**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Química

CAMILA RODRIGUES DA SILVA

**Estudo de resolução cinética de álcoois secundários
utilizando reação de oxidação enantiosseletiva
mediada por bactérias**

Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

18/11/2009

CAMILA RODRIGUES DA SILVA

**Estudo de resolução cinética de álcoois secundários
utilizando reação de oxidação enantiosseletiva
mediada por bactérias**

*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

2009

Camila Rodrigues da Silva

**Estudo de resolução cinética de álcoois secundários utilizando
reação de oxidação enantiosseletiva mediada por bactérias**

*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

Tentei escolher a pessoa a qual eu ofereceria essa dedicatória.

Família, namorado, professores, amigos... e não consegui chegar a uma decisão.

Porque as pessoas entram e saem das nossas vidas,

e cada uma é diferente e especial à sua maneira,

porém as lembranças que deixam são eternas.

Eterna como eu desejaria que fosse essa dedicatória.

Por isso dedico a TODAS as pessoas que fizeram e fazem a diferença na minha vida,

a todos que me fizeram ou me fazem feliz.

Agradecimentos

Não é simplesmente agradecer que gostaria, porém não é simples dizer em palavras tudo o que sinto por todos aqueles que me aconselharam, orientaram, motivaram, cuidaram, ouviram, protegeram e colaboraram ao longo desta fase tão importante da minha vida. Agradecer a todos não é tarefa fácil, o maior perigo não está em quem incluir e sim em quem não mencionar. Mas vou tentar, portanto agradeço sinceramente:

À minha família, por existirem na minha vida.

Ao Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade, pela oportunidade, orientação e por sua paciência ao longo do mestrado.

Ao Prof. Dr. João Lago, por suas excelentes aulas, por me fazer ver a Química com outros olhos.

A Edna, que me recepcionou com toda boa vontade quando iniciei o mestrado, que me ensinou e ajudou em diversos momentos, devo muita gratidão.

Aos integrantes do laboratório, a todos teria muito o quê dizer e muito a agradecer. Essa dissertação, sem dúvida, tem contribuições diretas ou indiretas de cada um: Thiago, Priscila, Caterina, Lidiane, Lya, Natássia, Piovan, Thaís, e também ao Heitor e ao Jasqué, que de uma forma ou de outra também são integrantes do LQFB. E não poderia deixar de destacar uma amizade que transpôs os muros da Universidade, um amigo de verdade para todas as horas: Alexandre.

Ao pessoal do grupo do Prof. Dr. Comasseto, pela ajuda com o “Massas” e algumas sugestões para o desenvolvimento do trabalho.

As pessoas que trabalham comigo na CETESB e que me deram força quando eu não estava muito animada ou cansada demais para seguir em frente, por suas palavras de apoio, pela atenção, carinho e consideração, e pelas contribuições químicas de anos de experiência

prática e excelência profissional. Ao Prof. Dr. Gilson, Jésner, Dra. Maria, Rose, Marcos, Neusa, Fátima, Vera e tantos outros que seria impossível nomear.

Incluo, de forma especial, o Sr. Pasquale, por ser um exemplo de vida, um exemplo de honestidade, por acreditar em mim e por toda ajuda que me proporcionou, alguém que sem saber é muito importante para mim.

À Heloísa, por diversos motivos, mas a verdade é: ela sabe o porquê.

Ao Prof. Dr. Massuo e Profa. Dra. Liliana por terem participado da banca de qualificação.

Aos funcionários da Secretaria da Pós-graduação e da Central Analítica.

E não posso me esquecer dos porteiros do IQ que zelaram pela minha segurança, de vez em quando verificando o laboratório para saber se estava tudo bem, nas madrugadas, sábados, domingos e feriados que passei dentro do Instituto.

Agradeço ao CNPQ e FAPESP pela ajuda financeira ao projeto e ao Instituto de Química.

Nada seria possível sem a ajuda dos que nos cercam e querem bem. A todos, meu muito obrigada.

Epígrafe

“A imaginação é mais importante que o conhecimento. Conhecimento auxilia por fora, mas só o amor socorre por dentro. Conhecimento vem, mas a sabedoria tarda.”

Albert Einstein

Resumo

Rodrigues, C. **Estudo de resolução cinética de álcoois secundários utilizando reação de oxidação enantiosseletiva mediada por bactérias**. 2009. 132 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Nesta dissertação de mestrado foram estudadas duas bactérias, *Sphingobacterium* sp e *Arthrobacter atrocyaneus*, produtoras de enzimas álcool desidrogenases que se mostraram capazes de catalisar reações de oxidação enantiosseletiva de alcoóis secundários racêmicos.

Inicialmente foram avaliados alguns parâmetros para a realização da resolução cinética do (RS)-1-feniletanol, assim como quantidade de substrato, biomassa das bactérias (*Sphingobacterium* sp e *Arthrobacter atrocyaneus*) e tempo reacional necessário para a oxidação completa de um dos enantiômeros do substrato. Nas reações com a bactéria *Sphingobacterium* sp (R1AC23) observou-se a presença de álcool desidrogenase com alta atividade catalítica, porém com moderada enantiosseletividade, pois em alguns casos observou-se a oxidação completa dos alcoóis *para*-substituídos derivados do (RS)-1-feniletanol a suas correspondentes cetonas.

Com o estudo das reações do (RS)-1-feniletanol e a bactéria *Arthrobacter atrocyaneus* (R1AF57) determinou-se os principais parâmetros reacionais para alcançar uma excelente resolução cinética. Sendo assim, aplicou-se essa metodologia para diferentes alcoóis secundários em dois meios reacionais diferentes: com células em crescimento e com células ressuspensas em tampão fosfato. A atividade catalítica foi mais eficiente com as células em crescimento com conversões próximas de 50% e excesso enantiomérico >99% na maioria dos casos, destacando-se os derivados do (RS)-1-feniletanol *para* e *meta* substituídos.

Empregou-se a *Arthrobacter atrocyaneus* em testes de resolução cinética dinâmica (RCD). Como durante as reações de oxidação um co-produto é uma cetona, estudou-se o emprego *in situ* do NaBH₄ como redutor desse composