4, LB4C5, LB4C6, LB4C7, LB4C8, LB4D1, LB4D2
LB5	LB5C1, LB5C2, LB5C3, LB5C4, LB5C5, LB5C6, LB5C7, LB5C8, LB5C9, LB5D1, LB5D2, LB5D3, LB5D4
Micro-organismos isolados no meio de cultura MCBE7	
Micro-organismos isolados no meio de cultura MCFE7	

3.3- SÍNTESE E SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DOS ÁLCOOIS RACÊMICOS VIA CROMATOGRAFIA A GÁS (CG).

A preparação dos álcoois racêmicos **7-12** foi realizada pela redução das cetonas correspondentes com boro-hidreto de sódio em metanol. A metodologia utilizada neste trabalho para análise das atividades enzimáticas foi a cromatografia a gás utilizando coluna com fase estacionária quiral para separação dos enantiômeros dos produtos desejados, álcoois **7-12** (Figura 10). Isto permitiu a medida do excesso enantiomérico dos compostos preparados enzimaticamente.

Figura 10: Álcoois aromáticos racêmicos utilizados como substratos na avaliação enzimática em reações de oxidação enantiosseletiva e como padrões nas análises em CG.

3.4- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA (ÁLCOOL DESIDROGENASE) DOS MICRO-ORGANISMOS.

Após o isolamento dos micro-organismos, iniciou-se o estudo de avaliação da atividade enzimática em reações de oxidação enantiosseletiva de álcoois derivados do (*R,S*)-1-(fenil)etanol (Esquema 8).

Esquema 8: Reação de oxidação enantiosseletiva do (*R,S*)-1-(fenil)etanol e seus derivados na presença de micro-organismos.

Além da reação de oxidação enantiosseletiva pode-se avaliar a reação de desracemização.

Como a álcool desidrogenase (ADH) não é capaz de catalisar a reação de oxidação enantiosseletiva sem a presença de um co-fator (coenzima) (FABER, 1997), nesse estudo foi utilizada células de micro-organismos como fonte de NAD(P)⁺ e ADH.

Antes do início da avaliação enzimática, decidiu-se realizar dois estudos com dois micro-organismos isolados de amostras de solo do PETAR (NS2D2 e NS3D2), através da técnica de enriquecimento com o (*R,S*)-1-(fenil)etanol. Os micro-organismos NS2D2 e NS3D2 foram selecionados para esse estudo por apresentar boa atividade enzimática nas reações de oxidação enantiosseletiva dos álcoois derivados do (*R,S*)-1-(fenil)etanol. Como a solução dos substratos foi preparada em solvente orgânico, o primeiro estudo foi verificar a influência dos solventes (DMF e etanol) na conversão e enantiosseletividade da reação. Apesar do emprego de apenas 2 % (v/v) do co-solvente o estudo de sua influência na reação foi realizado. O segundo estudo teve como objetivo verificar a influência da concentração dos substratos na conversão e enantiosseletividade da reação.

3.4.1- ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO TIPO DE CO-SOLVENTE NA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO

Um parâmetro reacional que tem papel importante na enantiosseletividade de reações enzimáticas é o tipo de solvente (SHEN, 2008). A escolha do etanol e *N,N*-dimetilformamida (DMF) como co-solvente, deve-se a elevada solubilidade dos álcoois **7-12** nesses solventes. Os resultados obtidos para esse estudo encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4: Estudo com os micro-organismos NS2D2 e NS3D2 em reações de oxidação utilizando os substratos (*R,S*)- (**7-12**) em etanol e DMF.

Reação	Micro-organismos	R	Solvente	Cetona/ Álcool ^a	Álcool	
					ee.(%)	Conf. abs.
1	NS2D2	H	DMF	5/95	9	<i>R</i>
2		H	Etanol	2/98	-	-
3		Me	DMF	16/84	53	<i>R</i>
4		Me	Etanol	3/97	17	<i>R</i>
5		MeO	DMF	45/55	46	<i>R</i>
6		MeO	Etanol	22/22	15	<i>R</i>
7		Cl	DMF	1/98	29	<i>R</i>
8		Cl	Etanol	3/97	5	<i>R</i>
9		Br	DMF	17/83	43	<i>R</i>
10		Br	Etanol	5/95	10	<i>R</i>
11		NO ₂	DMF	23/77	-	-
12		NO ₂	Etanol	298	11	<i>R</i>

Tabela 4 continuação.

Reação	Micro-organismos	R	Solvente	Cetona/ Álcool ^a	Álcool
					ee.(%) Conf. abs.
13	NS3D2	H	DMF	4/96	6 <i>R</i>
14		H	Etanol	1/99	- <i>R</i>
15		Me	DMF	12/88	47 <i>R</i>
16		Me	Etanol	-	- -
17		MeO	DMF	32/68	40 <i>R</i>
18		MeO	Etanol	15/85	14 <i>R</i>
19		Cl	DMF	-	- -
20		Cl	Etanol	2/98	- -
21		Br	DMF	-	- -
22		Br	Etanol	-	- -
23		NO ₂	DMF	10/90	6 <i>R</i>
24		NO ₂	Etanol	-	- -

Condições reacionais: 5 mmol/L de substrato (álcool **7-12**) em 2 mL de meio de cultura MCBE7 (pH 7,0) incubado a 32 °C em um shaker orbital (160 rpm) por 72 horas.^a Razão determinada por GC usando a coluna quiral Chiral-Dex-CB (beta-ciclodextrina, 25 m x 0.25 mm); ee.: excesso enantiomérico; conf. abs.: configuração absoluta determinada por comparação com dados da literatura (NAEMURA *et al.* 1996; YADAV *et al.* 2002; KIM *et al.* 2004).

Através da análise dos dados da Tabela 4, percebeu-se, que de modo geral, as melhores concentrações e enantiosseletividade ocorreram nas reações que utilizaram o micro-organismo NS2D2 como fonte enzimática (Reações 1-12). Sendo assim, observou-se que a atividade enzimática desse micro-organismo foi melhor nas reações em que o substituinte do substrato R é uma metoxila tendo em vista que as melhores conversões e enantiosseletividade ocorreram nessas reações (Reações 5 e 6), em relação aos demais substituintes.

O micro-organismo NS3D2 apresentou pouca atividade enzimática frente aos substituintes empregados, obtendo baixos valores de conversões e excesso enantiomérico, exceto a conversão de cetona na reação cujo substituinte R do substrato foi uma metoxila (Reação 17).

Observou-se que o co-solvente mais adequado para solubilizar os álcoois racêmicos **7-12** foi o DMF, uma vez que as melhores conversões de cetona e enantiosseletividade ocorrem nas reações que utilizaram esse co-solvente (Reações 3, 5, 9 e 17).

3.4.2- ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DOS SUBSTRATOS NA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO

Devido aos resultados obtidos no estudo anterior, (Tabela 4) escolheu-se o DMF como solvente das soluções dos substratos (derivados do (*R,S*)-1-(fenil)etanol) para o estudo da influência da concentração dos substratos na reação de oxidação. Para isso, prepararam-se soluções com diferentes concentrações dos álcoois racêmicos **7-12** (2,5; 5; 10 e 15 mmol/L). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5: Estudo das concentrações dos substratos (*R,S*)-(**7-12**) em DMF para os micro-organismos NS2D2 e NS3D2

Reação	Micro-organismos	R	Substrato c. (mmol/L)	Cetona/Álcool ^a	Álcool	
					ee. (%)	Conf. abs.
1	NS2D2	H	2,5	397	7	<i>R</i>
2		H	5,0	5/95	9	<i>R</i>
3		H	10,0	4/96	5	-
4		H	15,0	8/92	15	<i>R</i>
5		Me	2,5	-	-	-
6		Me	5,0	16/84	53	<i>R</i>

Tabela 5 continuação

Reação	Micro-organismos	R	Substrato c. (mmol/L)	Cetona/Álcool ^a	Álcool	
					ee. (%)	Conf. abs.
7	NS2D2	Me	10,0	8/92	-	-
8		Me	15,0	1674	5	<i>R</i>
9		MeO	2,5	21/79	20	<i>R</i>
10		MeO	5,0	45/55	46	<i>R</i>
11		MeO	10,0	45/55	37	<i>R</i>
12		MeO	15,0	56/44	51	<i>R</i>
13		Cl	2,5	8/92	6	<i>R</i>
14		Cl	5,0	1/99	4	-
15		Cl	10,0	-	-	-
16		Cl	15,0	-	-	-
17		Br	2,5	-	-	-
18		Br	5,0	17/83	43	<i>R</i>
19		Br	10,0	-	-	-
20		Br	15,0	-	-	-
21		NO ₂	2,5	10/90	7	<i>R</i>
22		NO ₂	5,0	23/77	-	-
23		NO ₂	10,0	3/97	7	<i>R</i>
24		NO ₂	15,0	21/79	-	-
25	NS3D2	H	2,5	3/97	5	<i>R</i>
26		H	5,0	4/96	7	<i>R</i>
27		H	10,0	2/98	-	-
28		H	15,0	8/92	20	<i>R</i>
29		Me	2,5	-	-	-
30		Me	5,0	12/88	47	<i>R</i>
31		Me	10,0	1/99	-	-
32		Me	15,0	15/85	74	<i>R</i>
33		MeO	2,5	3/97	-	-
34		MeO	5,0	32/68	41	<i>R</i>
35		MeO	10,0	2/98	-	-
36		MeO	15,0	37/63	54	<i>R</i>
37		Cl	2,5	1/99	-	-
38		Cl	5,0	-	-	-
39		Cl	10,0	-	-	-
40		Cl	15,0	-	-	-

Tabela 5 continuação

Reação	Micro-organismos	R	Substrato c. (mmol/L)	Cetona/Álcool ^a	Álcool	
					ee. (%)	Conf. abs.
41	NS3D2	Br	2,5	3/97	7	R
42		Br	5,0	-	-	-
43		Br	10,0	-	-	-
44		Br	15,0	-	-	-
45		NO ₂	2,5	4/96	13	R
46		NO ₂	5,0	10/90	6	R
47		NO ₂	10,0	3/97	-	-
48		NO ₂	15,0	14/86	7	R

Condições reacionais: 5 mmol/L a 15 mmol/L de substrato (álcool **7-12**) em 2 mL de meio de cultura MCBE7 (pH 7,0) incubado a 32 °C em um shaker orbital (160 rpm) por 72 horas. ^aRazão determinada por GC usando a coluna quiral Chiral-Dex-CB (beta-ciclodextrina, 25 m x 0.25 mm); c.: concentração; ee.: excesso enantiomérico; conf. abs.: configuração absoluta determinada por comparação com dados da literatura (NAEMURA *et al.* 1996; YADAV *et al.* 2002; KIM *et al.* 2004).

Analisando-se os dados da Tabela 5, observou-se que o micro-organismo NS2D2 apresentou a melhor atividade enzimática quando comparado ao micro-organismo NS3D2, uma vez que, as melhores conversões de cetona foram obtidas nas reações de oxidação catalisadas pela ADH desse micro-organismo (Reações 10, 11 e 12).

Pôde-se perceber a melhor interação entre a enzima e os substratos quando o substituinte R empregado no anel aromático dos álcoois racêmicos **7-12** foi a metoxila, obtendo as melhores conversões e enantiosseletividade.

Verificou-se que de maneira geral, as melhores conversões e excessos enantioméricos ocorreram com os substratos em uma concentração de 15 mmol/L (Reações 12 e 36). Porém, não houve uma diferença significativa nas conversões e excesso enantiomérico com os substratos em uma concentração de 5 mmol/L (Reações 10 e 34).

Sendo assim, decidiu-se utilizar os substratos em uma concentração de 5 mmol/L para os ensaios subseqüentes, pois com essa concentração tem-se uma menor quantidade de substrato no meio reacional podendo evitar uma possível inibição enzimática.

Após a escolha das condições reacionais, iniciou-se a avaliação da atividade da ADH dos 232 micro-organismos psicofílicos isolados. Neste ensaio aplicou-se o mesmo procedimento descrito no item 3.4.1.

Destes micro-organismos, 15 cepas apresentaram a álcool desidrogenases que catalisaram a oxidação do enantiômero (S) do álcool racêmico à sua correspondente cetona. Portanto, o (R)-álcool permaneceu intacto e com elevado excesso enantiomérico (até > 99 %). Considerou-se como boa atividade da ADH, conversões da cetona > 10 % e excesso enantiomérico > 60 %. Alguns resultados encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6: Avaliação da enantiosseletividade da ADH de alguns micro-organismos psicofílicos isolados de amostras da Antártica.

Reação	Micro-organismos	R	Cetona/Álcool	Álcool	
				ee.(%)	Conf. abs.
1	MPS8D3	H	11/89	25	R
2		Me	22/78	92	R
3		MeO	46/54	> 99	R
4		Cl	21/79	89	R
5		Br	23/77	96	R
6		NO ₂	43/57	57	R

Tabela 6 continuação.

Reação	Micro-organismos	R	Cetona/Álcool	Álcool	
				ee.(%)	Conf. abs.
7	HK1D9	H	16/84	22	<i>R</i>
8		Me	27/73	97	<i>R</i>
9		MeO	47/53	> 99	<i>R</i>
10		Cl	25/75	95	<i>R</i>
11		Br	4/96	17	<i>R</i>
12		NO ₂	34/66	33	<i>R</i>
13	HK2D2	H	6/94	10	<i>R</i>
14		Me	17/83	57	<i>R</i>
15		MeO	25/75	45	<i>R</i>
16		Cl	16/84	52	<i>R</i>
17		Br	21/79	61	<i>R</i>
18		NO ₂	7/93	6	<i>R</i>
19	MPS4D2	H	8/92	22	<i>R</i>
20		Me	17/83	93	<i>R</i>
21		MeO	44/56	> 99	<i>R</i>
22		Cl	15/85	69	<i>R</i>
23		Br	1981	87	<i>R</i>
24		NO ₂	21/79	22	<i>R</i>
25	HK1D8	H	2/98	3	-
26		Me	5/95	17	<i>R</i>
27		MeO	15/85	22	<i>R</i>
28		Cl	5/95	15	<i>R</i>
29		Br	5/95	15	<i>R</i>
30		NO ₂	5/95	15	<i>R</i>
31	HK1D10	H	11/89	17	<i>R</i>
32		Me	9/91	24	<i>R</i>
33		MeO	41/59	79	<i>R</i>
34		Cl	1/99	1	-
35		Br	1/99	2	-
36		NO ₂	4/96	2	-

Condições reacionais: 5 mmol/L de substrato (álcool **7-12**) em 2 mL de meio de cultura MCBE7 (pH 7,0) incubado a 20 °C em um shaker orbital (160 rpm) por 72 horas. ^aRazão determinada por GC usando a coluna quiral Chiral-Dex-CB (beta-ciclodextrina, 25 m x 0.25 mm); ee.: excesso enantiomérico; conf. abs.: configuração absoluta determinada por comparação com dados da literatura (NAEMURA *et al.* 1996; YADAV *et al.* 2002; KIM *et al.* 2004).

Pelos dados da Tabela 6, percebeu-se que a atividade enzimática dos micro-organismos foi melhor quando o substituinte R dos substratos é uma metoxila, pois as conversões de cetonas foram excelentes (Reações 3, 9, 21 e 33) e com melhor enantiosseletividade nas reações 3, 9 e 21 (> 99 %). Vale ressaltar que em reação de resolução cinética enzimática o máximo de conversão é de 50 %.

O micro-organismo HK1D10 não apresentou atividade enzimática nas reações em que o substituinte R do substrato é um halogênio ou um grupo nitro, pois as conversões foram baixas e sem seletividade (Reações 34-36).

Todos os micro-organismos avaliados possuem álcool desidrogenase com preferência pela oxidação do enantiômero-S do álcool.

Como exemplo dos resultados obtidos, pode-se destacar os resultados obtidos através do cromatograma da reação de oxidação, Esquema 9, que está representada na Figura 11.

Esquema 9: Reação de oxidação do (R,S)-1-(4-metoxifenil)etanol catalisada por ADH.

Figura 11: a) Cromatograma do (R,S)-1-(4-metoxifenil)etanol com a 4-metoxiacetofenona;
b) Cromatograma obtido da reação do composto **9** com o micro-organismo HK1D9.

Analisando-se a Figura 11 observa-se que a álcool desidrogenase do micro-organismo HK1D9 utilizada na reação com o (R,S)-1-(4-metoxifenil)etanol oxida apenas o enantiômero (S) do álcool à sua correspondente cetona. Portanto, o (R)-1-(4-metoxifenil)etanol foi obtido juntamente com a 4-metoxiacetofenona (Tabela 6, Reação 9).

Dentre os micro-organismos isolados e avaliados enzimaticamente em reações com os derivados do (R,S)-1-(fenil)etanol que não se mostraram eficientes nas reações testadas, tem-se o BAL1C1. O cromatograma da reação de oxidação do (R,S)-1-(4-metoxifenil)etanol com este micro-organismo, empregado como fonte de álcool desidrogenase, está representado na Figura 12.

Figura 12: a) Cromatograma do (R,S)-1-(4-metoxifenil)etanol com a 4-metoxiacetofenona; b) Cromatograma obtido da reação do composto **8** com o micro-organismo BAL1C1.

Analisando-se as Figuras 11 e 12 em que foram empregados diferentes micro-organismos, como fonte de álcool desidrogenase, utilizados na reação de oxidação do (R,S)-1-(4-metoxifenil)etanol, percebeu-se a elevada enantiosseletividade de certas reações, em que o rendimento do produto da reação de oxidação depende da álcool desidrogenase desses micro-organismos. Na Figura 11, observa-se uma elevada enantiosseletividade da reação utilizando a ADH do micro-organismo HK1D9, pois foi observado apenas o (R)-1-(4-metoxifenil)etanol e a 4-metoxiacetofenona. Já a reação utilizando a ADH do micro-organismo BAL1C1 não apresentou seletividade (Figura 12). Com isso, pode-se perceber que nem todos os micro-organismos apresentam álcool desidrogenase com atividade catalítica nas reações de oxidação para esses tipos de substratos.

3.4.3- AVALIAÇÃO ENZIMÁTICA DE MICRO-ORGANISMOS MESOFÍLICOS

De acordo com os dados coletados da avaliação enzimática dos micro-organismos psicrófilicos (Tabela 6), observou-se uma boa afinidade entre o substrato e as enzimas quando R é uma metila ou metoxila. Sendo assim, decidiu-se utilizar o substrato (*R,S*)-1-(4-metilfenil)-etanol na avaliação enzimática dos micro-organismos mesofílicos, uma vez que, as conversões e enantiosseletividades dessas reações foram moderadas, podendo ser melhoradas com o aumento do tempo reacional. Além disso, o tempo de retenção dos enantiômeros desse álcool (na análise de cromatografia gasosa utilizando coluna com fase estacionária quiral) é menor do que os do (*R,S*)-1-(4-metoxifenil)etanol, portanto, há uma economia de tempo na avaliação enzimática dos 130 micro-organismos mesofílicos.

Assim, dos 130 micro-organismos mesofílicos isolados no PETAR, 11 micro-organismos continham álcool desidrogenases que catalisaram a oxidação do enantiômero (*S*) do (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol à sua correspondente cetona. Portanto, o (*R*)-álcool permaneceu intacto e com elevado excesso enantiomérico (até > 99 %) e 6 micro-organismos continham álcool desidrogenases que catalisaram a oxidação do enantiômero (*R*) do (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol à sua correspondente cetona. Portanto, o (*S*)-álcool permaneceu intacto e com bons valores de excesso enantiomérico. Os resultados mais relevantes encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7: Avaliação da enantiosseletividade da ADH dos micro-organismos na oxidação do (R,S)-1-(4-metilfenil)etanol.

Reação	Micro-organismos	Cetona/Álcool ^a	Álcool	
			ee.(%)	Conf. abs.
1	LB5D2.1	49/51	> 99	S
2	LB1D8	33/67	33	S
3	LB2D5	22/78	31	S
4	LB3C4	21/79	89	R
5	LB2D3	47/53	53	R
6	LB5D3	48/52	55	R
7	NS2D5	49/51	> 99	R
8	NS3D2	15/85	74	R
9	NS2D2	20/80	63	R
10	LB1D2.1	49/51	> 99	R

Condições reacionais: 5 mmol/L de substrato (R,S)-1-(4-metilfenil)etanol em 2 mL de meio de cultura MCBE7 (pH 7) e MCFE7 (pH 5,6) incubado a 32 °C em um shaker orbital (160 rpm) por 72 horas. ^aRazão determinada por GC usando a coluna quiral Chiral-Dex-CB (beta-ciclodextrina, 25 m x 0.25 mm); ee.: excesso enantiomérico; conf. abs.: configuração absoluta determinada por comparação com dados da literatura (NAEMURA *et al.* 1996; YADAV *et al.* 2002; KIM *et al.* 2004).

Analisando a Tabela 7, percebeu-se que o micro-organismo LB5D2.1 apresenta uma álcool desidrogenase que catalisou a oxidação do enantiômero (R) do (R,S)-1-(4-metilfenil)etanol à sua correspondente cetona com excelentes conversões e enantiosseletividade (Tabela 7, Reação 1). Já a álcool desidrogenase dos micro-organismos LB1D2.1 e NS2D5 catalisou a oxidação do enantiômero (S) do (R,S)-1-(4-metilfenil)etanol com excelentes conversões e enantiosseletividade

(Tabela 7, Reação 10).

Como exemplo dos resultados obtidos para os micro-organismos LB5D2.1 e LB1D2.1 destacou-se as reações de oxidação que estão representadas nos cromatogramas da Figura 13 b e 13c.

Figura 13: a) Cromatograma do (R,S)-1-(4-metilfenil)etanol com 4-metilcetofenona; b) Cromatograma obtido da reação do composto **8** com o micro-organismo LB5D2.1 (Tabela 7, reação1); c) Cromatograma obtido da reação do composto **8** com o micro-organismo LB1D2.1 (Tabela 7, reação 9).

Observando-se os cromatogramas da Figura 13, percebeu-se que as álcool desidrogenases presentes nos micro-organismos LB5D2.1 e LB1D2.1 são diferentes, já que a oxidação do (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol ocorreu com enantiômeros diferentes. A álcool desidrogenase do micro-organismo LB5D2.1 catalisa a oxidação do enantiômero (*R*) do (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol (Figura 13 b), e a álcool desidrogenase do micro-organismo LB1D2.1 catalisa a oxidação do enantiômero (*S*) do (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol (Figura 13 c).

Paralelo este trabalho estudou-se a bioprospecção de álcool desidrogenases para reações de redução enantiosseletiva de cetonas, onde a acetofenona foi utilizada como composto indutor. Sendo assim, decidiu-se avaliar se micro-organismos isolados para oxidação enantiosseletiva podem ser utilizados para redução enantiosseletiva, e *vice-versa*.

Para isso, escolheu-se um micro-organismo que apresentou ADH com boa atividade nas reações de oxidação (NS2D5) e outro que não apresentou ADH com boa atividade (NS4D2) (Tabela 8).

Além disso, escolheu-se 2 micro-organismos isolados utilizando como composto indutor a acetofenona para serem aplicados em reações de oxidação enantiosseletiva de álcoois, um micro-organismo que apresentou ADH com boa atividade nas reações de biorredução (NS4B1) e outro que não apresentou ADH com boa atividade (NS1B1) (Tabelas 9).

Tabela 8: Estudo com os micro-organismos NS2D5 e NS4D2 em reações de redução utilizando os substratos (**1-6**).

Reação	Micro-organismos	R	Álcool		Conf. abs.
			c. (%)	ee.(%)	
1	NS2D5	H	17	74	S
2		Me	15	46	S
3		MeO	3	43	S
4		Cl	34	45	S
5		Br	22	23	S
6		NO ₂	4	28	S
7	NS4D2	H	-	-	-
8		Me	-	-	-
9		MeO	-	-	-
10		Cl	-	-	-
11		Br	-	-	-
12		NO ₂	-	-	-

Condições reacionais: 5 mmol/L de substrato (cetona **1-6**) em 2 mL de meio de cultura MCBE7 (pH 7,0) incubado a 32 °C em um shaker orbital (160 rpm) por 72 horas. c.: conversão determinada por GC usando a coluna quiral Chiral-Dex-CB (beta-ciclodextrina, 25 m x 0.25 mm); ee.: excesso enantiomérico; conf. abs.: configuração absoluta determinada por comparação com dados da literatura (NAEMURA *et al.* 1996; YADAV *et al.* 2002; KIM *et al.* 2004).

Tabela 9: Estudo com os micro-organismos NS4B1 e NS1B1 em reações de oxidação utilizando os substratos (*R,S*)- (**7-12**).

Reação	Micro-organismos	R	Cetona/Álcool ^a	Álcool	
				ee.(%)	Conf. abs.
1	NS4B1	H	2/98	2	-
2		Me	1/99	1	-
3		MeO	3/97	3	-
4		Cl	-	-	-
5		Br	4/96	3	-
6		NO ₂	-	-	-
7	NS1B1	H	-	-	-
8		Me	-	-	-
9		MeO	-	-	-
10		Cl	-	-	-
11		Br	-	-	-
12		NO ₂	-	-	-

Condições reacionais: 5 mmol/L de substrato (álcool **7-12**) em 2 mL de meio de cultura MCBE7 (pH 7,0) incubado a 32 °C em um shaker orbital (160 rpm) por 72 horas. ^aRazão determinada por GC usando a coluna quiral Chiral-Dex-CB (beta-ciclodextrina, 25 m x 0.25 mm); ee.: excesso enantiomérico; conf. abs.: configuração absoluta determinada por comparação com dados da literatura (NAEMURA *et al.* 1996; YADAV *et al.* 2002; KIM *et al.* 2004).

Com relação aos micro-organismos isolados utilizando o (*R,S*)-1-(fenil)etanol como indutor (NS2D5 e NS4D2), somente aquele que já havia apresentado um resultado satisfatório anteriormente (NS2D5), na reação de oxidação, apresentou um resultado razoável na reação de redução de cetonas (Tabela 8, Reações **1-6**). No caso dos micro-organismos isolados utilizando a acetofenona como indutor (NS4B1 e NS1B1), obtiveram-se resultados de conversões e excesso enantioméricos muito abaixo daqueles considerados como satisfatórios (Tabela 9). Isso pode ser atribuído a aplicação dos indutores, [(*R,S*)-1-(fenil)etanol e acetofenona] como compostos seletivos de álcool desidrogenases, usados durante o crescimento dos micro-

organismos. Com isso, pôde-se perceber que a técnica de enriquecimento influenciou positivamente na seleção de micro-organismos produtores de álcool desidrogenases para aplicação em reações de oxidação e redução.

3.5- CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DE MICRO-ORGANISMOS

Após a avaliação do espectro de atividade enzimática dos micro-organismos isolados, partiu-se para a identificação daqueles micro-organismos que exibiram excelente atividade enzimática nas reações enantiosseletivas testadas. Para este propósito contamos com o apoio do grupo de pesquisa da Professora Dra. Vivian Pellizari (IO-USP). A caracterização taxonômica dos micro-organismos foi realizada através do sequenciamento do 16S rDNA do isolado. Dentre os micro-organismos identificados têm-se a *Flavobacterium* sp., *Arthrobacter* sp., *Acinetobacter* sp., e o *Bacillus* sp., inicialmente nomeados, como HK1D9, MPS8D3, LB5D2.1 e LB1D2.1, respectivamente (Tabelas 6 e 7).

3.6- OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE OXIDAÇÃO ENANTIOSSELETIVA UTILIZANDO A *FLAVOBACTERIUM* SP. (HK1D9)

Para o estudo de otimização foi selecionada a *Flavobacterium* sp. e a *Arthrobacter* sp., como fonte enzimática nas reações de oxidação enantiosseletiva de álcoois. Essas bactérias foram isoladas de amostras de solo e sedimento da Antártica, respectivamente. Uma vez que essa região abriga micro-organismos psicrófilicos e psicrótróficos, cujo seus crescimentos e a atividade enzimática dependem da temperatura.

Baseado nos resultados da avaliação do espectro de atividade das álcool desidrogenases dos micro-organismos, decidiu-se utilizar como substrato modelo para os estudos de otimização das reações de oxidação o (R,S)-1-(4-

metilfenil)etanol, uma vez que foi observada uma grande afinidade entre este substrato e a enzima. Dessa forma, avaliou-se o crescimento bacteriano em diferentes temperaturas, seguido da reação de oxidação na mesma temperatura. Além disso, o tempo reacional para alcançar uma perfeita resolução cinética foi avaliado.

Existem relatos na literatura que micro-organismos psicrófilos/psicrótrópicos toleram temperaturas entre 0 e 40 °C (FELLER *et al.* 1999). A temperatura corresponde a um dos principais fatores ambientais que influenciam o desenvolvimento bacteriano, pois à medida que há um aumento da temperatura, as reações químicas e enzimáticas na célula tendem a tornarem-se mais rápidas, acelerando a taxa de crescimento (CAVICCHIOLI, 2000).

Com a finalidade de determinar as condições reacionais ideais para o alcance de uma excelente atividade enzimática da *Flavobacterium* sp., decidiu-se utilizar células desta bactéria ressuspensas em tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) pH 7,0.

Inicialmente fez-se um estudo de temperatura e tempo reacional. Nesse estudo, a metodologia empregada foi dividida em 4 etapas: pré-incubação, incubação, centrifugação/ressuspensão das células e reação. As temperaturas analisadas foram 5, 10, 15, 20, 25 e 30 °C, sendo estas temperaturas toleráveis por micro-organismos psicrótrópicos. Essas temperaturas foram empregadas tanto no crescimento bacteriano quanto na reação de oxidação. Os resultados encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10: Avaliação da enantiosseletividade da ADH da *Flavobacterium* sp. na oxidação do (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol em diferentes temperaturas de crescimento bacteriano e tempos reacionais.

Reação	Temperatura ^a (° C)	Tempo reacional (h)	Cetona/Álcool ^b	Álcool	
				ee.(%)	Conf. abs.
1	10	24	5/95	10	<i>R</i>
2		48	14/86	21	<i>R</i>
3		72	14/86	24	<i>R</i>
4	15	24	32/68	42	<i>R</i>
5		48	46/54	78	<i>R</i>
6		72	48/52	91	<i>R</i>
7	20	24	42/58	76	<i>R</i>
8		48	41/59	83	<i>R</i>
9		72	49/51	96	<i>R</i>
10	25	24	45/55	89	<i>R</i>
11		48	40/60	93	<i>R</i>
12		72	33/67	95	<i>R</i>

Condições reacionais: 5 mmol/L de substrato (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol em 10 mL de meio de cultura MCBE7 (pH 7,0) incubado em um shaker orbital (160 rpm) por 72 horas. ^aTemperatura de crescimento bacteriano e de reação. ^bRazão determinada por GC usando a coluna quiral Chiral-Dex-CB (beta-ciclodextrina, 25 m x 0.25 mm); ee.: excesso enantiomérico; conf. abs.: configuração absoluta determinada por comparação com dados da literatura (NAEMURA *et al.* 1996; YADAV *et al.* 2002; KIM *et al.* 2004).

Analisando a Tabela 10, observou-se uma semelhança na conversão da cetona (> 48 %) e no excesso enantiomérico das reações (> 91 %) nas temperaturas 15 e 20 °C em 72 h (Tabela 10, Reações 6 e 9). Já a 25 °C a melhor conversão de cetona (45 %) foi obtida em apenas 24 h de reação. Ao longo do tempo reacional, observou-se um decréscimo na conversão da cetona e um aumento da conversão do (*R*)-1-(4-metilfenil)etanol e do excesso enantiomérico, indicando assim, a presença de uma

outra ADH que catalisou a redução enantiosseletiva da correspondente cetona, levando assim a uma desracemização (Esquema 10).

Esquema 10: Reação de desracemização com *Flavobacterium* sp.

Deve ser enfatizado que são poucas as desracemizações descritas na literatura realizadas por apenas um único micro-organismo (KROUTIL *et al.* 1997; ALLAN, CARNELL 2001; DEMIR *et al.* 2002) ou sem auxílio de agentes químicos (ORRU *et al.* 1997; KROUTIL, FABER 1998). Esse fenômeno constitui um fato extremamente interessante de ser observado em biocatálise.

A *Flavobacterium* sp. apresentou um crescimento lento nas temperaturas 5 e 30 °C. Sendo assim não foi realizado o estudo de reação nestas temperaturas, pois se observou uma quantidade muito pequena de massa celular, obtida após centrifugação do meio de cultura com a bactéria.

Com estes resultados, decidiu-se estudar as temperaturas reacionais, em que a etapa de crescimento da *Flavobacterium* sp. estivesse a 15 e 25 °C. Selecionou-se essas temperaturas, devido os resultados de concentrações e enantiosseletividade da reação de oxidação do (R,S)-1-(4-metilfenil)etanol não terem resultados com diferenças significantes nessas temperaturas (Tabela 10, Reações 6 e 12).

O objetivo desse estudo foi verificar a influência da temperatura de crescimento dos micro-organismos (15 e 25 °C) no desempenho das reações de

oxidação do (*R,S*)-1-(4-metilfenil) em diferentes temperaturas e tempos reacionais (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11: Crescimento da *Flavobacterium* sp. a 25 °C e avaliação da enantiosseletividade de sua ADH na oxidação do (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol em diferentes temperaturas.

Reação	Temperatura ^a (° C)	Tempo reacional (h)	Cetona/Álcool ^b	Álcool	
				ee.(%)	Conf. abs.
1	5	24	39/61	39	<i>R</i>
2		48	39/61	79	<i>R</i>
3		72	45/55	95	<i>R</i>
4	10	24	35/65	62	<i>R</i>
5		48	44/56	95	<i>R</i>
6		72	51/49	≥99	<i>R</i>
7	15	24	25/75	36	<i>R</i>
8		48	43/57	83	<i>R</i>
9		72	43/57	95	<i>R</i>
10	20	24	28/72	49	<i>R</i>
11		48	35/65	80	<i>R</i>
12		72	38/62	83	<i>R</i>
13	25	24	45/55	89	<i>R</i>
14		48	40/60	93	<i>R</i>
15		72	33/67	95	<i>R</i>
16	30	24	7/93	6	<i>R</i>
17		48	6/94	9	<i>R</i>
18		72	7/93	18	<i>R</i>

Condições reacionais: 5 mmol/L de substrato (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol em 10 mL de meio de cultura MCBE7 (pH 7,0) incubado em um shaker orbital (160 rpm) por 72 horas.

^aTemperatura reacional. ^bRazão determinada por GC usando a coluna quiral Chiral-Dex-CB (beta-ciclodextrina, 25 m x 0.25 mm); ee.: excesso enantiomérico; conf. abs.: configuração absoluta determinada por comparação com dados da literatura (NAEMURA *et al.* 1996; YADAV *et al.* 2002; KIM *et al.* 2004).

Analisando os dados da Tabela 11, em que a *Flavobacterium* sp. cresceu a 25 °C, observou-se que essa bactéria apresentou baixa atividade enzimática nas reações de oxidação do (R,S)-1-(4-metilfenil)etanol a 30 °C levando a baixas conversões e enantiosseletividade (Reações 16-18). No entanto, a *Flavobacterium* sp. Apresentou boa atividade enzimática nas reações a 5, 10, 15, 20 e 25 °C, com razoáveis a excelentes conversões e enantiosseletividade (Reações 1-15). No qual, observou-se aumento nas conversões e na enantiosseletividade com o aumento do tempo reacional. Com isso, determinou-se que excelentes conversões e enantiosseletividade ocorreram a 10 °C e 72 h de reação (Reação 6).

Tabela 12: Crescimento da *Flavobacterium* sp. a 15 °C e avaliação da enantiosseletividade de sua ADH na oxidação (R,S)-1-(4-metilfenil)etanol em diferentes temperaturas.

Reação	Temperatura ^a (° C)	Tempo reacional (h)	Cetona/Álcool ^a	Álcool	
				ee.(%)	Conf. abs.
1	5	24	5/95	15	R
2		48	16/84	30	R
3		72	21/79	43	R
4	10	24	19/81	21	R
5		48	34/66	65	R
6		72	42/58	89	R
7	15	24	25/75	36	R
8		48	43/57	83	R
9		72	43/57	95	R

Tabela 12 continuação.

Reação	Temperatura ^a (° C)	Tempo reacional (h)	Cetona/Álcool ^b	Álcool	
				ee.(%)	Conf. abs.
10	20	24	16/84	44	<i>R</i>
11		48	34/66	73	<i>R</i>
12		72	41/59	96	<i>R</i>
13	25	24	27/73	53	<i>R</i>
14		48	33/67	77	<i>R</i>
15		72	34/66	87	<i>R</i>
16	30	24	9/91	9	<i>R</i>
17		48	99/91	10	<i>R</i>
18		72	6/9	12	<i>R</i>

Condições reacionais: 5 mmol/L de substrato (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol em 10 mL de meio de cultura MCBE7 (pH 7,0) incubado em um shaker orbital (160 rpm) por 72 horas. ^atemperatura reacional. ^bRazão determinada por GC usando a coluna quiral Chiral-Dex-CB (beta-ciclodextrina, 25 m x 0.25 mm); ee.: excesso enantiomérico; conf. abs.: configuração absoluta determinada por comparação com dados da literatura (NAEMURA *et al.* 1996; YADAV *et al.* 2002; KIM *et al.* 2004).

Ao analisar a Tabela 12, com temperatura de crescimento da *Flavobacterium* sp. a 15 °C , observou-se baixa atividade enzimática dessa bactéria a 5 e 30 °C, onde os valores de conversão e enantiosseletividade foram baixos (Reações 1-3 e 16-18). Pôde-se verificar moderadas conversões e enantiosseletividade a 10 °C e 25 °C em 48 e 72 h de reação (Reações 5, 14 e 15). No entanto, as melhores conversões e enantiosseletividade foram observadas a 15 e 20 °C em 72 h de reação, indicando uma boa atividade enzimática da *Flavobacterium* sp. (Reações 6, 9 e 12).

Baseado nesses resultados se observou que a *Flavobacterium* sp. apresentou a melhor atividade enzimática a 10 °C, 72 h de reação e crescimento a 25 °C (Tabela 11, Reação 6) , pois é nessa condição que apresentou uma perfeita resolução cinética enzimática para o álcool (*R*)-1-(4-metilfenil)etanol. De acordo com esses resultados e com o que é conhecido na literatura sobre micro-organismos

psicrotróficos (MORITA, 1975; RUSSELL, 1990; FELLER *et al.* 1997b), levantou-se a hipótese que esta bactéria seja psicrotrófica, já que a mesma apresentou um excelente crescimento a 25 °C (temperatura ótima de crescimento dos psicrotróficos).

Sendo assim, decidiu-se determinar a curva de crescimento da *Flavobacterium* sp. a 15, 20 e 25 °C (Figura 14). Através da análise espectrofotométrica da Densidade Óptica (D.O.) de uma cultura bacteriana, pode-se avaliar a turbidez e estimar de forma relativa à concentração celular. Para esta análise utilizou-se um comprimento de onda de 600 nm.

Figura 14: Análise espectrofotométrica da Densidade Óptica (D.O.) da cultura de *Flavobacterium* sp. Meio de cultura mínimo (600 mL), (R,S)-1-feniletanol (1 mmol/L), agitação 160 rpm.

De acordo com os resultados das Tabelas 11 e 12, juntamente como o observado na Figura 14, percebeu-se que a *Flavobacterium* sp. cresceu melhor a 25 °C e tem uma excelente atividade enzimática nessa temperatura, pode-se concluir que esta bactéria é uma psicrotrófica como se imaginava inicialmente, já que exclui a possibilidade de ser uma psicrofílica, na qual a temperatura máxima de crescimento é 20 °C. Esta conclusão foi baseada nesses resultados e no que é relatado na literatura

sobre a identificação de micro-organismos psicróficos (MORITA, 1975; RUSSELL, 1990; FELLER *et al.* 1997b).

3.7- OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE OXIDAÇÃO ENANTIOSSELETIVA UTILIZANDO A *ARTHROBACTER* SP. (MPS8D3)

Novamente baseado nos resultados da avaliação do espectro de atividade das álcool desidrogenases dos micro-organismos, decidiu-se utilizar como substrato modelo para os estudos de otimização das reações de oxidação o (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol, uma vez que foi observada uma grande afinidade entre este substrato e a enzima. Dessa forma, avaliou-se o crescimento bacteriano em diferentes temperaturas, seguido da reação de oxidação na mesma temperatura. Além disso, o tempo reacional para alcançar uma perfeita resolução cinética foi avaliado.

Com a finalidade de determinar as condições reacionais ideais para o alcance de uma excelente atividade enzimática da *Arthrobacter* sp., decidiu-se utilizar células desta bactéria ressuspensas em tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) pH 7,0.

Inicialmente fez-se um estudo de temperatura e tempo reacional da *Arthrobacter* sp. Nesse caso, a metodologia empregada foi dividida em 4 etapas: pré-incubação, incubação, centrifugação/ressuspensão das células e reação. As temperaturas analisadas foram 5, 10, 15, 20, 25 e 30 °C, sendo estas temperaturas toleráveis por micro-organismos psicrotróficos. Essas temperaturas foram empregadas tanto no crescimento bacteriano quanto na reação de oxidação. Os resultados encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13: Avaliação da enantiosseletividade da ADH da *Arthrobacter* sp. na oxidação do (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol em diferentes temperaturas e tempos reacionais.

Reação	Temperatura ^a (° C)	Tempo reacional (h)	Cetona/Alcool ^b	Alcool	
				ee.(%)	Conf. abs.
1	5	24	-	-	-
2		48	-	-	-
3		72	1/99	-	-
4	10	24	1/99	1	-
5		48	2/98	1	-
6		72	5/95	11	<i>R</i>
7	15	24	40/60	94	<i>R</i>
8		48	37/63	96	<i>R</i>
9		72	34/66	96	<i>R</i>
10	20	24	40/60	95	<i>R</i>
11		48	36/64	95	<i>R</i>
12		72	30/70	96	<i>R</i>
13	25	24	38/62	96	<i>R</i>
14		48	34/66	95	<i>R</i>
15		72	30/70	95	<i>R</i>
16	30	24	-	-	-
17		48	1/99	-	-
18		72	2/98	4	-

Condições reacionais: 5 mmol/L de substrato (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol em 10 mL de meio de cultura MCBE7 (pH 7,0) incubado em um shaker orbital (160 rpm) por 72 horas.

^aTemperatura de crescimento bacteriano e de reação. ^bRazão determinada por GC usando a coluna quiral Chiral-Dex-CB (beta-ciclodextrina, 25 m x 0.25 mm); ee.: excesso enantiomérico; conf. abs.: configuração absoluta determinada por comparação com dados da literatura (NAEMURA *et al.* 1996; YADAV *et al.* 2002; KIM *et al.* 2004).

Ao analisar a Tabela 13, percebeu-se que a *Arthrobacter* sp. não apresentou atividade enzimática a 5 e 30 °C (Reações 1-3 e 16-18), em que não foi observado conversões e enantioseletividade. Porém, observou-se que a *Arthrobacter* sp. apresentou boa atividade enzimática a 15, 20 e 25 °C, em 24 h de reação, pois são nestas condições que se encontram as melhores conversões e excessos enantioméricos do álcool (*R*)-1-(4-metilfenil)etanol (Reações 7, 10 e 13). Nestas temperaturas, observou-se um decréscimo na conversão da cetona e um aumento da conversão do (*R*)-1-(4-metilfenil)etanol com o aumento do tempo reacional, indicando assim, a presença de uma outra ADH que catalisa a redução enantiosseletiva da correspondente cetona, levando assim a uma reação de desracemização (Esquema 11).

Esquema 11: Reação de desracemização com *Arthrobacter* sp.

Para esta bactéria não foi realizado o estudo de temperaturas reacionais e de crescimento, já que houve uma semelhança nas conversões da cetona e na enantiosseletividade das reações de oxidação do (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol nas temperaturas 15, 20 e 25 °C (Tabela 13, Reações 7-15).

Sendo assim, decidiu-se determinar somente a curva de crescimento desta bactéria (Figura 15), utilizando a mesma metodologia aplicada na determinação da curva de crescimento da *Flavobacterium* sp.

A determinação da curva de crescimento da *Flavobacterium* sp. e *Arthrobacter* sp., foi realizado devido estas bactérias serem isoladas de regiões psicrófilas, em que abrigam micro-organismos psicrófilos e psicrótrófos.

Figura 15: Análise espectrofotométrica da Densidade Óptica (D.O.) da cultura de *Arthrobacter* sp. Meio de cultura mínimo (600 mL), (R,S)-1-feniletanol (1 mmol/L), agitação 160 rpm.

Analisando a curva de crescimento da *Arthrobacter* sp. (Figura 15), pode-se verificar que o perfil de crescimento dessa bactéria foi semelhante para as três temperaturas, o que exclui a possibilidade de ser classificada como micro-organismo psicrófilo, no qual a temperatura máxima de crescimento é 20 °C. Sendo assim, pode-se classificar esta bactéria como psicrótrófica, já que a mesma apresentou um crescimento ótimo a 25 °C, estando na faixa de temperatura de crescimento dos psicrótrófos (≤ 5 a 40 °C) (MORITA, 1975; RUSSELL, 1990; FELLER *et al.* 1997b).

4- CONCLUSÕES

Podemos concluir que a metodologia de isolamento de bactérias utilizando um composto orgânico como indutor enzimático é uma importante ferramenta para a seleção de micro-organismos com a atividade enzimática desejada.

No estudo da influência do solvente e da concentração de substrato na reação de oxidação, concluiu-se que o melhor solvente foi DMF, uma vez que com etanol houve uma diminuição significativa da conversão, e a melhor concentração de substrato foi 5 mmol/L.

As amostras de solo e sedimento da Antártica forneceram 232 micro-organismos e as amostras de solo do PETAR forneceram 130 micro-organismos (após a metodologia de isolamento induzido com (*R,S*)-1-(fenil)etanol usado durante o crescimento dos micro-organismos).

Os 232 micro-organismos psicofílicos/psicrotróficos isolados de amostras de solo/sedimento da Antártica foram testados em reação de oxidação enantiosseletiva de alcoóis. 15 micro-organismos apresentaram álcool desidrogenases que catalisaram a oxidação do enantiômero (*S*) do álcool racêmico à sua correspondente cetona. Portanto, o (*R*)-álcool permaneceu intacto e com elevado excesso enantiomérico (até > 99 %). No caso do estudo com as amostras de solo provenientes do PETAR, 130 micro-organismos mesofílicos testados em reação de oxidação enantiosseletiva de alcoóis, 11 micro-organismos apresentaram álcool desidrogenases que catalisaram a oxidação do enantiômero (*S*) do álcool racêmico à sua correspondente cetona. Portanto, o (*R*)-álcool permaneceu intacto e com elevado excesso enantiomérico (até > 99 %) e 6 micro-organismos continham álcool desidrogenases que catalisou a oxidação do enantiômero (*R*) do álcool racêmico à sua correspondente cetona.

Com a otimização das reações de oxidação enantiosseletiva utilizando a *Flavobacterium* sp. observou-se que a bactéria tem uma excelente atividade enzimática com temperaturas de crescimento bacteriano e reação a 25 °C e 10 °C. respectivamente.

Com a otimização das reações de oxidação enantiosseletiva utilizando a *Arthrobacter* sp. observou-se que a bactéria tem uma excelente atividade enzimática em temperaturas de crescimento bacteriano e reação a 20 °C.

Após o acompanhamento das curvas de crescimento da *Flavobacterium* sp. e *Arthrobacter* sp., juntamente com a otimização das reações de oxidação foi possível classificá-las como psicotróficas, pois a melhor temperatura de crescimento bacteriano foi a 25 °C e 20 °C respectivamente.

5. PARTE EXPERIMENTAL

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Química Fina e Biocatálise (LQFB) do Instituto de Química- Universidade de São Paulo (IQ-USP)- São Paulo e no Módulo de Química na Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF)- Antártica.

5.1- SOLVENTES E REAGENTES

Os reagentes e solventes utilizados no desenvolvimento do trabalho estão representados na Tabela 14.

Tabela 14: Relação dos reagentes e solventes utilizados com as respectivas procedências e grau de pureza.

Reagentes	Procedência	Pureza (%)
Ácido acético	Vetec	P.A
Ágar	Oxoid	-
Acetofenona	Aldrich	98
Borohidreto de sódio	Aldrich	P.A
Cloreto de amônio	Synth	P.A
Diclorometano	Fmaia	P.A
Dimetilformamida	CRQ	99
Dextrose	Oxoid	-
Extrato de carne	Oxoid	-
Fosfato de sódio dibásico	Synth	99
Fosfato de Potássio monobásico	Merck	99,5
Fosfato de potássio dibásico	Merck	98
Metanol	Qhemis	P.A
Peptona	Oxoid	-
Propanona	Qhemis	P.A
Sulfato de magnésio	Merck	99,5

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1- MATERIAIS E EQUIPAMENTOS QUE FORAM UTILIZADOS:

- Espectros de RMN foram obtidos em aparelhos de Ressonância Magnética Nuclear Bruker DRX 300 e 500 ou Varian Gemini 200 e 300. O solvente utilizado foi o clorofórmio deuterado (CDCl_3). Os deslocamentos químicos (δ) para RMN ^1H estão referenciados ao padrão interno tetrametilsilano (0 ppm). E para RMN ^{13}C os deslocamentos químicos estão referenciados ao clorofórmio deuterado (77,0 ppm). Deslocamentos químicos estão apresentados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz;
- Cromatógrafo a gás CG/DIC da marca Shimadzu GC-17A equipado com um autoinjeter AOC20i e uma coluna capilar quiral de ciclodextrina (Chirasil-Dex CB β -cyclodextrin; 25 m x 0,25 mm);
- Para medida da rotação óptica foi utilizado o polarímetro de marca Jasco DIP-378 (cubeta de 1 dm);
- Os espectros de massa foram obtidos em um CG/EM da marca Shimadzu P5050A equipado com coluna capilar de sílica fundida da marca J&W Scientific DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm);
- Os espectros no infravermelho foram obtidos em um espectrômetro BOMEM MB 100, as frequências de absorção estão expressas em cm^{-1} ;
- Os solventes foram utilizados com grau de pureza P.A ou destilados conforme a necessidade seguindo procedimentos descritos em literatura (ARMAREGO, 1996);
- Capela de fluxo laminar Fisher Hamilton *Class II Biological Safety Cabinet*.
- Placas de cromatografia em camada delgada (folhas de alumínio 60 F₂₅₄ Merck);

- Autoclave Vertical Phoenix para esterilização de matérias e vidrarias;
- Incubadora refrigerada com agitação Tecnal TE-421;
- Sílica (230-400 mesh) para cromatografia em coluna;
- Espectrofotômetro BIOSPECTRO - modelo SP-220.
- Microscópio TECNAL – modelo Bell photonics.
- Centrífuga HERMLE Z200A.

MÉTODO DE ANÁLISE EM CG/EM

Fluxo total de H₂: 42 mL/min, Coluna DB5-MS 30 m x 0,25 mm x 1 µm –
Temperaturas: Injetor = 270 °C; Detector = 270 °C; Coluna 100 °C, 10 °C/minuto até
250 °C, total 55 minutos.

5.3- OBTENÇÃO DOS ÁLCOOIS RACÊMICOS

5.3.1- PREPARO DOS ALCOÓIS SECUNDÁRIOS DERIVADOS DO (R,S)-1-(FENIL)ETANOL 7-12

Em um balão de 250 mL, adicionou-se 30 mmol da correspondente cetona, 60 mL de metanol e lentamente (sob banho de gelo) 33 mmol (1,25 g) de boro-hidreto de sódio. A reação foi realizada sob agitação orbital e à temperatura ambiente, o progresso da reação foi acompanhado por cromatografia em camada delgada. Após consumo do material de partida, o metanol foi removido por evaporação a vácuo. Seguiu-se adicionando 60 mL de água destilada e o ajuste do pH para 6 foi realizado com ácido clorídrico 1 mmol/L.

A extração foi realizada em funil de separação com diclorometano (3 vezes de 50 mL). A fase orgânica resultante foi secada com sulfato de magnésio anidro e o

solvente removido a vácuo. O produto foi purificado, conforme a necessidade, em coluna contendo sílica gel, usando misturas de *n*-hexano e acetato de etila como eluente. Os rendimentos obtidos para os álcoois **7-12** foram: (*R,S*)-**7a** (87 %); (*R,S*)-**8a** (71 %); (*R,S*)-**9a** (98 %); (*R,S*)-**10a** (95 %); (*R,S*)-**11a** (94 %); (*R,S*)-**12a** (77 %).

Esses compostos foram utilizados como reagentes na etapa de avaliação enzimática e como padrões racêmicos para acompanhamento e determinação da enantiosseletividade das reações biocatalisadas.

1-feniletanol (**7**)

IV (KBr) cm^{-1} : 3364, 3063, 2974, 1603, 1586, 1494, 1453, 1073.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7,35-7,22 (m, 5H); 4,83 (q, $J = 6,6$ Hz, 1H); 2,25 (s, 1H); 1,46 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ ppm: 146,0; 128,6; 127,6; 125,6; 70,5; 25,3.

EM m/z (intensidade relativa %): 122 (39), 107 (100), 79 (62), 77 (30), 43 (13).

Método de análise CG/DIC: (H_2 , 100 kPa, Coluna Chirasil-Dex CB)- Temperatura do injetor 220 °C; temperatura do detector 220 °C; isoterma: 117 °C-7 minutos, t_R (min) = tempo de retenção: enantiômeros- *R* = 5,68 min; enantiômero *S* = 6,07 min.

1-(4-metilfenil)-etanol (8)

IV (KBr) cm^{-1} : 3364, 3023, 2973, 1514, 1451, 1369, 1089, 818.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7,24 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 7,07 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 4,83 (q, $J = 6,4$ Hz, 1H); 2,33 (s, 3H); 2,05 (s, 1H); 1,46 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ ppm: 141,9; 136,0; 128,1; 124,3; 69,2; 24,0; 20,3.

EM m/z (intensidade relativa %): 136 (38), 121 (71), 93 (100), 91 (70), 77 (42), 65 (19), 43 (50).

Método de análise CG/DIC: (H_2 , 100 kPa, Coluna Chirasil-Dex CB)- Temperatura do injetor 220 °C; temperatura do detector 220 °C; isoterma: 113 °C-12 minutos, t_R (min) = tempo de retenção: enantiômeros- $R = 9,45$ min; enantiômero $S = 10,84$ min.

1-(4-metóxfenil)-etanol (9)

IV (KBr) cm^{-1} : 3392, 3034, 2972, 1613, 1586, 1513, 1463, 1368, 1089, 832.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7,27 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H); 6,87 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H); 4,82 (q, $J = 6,5$ Hz, 1H); 3,78 (s, 3H); 1,46 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 159,1; 138,2; 126,8; 114,0; 70,1; 55,4; 25,2.

EM m/z (intensidade relativa %): 152 (32), 137 (100), 109 (41), 94 (15), 77 (14), 43 (9).

Método de análise CG/DIC: (H₂, 100 kPa, Coluna Chirasil-Dex CB)- Temperatura do injetor 220 °C; temperatura do detector 220 °C; isoterma: 119 °C-15 minutos, *t_R* (min) = tempo de retenção: enantiômeros- *R* = 9,37 min; enantiômero *S* = 10,85 min.

1-(4-clorofenil)-etanol (10)

IV (KBr) cm⁻¹: 3360, 3027, 2975, 1579, 1493, 1370, 1089, 829, 778.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7,32-7,26 (m, 4H); 4,84 (q, *J* = 6,5 Hz, 1H); 2,17 (s, 1H); 1,45 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ ppm: 144,5; 133,2; 128,8; 127,0; 69,9; 25,4.

EM *m/z* (intensidade relativa %): 158 (10), 156 (31), 143 (33), 141 (100), 121 (14), 113 (27); 77 (41); 43 (12).

Método de análise CG/DIC: (H₂, 100 kPa, Coluna Chirasil-Dex CB)- Temperatura do injetor 220 °C; temperatura do detector 220 °C; isoterma: 130 °C-10 minutos, *t_R* (min) = tempo de retenção: enantiômeros- *R* = 6,78 min; enantiômero *S* = 7,47 min.

1-(4-bromofenil)-etanol (11)

IV (KBr) cm⁻¹: 3364, 2974, 2874, 1593, 1490, 1449, 1370, 1087, 825, 537.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7,45 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H); 7,22 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H); 4,83 (q, *J* = 6,4 Hz, 1H); 2,05 (s, 1H); 1,45 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ ppm: 145,0; 131,7; 127,3; 121,3; 69,9; 25,4.

EM m/z (intensidade relativa %): 202 (29), 200 (30), 187 (94), 185 (100), 159 (25), 157 (30); 121 (17); 77 (34); 43 (11).

Método de análise CG/DIC: (H_2 , 100 kPa, Coluna Chirasil-Dex CB)- Temperatura do injetor 220 °C; temperatura do detector 220 °C; isoterma: 135 °C-11 minutos, t_R (min) = tempo de retenção: enantiômeros- R = 8,83 min; enantiômero S = 9,64 min.

1-(4-nitrofenil)-etanol (12)

IV (KBr) cm^{-1} : 3399, 2977, 2865, 1520, 1347, 1091, 856.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 8,19 (d, J = 8,8 Hz, 2H); 7,54 (d, J = 8,8 Hz, 2H); 5,02 (q, J = 6,5 Hz, 1H); 2,30 (s, 1H); 1,52 (d, J = 6,5 Hz, 3H).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 153,3; 147,3; 126,3; 123,9; 69,6; 25,7.

EM m/z (intensidade relativa %): 167 (1), 152 (100), 107 (36), 77 (20), 43 (11).

Método de análise CG/DIC: (H_2 , 100 kPa, Coluna Chirasil-Dex CB)- Temperatura do injetor 220 °C; temperatura do detector 220 °C; isoterma: 150 °C-20 minutos, t_R (min) = tempo de retenção: enantiômeros- R = 16,07 min; enantiômero S = 18,01 min.

5.4- ISOLAMENTO INDUZIDO DE MICRO-ORGANISMOS DE SOLO

Esta parte foi dividida em três etapas: coleta, enriquecimento e o isolamento dos micro-organismos.

- ETAPA 1: COLETA

Foram coletadas amostras de solos e sedimentos nas regiões da Baía do Almirantado na Ilha Rei George, Antártica e amostras de solos no Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR) situado na cidade de Iporanga no estado de São Paulo, local de Mata Atlântica.

Em cada ponto de coleta de solo do Petar, retirou-se a camada superficial de matéria orgânica (aproximadamente 2 cm) e nas amostras de solo da Antártica, pegou-se o solo entre rochas; abriu-se o frasco para armazenar a amostra próxima ao solo e, com a ajuda de uma espátula, o solo foi coletado e colocado nos tubos que eram tampados imediatamente. Da mesma forma foram coletadas amostras de sedimento lacustre às margens dos lagos. Todo o material utilizado na coleta era previamente esterilizado.

Já a coleta de sedimento marinho foi realizada de áreas profundas da Baía do Almirantado e Estreito de Bransfield, com o apoio do comando e da tripulação do NApOc Ary Rongel. Para as coletas o grupo de pesquisadores do projeto MABIREH (coordenado pela professora Lucia de Siqueira Campos, UFRJ) utilizou o guincho principal de popa para a operação com o Box Corer (peso total 360 Kg) e pegador van Veen para as coletas de sedimento. O sedimento trazido por estes equipamentos foi transferido, com auxílio de uma colher estéril, a tubo falcon estéril. As amostras foram identificadas de acordo com o local de coleta.

O material utilizado na coleta e armazenamento das amostras foram previamente esterilizado e as amostras armazenadas sob refrigeração (-20 °C). A localização geográfica de cada ponto de coleta foi aferida com o uso de GPS (Tabela 15 e 16).

Tabela 15: Locais de coletas na Antártica

Locais de coletas	Amostra	Coordenadas geográficas
Baleia 1	BAL1	21E 0427302 UTM 3115830
Baleia 2	BAL2	21E 0427300 UTM 3115849
Baleia 3	BAL3	21E 0427300 UTM 3115849
Entre Baleia e Yellow Point	EBYP	21E 0427098 UTM 3116249
Entre Geleira e Refúgio 2	EGR	21E 0425986 UTM 3117583
Geleira (após Refúgio 2) 1	GEL1	21E 0426110 UTM 3118275
Geleira (após Refúgio 2) 2	GEL2	21E 0426110 UTM 3118275
Refúgio 2 - 1	REF2.1	21E 0425874 UTM 3116786
Refúgio 2 - 2	REF2.2	21E 0425886 UTM 3116798
Ipanema	IPA	21 E 0425948 UTM 3115426
Yellow Point	YP	21 E 0427103 UTM 3116697
Próximo a Yellow Point	PYP	21 E 0427119 UTM 3116639
Machu Picchu 1	MP1	21E 0423411 UTM 3114431
Machu Picchu 2	MP2	21 E 0423394 UTM 3114505

Tabela 15 continuação

Locais de coletas	Amostra	Coordenadas geográficas
Punta Hanekin 1	HK1	21 E 0427387 UTM 3111746
Punta Hanekin 2	HK2	21 E 0427391 UTM 3111748
Punta Hanekin 3	HK3	21 E 0427680 UTM 3111880
Punta Hanekin 4	HK4	21 E 0427407 UTM 3112059
Arctowski	AK	21 E 0423807 UTM 3106862
Demay Point 1	DP1	21 E 0425205 UTM 3100486
Demay Point 2	DP2	21 E 0425211 UTM 3100473
Botany Point	BOT	21E 424432 UTM 3092107
Botany Point	BOTS	21E 424432 UTM 3092107
Stenhouse	SH	21E 425419 UTM 3110733
Machu Picchu Sedimento 2	MPS2	21 E 0423360 UTM 3114361
Machu Picchu Sedimento 4	MPS4	21E 0423369 UTM 3114440
Machu Picchu Sedimento 6	MPS6	21 E 0423426 UTM 3114420
Machu Picchu Sedimento 8	MPS8	21E 0423454 UTM 3114349
Sedimento marinho, profundidade 300 m (1)	1B(300)	21E 425994 UTM 3112913
Sedimento marinho, profundidade 300 m (2)	2B(300)	21E 422565 UTM 3108781
Sedimento marinho, profundidade 500 m (1)	1B(500)	21E 427369 UTM 3105668
Sedimento marinho, profundidade 500 m (2)	3B(300) 2B(500)	21E 427369 UTM 3105668

Tabela 15 continuação.

Locais de coletas	Amostra	Coordenadas geográficas
Sedimento marinho, profundidade 500 m (3)	3B(500)	21E 428928 UTM 3122386
Sedimento marinho, profundidade 500 m (3)	3B(500)	21E 428928 UTM 3122386
Sedimento marinho, profundidade 1100 m (1)	2B1(1100)	21E 435694 UTM 3093301
Sedimento marinho, profundidade 1100 m (2)	2B2(1100)	21E 432845 UTM 3092317
Refúgio 2	REFS.2.1	21E 0425874 UTM 3116786

Tabela 16: Locais de coletas no PETAR

Locais de coletas	Amostra	Coordenadas geográficas
Núcleo Santana 1	NS1	22J 732804 UTM 7284750
Núcleo Santana 2	NS2	22J 732823 UTM 7284757
Núcleo Santana 3	NS3	22J 732815 UTM 7284783
Núcleo Santana 4	NS4	22J 732802 UTM 7284814
Núcleo Santana 5	NS5	22J 732787 UTM 7284842
Núcleo Santana 6	NS6	22J 732581 UTM 7284877
Núcleo Santana 7	NS7	22J 732751 UTM 7284893
Núcleo Santana 8	NS8	22J 733110 UTM 7284748
Núcleo Santana 9	NS9	22J 733114 UTM 7284730

Tabela 16 continuação.

Locais de coletas	Locais de coletas	Locais de coletas
Núcleo Santana 10	NS10	22J 733026 UTM 7284764
Lage Branca 1	LB1	22J 731040 UTM 7282956
Lage Branca 2	LB2	22J 731030 UTM 7282940
Lage Branca 3	LB3	22J 730984 UTM 7282951
Lage Branca 4	LB4	22J 730986 UTM 7282937
Lage Branca 5	LB5	22J 730942 UTM 7282921

- TRANSPORTES UTILIZADOS NAS COLETAS DE AMOSTRAS

Navio Oceanográfico Ary Rongel

Lancha (SKUA)

Quadriciclos

Botes

- MATERIAIS DE COLETA

Pedador Van Veen

Box Corer

Espátula/Tubo de vidro

Tubo Falcon/Colher

5.4.1- PREPARO DA SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO UTILIZADA NAS REAÇÕES BIOCATALISADAS

Para obtenção da solução tampão fosfato (pH 7; 0,1 mol/L) foram preparadas duas soluções:

Solução 1: pesou-se 11,867 g de Na_2HPO_4 e diluiu-se em 1 L de água destilada.

Solução 2: pesou-se 9,078 g de KH_2PO_4 e diluiu-se em 1 L de água destilada.

A solução final de tampão fosfato com pH 7 (0,1 mmol/L) foi obtida misturando-se 60 % da solução 1 e 40 % (v/v) da solução 2 (v/v), o que deu o pH desejado.

5.4.2- PREPARO DA SOLUÇÃO DO INDUTOR

Preparou-se uma solução estoque de 100 mmol/L do composto (*R,S*)-1-feniletanol. Pesou-se 1 mmol do composto indutor [0.122 g do (*R,S*)-1-(fenil)etanol] e dissolveu-se em 20 mL de propanona. A solução foi então filtrada em membrana de porosidade 0,22 μm . Todo o material utilizado para o preparo da solução foi previamente autoclavado por 15 minutos a 120 °C. O indutor (*R,S*)-1-(fenil)etanol foi utilizado em todo o processo que envolveu o crescimento microbiano.

5.4.3- PREPARO DAS SOLUÇÕES DOS ÁLCOOIS RACÊMICOS

As soluções dos álcoois racêmicos foram preparadas em microtubos (2 mL). Para a solução de (15 mmol/L) foram diluídos 0,75 mmol dos substratos em 1 mL de *N,N*-dimetilformamida (DMF).

- ETAPA 2: ENRIQUECIMENTO

- MEIOS DE CULTURA

- Meio de cultura MCFE7 = (pH 5,6) = Indutor (1 mmol/L; (*R,S*)-1-(fenil)etanol - 1 mmol, 0,122 g, 120 µL), KH_2PO_4 (0,1 %; 1,0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,04 %; 0,4 g/L), NH_4Cl (0,04 %; 0,4 g/L), Dextrose (0,025 %; 0,25 g/L), Peptona (0,025 %; 0,25 g/L), ágar (2 %; 20,0 g/L; quando necessário).

- Meio de cultura MCBE7 (pH 7,0) = Indutor (1 mmol/L; (*R,S*)-1-(fenil)etanol - 1 mmol, 0,122 g, 120 µL), K_2HPO_4 (0,2 %; 2,0 g/L), KH_2PO_4 (0,1 %; 1,0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,04 %; 0,4 g/L), NH_4Cl (0,04 %; 0,4 g/L), Extrato de Carne (0,025 %; 0,25 g/L), Peptona (0,025 %; 0,25 g/L), ágar (2 %; 20,0 g/L; quando necessário).

- ETAPA 3: ISOLAMENTO

a) Pesou-se 2 g de solo em um béquer, acrescentou-se 20 mL de solução tampão (0,1 mmol/L) (pH 7) e agitou-se vigorosamente, deixou-se a amostra parada por 2 minutos para sedimentação. Transferiu-se 200 µL (Figura 16, Parte A) do sobrenadante para :

1- uma microplaca (24 poços, volume individual de 10 mL) contendo o meio de cultura MCFE7 e o (*R,S*)-1-(fenil)etanol (1 mmol/L) (2 mL em cada poço), foi inoculado em duplicata; microplaca I (Figura 16, Parte B).

2- uma microplaca (24 poços, volume individual de 10 mL) contendo o meio de cultura MCBE7 o (*R,S*)-1-(fenil)etanol (1 mmol/L) (2 mL em cada poço), foi inoculado em duplicata; microplaca II (Figura 16, Parte B). A escolha da composição química do meio de cultura MCFE7 teve como objetivo direcionar/induzir o isolamento de fungos, uma vez que esse tipo de micro-organismo cresce melhor em

meio levemente ácido. Já o meio mínimo de cultura MCBE7 foi escolhido para induzir o isolamento de leveduras e bactérias, que crescem melhor em pH = 7,0.

Manteve-se a microplaca contendo meio de cultura MCFE7 durante 4 dias e a microplaca contendo o meio de cultura MCBE7 durante 2 dias a 32 °C (micro-organismos PETAR, sob agitação orbital, 160 rpm) e 20 °C (micro-organismos da Antártica, sem agitação) para o crescimento de micro-organismos. Após esse tempo, iniciou-se o processo de isolamento dos micro-organismos dessa mistura (Figura 16, Parte C). Para isso retirou-se um volume de 100 µL dessa solução aquosa de cada poço contendo cultura/consórcio de microrganismos e transferiu-se (com auxílio de um pipetador) para uma placa de Petri contendo meio de cultura apropriado (MCFE7 ou MCBE7), espalhou-se o líquido com uma alça de vidro. A placa foi mantida em estufa a 32 °C (amostras do Petar) e a 20 °C (amostras da Antártica) por 2 dias (meio de cultura MCBE7) e por 4 dias (meio de cultura MCFE7).

Figura 16: Resumo da etapa de isolamento induzido de micro-organismos. (I) Microplaca contendo meio de cultura MCFE7. (II) Microplaca contendo meio de cultura MCBE7.

Após o crescimento dos micro-organismos, com o auxílio de uma alça de platina, retiraram-se amostras de cultura/consórcio de quatro regiões diferentes da placa de Petri e semeou-se em outra placa contendo meio de cultura apropriado, a partir de então, iniciou-se o isolamento das colônias através de repiques sucessivos até a obtenção de colônias puras (Figura 17). Durante todo o processo de manipulação de micro-organismos, realizados neste trabalho, foram adotados procedimentos de assepsia, tais como a flambagem da alça de platina antes e depois de ser usada para não haver contaminação, não tocar na tampa da placa de Petri com a mão, abrir as placas próximas ao bico de bunsen para evitar contaminação, dentre outros cuidados.

Figura 17: Repique de micro-organismos em placas de Petri com auxílio de uma alça de platina.

5.5- ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO TIPO DE CO-SOLVENTE NA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO

Neste ensaio, utilizou-se as microplacas contendo em cada poço 2 mL de meio de cultura e 200 μ L de pré-inóculo (Figura 18, Parte A). Para cada pré-inóculo foi retirado 750 μ L e transferido a eppendorf para preservação dos micro-organismos (Figura 18, Parte B). As microplacas foram mantidas em agitador orbital por 2 dias, pois utilizaram-se micro-organismos isolados com o meio MCBE7. Na seqüência, foram adicionados 40 μ L das soluções dos álcoois aromáticos **7-12** (5 mmol/L)

preparados utilizando etanol e DMF como co-solvente (Figura 18, Parte C). Após 3 dias de reação as culturas foram transferidas para tubos de ensaios e extraídas com éter *terc*-butil metílico. Uma alíquota da fase orgânica de cada reação foi analisada por cromatografia gasosa (Figura 18, Parte D). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.

Figura 18: Resumo da etapa de avaliação do espectro de atividade enzimática enantiosseletiva dos micro-organismos, realizadas em duplicatas. (I) Micro-organismo 1. (II) Micro-organismo 2.

5.6- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA (ADH) DOS MICRO-ORGANISMOS

A avaliação da atividade enzimática (álcool desidrogenases) dos micro-organismos ocorreu em cinco etapas: o pré-inóculo para reativar o micro-organismo; a incubação para crescimento microbiano para uso nas reações; reação e análise.

Pré-inóculo

Adicionou-se 20 mL de meio de cultura apropriado (MCFE7 ou MCBE7) à um erlenmeyer de 125 mL. O meio foi autoclavado por 15 minutos a 120 °C. Sob condições assépticas e em capela de fluxo laminar transferiu-se o micro-organismo da placa de Petri ao meio de cultura líquido (Erlenmeyer), com o auxílio de uma alça de platina e adicionou-se 200 µL da solução do indutor [(*R,S*)-1-(fenil)etanol, seção 5.4.4.1]. Incubou-se por tempo determinado (de acordo com o meio de cultura) a 32 °C (micro-organismos PETAR) e 20 °C (micro-organismos da Antártica) sob agitação orbital, 160 rpm.

Preservação dos micro-organismos

Retirou-se 750 µL do pré-inóculo e transferiu-se a um microtubo (2 mL) contendo 250 µL de solução glicerol/água (80 % v/v, glicerol), agitou-se e congelou-se a -20 °C.

Inóculo e Reação de Oxidação

Em microplacas (24 poços, volume individual de 10 mL) foram adicionados 2 mL de meio de cultura apropriado em cada poço juntamente com 20 µL da solução

do indutor [(*R,S*)-1-(fenil)etanol], seguido de incubação dos micro-organismos. Após o tempo de crescimento do micro-organismo (2 ou 4 dias, dependendo do meio de cultura) foram adicionados os álcoois aromáticos **7-12** (40 µL). Todas as reações foram realizadas em duplicatas.

5.6.1- ANÁLISE DAS REAÇÕES DE BIOCATÁLISE

Após o término da reação, adicionou-se de éter terc-butil metílico (2 mL) a cada poço da microplaca e extraiu-se a mistura reacional (fase aquosa). A mistura resultante foi transferida para um tubo falcon e centrifugada (1 min, 6000 rpm) para separação de fases. Transferiu-se 1 mL da fase orgânica a um frasco de vidro (2 mL) para análise em cromatografia gasosa (seção 5.3).

5.6.2. AVALIAÇÃO DAS REAÇÕES DE BIOCATÁLISE

As amostras foram analisadas em CG usando coluna com fase estacionária quiral como descrito na seção 5.3. O excesso enantiomérico dos compostos foi determinado por comparação cromatográfica. O excesso enantiomérico (ee) foi definido como a razão de $[S]-[R]/[S]+[R] \times 100\%$, em que [*R*] e [*S*] são as concentrações dos enantiômeros (*R*) e (*S*), respectivamente.

5.6.3. ATRIBUIÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ABSOLUTA DOS ALCÓOIS

As configurações absolutas das reações biocatalisadas foram atribuídas por correlação através dos picos dos cromatogramas com padrões enantiomericamente puros de (*S*)-1-feniletanol, (*S*)-1-(4-metilfenil)etanol, (*S*)-1-(4-metoxifenil)etanol, (*S*)-

1-(4-clorofenil)etanol, (S)-1-(4-bromofenil)etanol e (S)-1-(4-nitrofenil)etanol, disponíveis em nosso laboratório.

5.7- CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DE MICRO-ORGANISMOS

Para este propósito contamos com o apoio do grupo de pesquisa da Professora Dra. Vivian Pellizari do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP).

A identificação taxonômica das bactérias foi realizada através de sequenciamento do gene 16S do DNA ribossomal. Inicialmente, realizou-se a extração do DNA total bacteriano utilizando técnica descrita por Wilson (WILSON, 1989). A amplificação do gene 16S rDNA foi realizada utilizando os primer 27F e 1401R. O produto amplificado foi sequenciado no Centro de Estudo do Genoma Humano (USP). A análise filogenética do material obtido foi determinada por comparação com a base de dados pública *National Center for Biotechnology Information- NCBI* www.ncbi.nlm.nih.gov e *Robosomal Database Project II – RDB* <http://rdp.cme.msu.edu> (ALTSCHUL, *et al.* 1990; COLE, *et al.* 2003; COLE, *et al.* 2007).

5.8- OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE OXIDAÇÃO DA *FLAVOBACTERIUM* SP. E *ARTHROBACTER* SP.

Nesse caso, a metodologia empregada foi dividida em 4 etapas: pré-incubação, incubação, centrifugação/ressuspensão das células e reação. As temperaturas analisadas foram 5, 10, 15, 20, 25 e 30 °C.

Pré-inóculo: Ativação dos micro-organismos

Para cada bactéria foram preparados 60 mL de meio de cultura MCBE7 em um erlenmeyer de 250 mL. O meio foi autoclavado por 15 minutos a 120 °C. Sob condições assépticas e em capela de fluxo laminar transferiu-se o micro-organismo da placa de Petri ao meio de cultura líquido, com o auxílio de uma alça de platina e adicionou-se 600 µL da solução do indutor [(R,S)-1-(fenil)etanol]. Incubou-se por dois dias a 5, 10, 15, 20, 25 e 30 °C sob agitação orbital, 160 rpm (para cada temperatura foi preparado um pré-inóculo).

Inóculo: Crescimento dos micro-organismos para obtenção de massa celular

Foram preparados 600 mL de meio de cultura MCBE7, em um erlenmeyer de 2000 mL. O meio foi autoclavado por 15 minutos a 120 °C. Sob condições assépticas e em capela de fluxo laminar transferiu-se 60 mL de pré-inóculo ao meio de cultura, com o auxílio de uma proveta (100 mL) e adicionou-se 6000 µL da solução do indutor [(R,S)-1-(fenil)etanol]. Incubou-se por dois dias a 5, 10, 15, 20, 25 e 30 °C sob agitação orbital, 160 rpm (para cada temperatura foi preparado um inóculo).

Centrifugação/ressuspensão e reação: Obtenção das células das bactérias e ressuspensão em tampão fosfato

O meio de cultura com células em crescimento (600 mL) foi centrifugado a 10 °C por 20 minutos a 5000 rpm. Durante a centrifugação houve a formação de uma massa celular que ficou depositada no fundo do tubo da centrífuga, o sobrenadante foi retirado e as células foram ressuspensas em 60 mL de uma solução de tampão

fosfato, pH 7. A solução resultante (60 mL) foi distribuída, igualmente, em 6 erlenmeyer de 125 mL, 10 mL em cada um. Adicionaram-se 200 µL da solução do substrato [(R,S)-1-(4-metilfenil)etanol, 1 mmol/L] a cada erlenmeyer. A reação foi mantida por 24, 48 e 72 horas a 5, 10, 15, 20, 25 e 30 °C sob agitação orbital, 160 rpm. Cada reação foi realizada em duplicata.

Após o término de cada reação foi extraída a fase aquosa, com éter *terc*-butil metílico (4 mL) sendo transferida a mistura resultante para um tubo falcon e centrifugada (1min, 6000 rpm). A análise da fase orgânica foi realizada conforme o item 5.3.

5.8.1- CRESCIMENTO DA *FLAVOBACTERIUM* SP. A 15 E 25 °C EM DIFERENTES TEMPERATURAS REACIONAIS

Para verificar a influência da temperatura de crescimento da *Flavobacterium* sp. em 15 e 25° C na atividade enzimática, empregou-se a mesma metodologia utilizada no item 5.7, em que as temperaturas e tempos reacionais permaneceram os mesmos.

5.8.2- DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DA *FLAVOBACTERIUM* SP. E *ARTHROBACTER* SP.

A metodologia empregada foi dividida em 3 etapas: pré-incubação, incubação e determinação da absorbância. As temperaturas analisadas foram 15, 20 e 25 °C.

Pré-inóculo: Ativação dos micro-organismos

Para cada bactéria foram preparados 100 mL de meio de cultura MCBE7 em

um erlenmeyer de 250 mL. O meio foi autoclavado por 15 minutos a 120 °C. Sob condições assépticas e em capela de fluxo laminar transferiu-se o micro-organismo da placa de Petri ao meio de cultura líquido, com o auxílio de uma alça de platina e adicionou-se 1000 µL da solução do indutor [(R,S)-1-(fenil)etanol]. Incubou-se por dois dias a 15, 20 e 25 °C sob agitação orbital, 160 rpm (para cada temperatura foi preparado um pré-inóculo).

Inóculo: Crescimento dos micro-organismos para obtenção de massa celular

Foram preparados 1000 mL de meio de cultura MCBE7, em um erlenmeyer de 2000 mL. O meio foi autoclavado por 15 minutos a 120 °C. Sob condições assépticas e em capela de fluxo laminar transferiu-se 100 mL de pré-inóculo ao meio de cultura e adicionou-se 10000 µL da solução do indutor [(R,S)-1-(fenil)etanol]. Incubou-se a 15, 20 e 25 °C sob agitação orbital, 160 rpm (para cada temperatura foi preparado um inóculo).

Determinação da absorbância

A cada 2 horas, 1 mL do inóculo foi retirado e transferido a uma cubeta de 1 mL, sob condições assépticas e em capela de fluxo laminar, onde determinou-se a absorbância, através da análise espectrofotométrica da Densidade Óptica (D.O) em um comprimento de onda de 600 nm. Este procedimento foi repetido no decorrer de 72 horas. Para cada bactéria a determinação da curva de crescimento foi realizada em duplicata.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAIR, G. R. A.; WILLIAMS, J. M. J. A novel ruthenium catalysed deracemisation of alcohols. *Chemical Communications*. **2005**, 44, 5578-5579.

ADHIKARI, A. K.; SINGHAL, O. P. Effect of heat resistant micro-organisms on the fatty acid profile and the organoleptic quality of UHT milk during storage. *Journal of Dairy Science*. Indian, **1992**, v.45, p.272-277.

AGRANAT, I.; CARNER, H.; CALDWELL, J. Putting chirality to work: The strategy of chiral. **1994**, p.120-123.

ALLAN, G.R.; CARNELL, A.J. *Journal of Organic Chemistry*. **2001**, 66, 6495-6497.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. **1990**, 215, 403-410.

ARMAREGO, W. L. F.; PERRIN, D. D. Purification of laboratory chemicals. 4^a ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, **1996**.

ASANO, Y. Overview of screening for new microbial catalysts and their uses in organic synthesis-selection and optimization of biocatalysts. *Journal of Biotechnology*. **2002**, 94, 65-72.

BAKOS, J.; TOTH, I.; HEIL, B.; MARKO, L. A facile method for the preparation of 2,4-bis(diphenylphosphino)pentane (BDPP) enantiomers and their application in asymmetric hydrogenation. *Journal of Organometallic Chemistry*. **1985**, 279, 23-29.

BARBIERI, A. J. *Depósitos minerais secundários das cavernas Santana, Pérolas e Lage Branca, município de Iporanga*. 1993. 96 p. (Dissertação de Mestrado) - Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. **1993**.

BAUER, R.; HIRRLINGER, B.; LAYH, N.; STOLZ, A.; KNACKMUSS, H. J. Enantioselective hydrolysis of racemic 2-phenylpropionitrile and other (R,S)-2-arylpropionitriles by a new bacterial isolate, *Agrobacterium tumefaciens* strain d3. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **1994**, 42, 1-7.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T. *Biology of Microorganisms*. 6^a ed. *Prentice Hall, Englewood Cliffs*. New Jersey, **1991**.

BROWN, H. C.; RAMACHANDRAN, P. V. Asymmetric reduction with chiral organoboranes based on alpha-pinene. *Accounts of Chemical Research*. **1992**, 25, 16-24.

BRUICE, P. Y. *Organic Chemistry*, 2^a ed. *Prentice Hall*: New Jersey, **1998**.

BURKHARDT, E. R.; MATOS, K. Boron reagents in process chemistry: excellent tools for selective reductions. *Chemical Reviews*. **2006**, 106, 2617-2650.

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

CAPPUCCINO, J. G.; SHERMAN, N. *Microbiology: A Laboratory Manual*. 4^a ed. *The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.*, Menlo Park, California, **1996**.

CARDENAS, F.; ALVAREZ, E.; CASTRO-ALVAREZ, M. S.; SANCHEZ MONTERO, J. M.; VALMASEDA, M.; ELSON, S.W.; SINISTERRA, J. V. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2001**, *14*, 111-123.

CAVICCHIOLI, R.; THOMAS, T.; CURMI, P. M. G. Cold stress response in archaea. *Extremophiles*. **2000**, *4*, 321-331.

COLE, J. R.; CHAI, B.; FARRIS, R. J. ; WANG, Q.; KULAM-SEYDMOHIDEEN, A. S.; MCGARREL, D. M.; BANDELA, A. M.; CARDENAS, E.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Research*. **2007**, *35* (Database Iss), D169-D172.

COLE, J. R.; CHAI, B.; MARSH, T. L. ; FARRIS, R. J. ; WANG, Q. ; KULAM-SEYDMOHIDEEN, A. S.; CHANDRA, S.; MCGARREL, D. M.; SCHMIDT, T. M.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Research*. **2003**, *31*, 442-443.

CSUK, R.; GLANZER, B. I. Bakers Yeast Mediated Transformations in Organic Chemistry. *Chemical Reviews*. **1991**, *91*, 49-97.

DEMIR, A.S.; HAMAMCI, H.; SESENOGLU, O.; NESLIHANOGLU, R.; ASIKOGLU, B.; CAPANOGLU, D. *Tetrahedron Letters*. **2002**, *43*, 6447-6449.

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

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

FABER, K. Biotransformations in Organic Chemistry; 3^a ed. *Springer-Verlag*. Berlin, Heidelberg, **1997**.

FABER, K.; KROUTIL, W. New enzymes for biotransformations. *Current Opinion in Chemical Biology*. **2005**, 9, 181–187.

FABER, K. Non-sequential processes for the transformation of a racemate into a single stereoisomeric product: proposal for stereochemical classification. *Chemistry-A European Journal*. **2001**, 7, 5004-5010.

FELLER G, D'AMICO D.; GERDAY, C. Thermodynamic stability of a cold-active α -amylase from the Antarctic bacterium *Alteromonas haloplanctis*. *Biochemistry* **1999**, 38, 4613-4619.

FELLER G, GERDAY C. Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. *Cellular and Life Sciences*. **1997a**, 53, 830–841.

FELLER, G.; ARPIGNY J. L.; NARINX, E.; GERDAY, C. Molecular adaptations of enzymes from psychrophilic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **1997b**, 118, 495-499.

FERREIRA, J. P. M, Segredos da catálise enzimática. Boletim de Biotecnologia. Universidade Católica Portuguesa, Porto, p.2-29, **2002**.

GERDAY, C.; AITTALEB, M.; ARPIGNY, J. L.; BAISE, E.; CHESSA, J. P.; GARSOUX, G.; PETRESCU, I.; FELLER, G. Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2000**, 1342, 119-31.

GOUNO, T. A. M. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. *Nederlands Melk en Zuiveltijds*, Chicago. **1986**, 42, 1192-1197.

GRIFFITHS, M. W. Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp present in milk. *Journal of Food Protection*, Ames. **1990**, 59, 790-792.

HALGAS, J. Biocatalysts in Organic Synthesis, *Elsevier*: Amsterdam, **1992**.

HO, TSE-LOK; Enantioselective Synthesis – Natural Products From Chiral Terpenes, *John Wiley & Sons, Inc.*: New York, **1992**.

JAY, J.M. Microbiología moderna de los alimentos. 3ª ed. *Zaragoza*: Acribia. **1994**. 804p.

KAGAN, H. B. Em Comprehensive Organometallic Chemistry; Wilkinson, G; Stone, G. A., eds.; *Pergamon Press*: London, **1982**, vol. 8, cap. 53.

KIM, M. J.; KIM, H. M.; KIM, D.; AHN, Y.; PARK, J. Dynamic kinetic resolution of secondary alcohols by enzyme-metal combinations in ionic liquid. *Green Chemistry*. **2004**, 6, 471 – 474.

KROUTIL, W.; MANG, H.; KLAUS, E.; FABER, K. Biocatalytic Oxidation of Primary and Secondary Alcohols. *Advanced Synthesis & Catalysis*. **2004a**, 346, 125-142.

KROUTIL, W.; MANG, H.; KLAUS, E.; FABER, K. Recent advances in the biocatalytic reduction of ketones and oxidation of sec-alcohols. *Current Opinion in Chemical Biology*. **2004b**, 8, 120-126.

KROUTIL, W.; MISCHITZ, M.; FABER, K. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1*. **1997**, 3629-3636.

KROUTIL, W.; FABER, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9, 2901-2913.

LASA, I.; BERENGER, J. Thermophilic enzymes and their biotechnological potential. *Microbiologia*. **1993**, 9, 77-89.

LAYH, N.; HIRRLINGER, B.; STOLZ, A.; KNACKMUSS, H.-J. Enrichment strategies for nitrile-hydrolyzing bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **1997**, 47, 668-674.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK D. P. Brock Biology of Microorganisms, 12^a ed. Hardbound. **2003**.

MIDLAND, M. M.; Asymmetric reductions with organoborane reagents. *Chemical Reviews*. **1989**, 89, 1553-1561.

MIYAMOTO, K.; HIRANO, J.; OHTA, H. Efficient oxidation of alcohols by a 2-phenylethanol-degrading *Brevibacterium* sp. *Biotechnology Letters*. **2004**, 26, 1385-1388.

MORI, K. Pheromones: synthesis and bioactivity. *Chemical Communications*. **1997**, 13, 1153-1158.

MORITA, R.Y. Psychrophilic bacteria. *Microbiology Reviews*. **1975**, 39, 144-167.

NAEMURA, K.; MURATA, M.; TANAKA, R.; YANO, M.; HIROSE, K.; TOBE, Y. Enantioselective acylation of primary and secondary alcohols catalyzed by lipase QL from *Alcaligenes* sp.: a predictive active site model for lipase QL to identify which enantiomer of an alcohol reacts faster in this acylation. *Tetrahedron: Asymmetry*. **1996**, 7, 3285–3294.

NAKAMURA, K.; KAWAI, Y.; NAKAJIMA, N.; OHNO, A. Stereochemical control of microbial reduction. 17. A method for controlling the enantioselectivity of reductions with bakers' yeast. *Journal of Organic Chemistry*. **1991**, 56, 4778-4783.

NAKAMURA, K.; YAMANAKA, R.; MATSUDA, T.; HARADA, T. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2003**, 14, 2659-2681.

NATARAJAN, R.; BASAK, S. C. Numerical characterization of molecular chirality of organic compounds. *Current Computer-Aided Drug Design*. **2009**, *5*, 13-22.

NI, Y.; XU, J.-H. Asymmetric reduction of aryl ketones with a new isolate *Rhodotorula* sp. AS2.2241. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2002**, *18*, 233-241.

NOYORI, R. Asymmetric Synthesis of Natural Products. *John Wiley & Sons, Inc.*: New York, **1994a**.

NOYORI, R. Asymmetric Catalysis in Organic Synthesis, *John Wiley & Sons, Inc.*: New York, **1994b**.

NOYORI, R.; OHKUMA, T. Asymmetric Catalysis by Architectural and Functional Molecular Engineering: Practical Chemo- and Stereoselective Hydrogenation of Ketones. *Angewandte Chemie International Edition*. **2001**, *40*, 40- 73.

NOYORI, R. Catalytic asymmetric synthesis. *Yuki Gosei Kagaku Kyokaishi* **1992**, *50*, 1131-1139.

ORRU, R.V.A.; KROUTIL, W.; FABER, K. *Tetrahedron Letters*. **1997**, *38*, 1753-1754.

PANKE, S.; HELD, M.; WUBBOLTS, M. Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*. **2004**, *15*, 272-279.

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

ROZZELL, J. D. Commercial scale biocatalysis: myths and realities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **1999**, 7, 2253-2261.

RUSSELL, N. J. Cold adaptation of microorganisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B*. **1990**, 326, 595-611.

SCHOMBURG, D.; SALZMANN, M. GFB-Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Enzyme Handbook. *Springer-Verlag*: Berlin, D, **1990**.

SHELDON, R. A.; Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds; *Marcel Dekker*. New York, **1993**.

SHEN, L. L.; WANG, F.; MUN, H. S.; SUH, M.; JEONG, J. H. Solvent-dependent reactivity in porcine pancreatic lipase (PPL)-catalyzed hydrolysis. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2008**, 19, 1647-1653.

SIMEO, Y.; SINISTERRA, J. V. Biotransformation of terpenoids: a green alternative for producing molecules with pharmacological activity. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*. **2009**, 6, 128-134.

SINGH, V. K. Practical and Useful Methods for the Enantioselective Reduction of Unsymmetrical Ketones. *Synthesis*. **1992**, 7, 605-617.

TANG, W. L.; ZHAO, H. Industrial biotechnology: Tools and applications. *Biotechnology Journal*. **2009**, 4, 1725-1739.

TEMBA, E. S. C.; OLIVEIRA, I. M. F.; DONNICI, C. L. Álcoois quirais: métodos químicos e catalíticos de obtenção por redução assimétrica. *Química Nova*, **2003**, 26,112-122.

THALL, E. When Drug Molecules Look in the Mirror. *Journal of Chemical Education*. **1996**, 73, 481-484.

TOMIOKA, K. Asymmetric synthesis utilizing external chiral ligands. *Synthesis*. **1990**, 2, 541-549.

TOMOKO, M.; YAMANAKA, R. NAKAMURA, K. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2009**, 20, 513-557.

VOSS, C. V.; GRUBER, C. C.; KROUTIL, W. A biocatalytic one-pot oxidation/reduction sequence for the deracemisation of a sec-alcohol. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2007**, 18, 276-281.

WARD, T. J.; BAKER, B. A. Chiral Separations. *Analytical Chemistry*. **2008**, 80, 4363-4372.

WILSON, K. Preparation of genomic DNA from bacteria. *In Current protocols in molecular biology*. Editado por F. M.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struhl, K. *John Wiley & Sons*, New York, **1989**, p. 2.4.1-2.4.2.

WYNN, D. D.; EDWARDS, H. G. M. Antarctic ecosystems as models for extraterrestrial surface habitats. *Planetary and Space Science*. **2000**, 48, 1065-1075.

YADAV, J. S.; NANDA, S.; THIRUPATHI REDDY, P.; BHASKAR RAO, A. Efficient enantioselective reduction of ketones with *Daucus carota* root. *Journal of Organic Chemistry*. **2002**, 67, 3900-3903.

ZHAO, X. L.; TSIGOS, I.; BOURIOTIS, V. J. P. Klinman. Impact of Protein Flexibility on Hydride-Transfer Parameters in Thermophilic and Psychrophilic Alcohol Dehydrogenases. *Journal of the American Chemical Society*. **2004**, 126, 9500-9501.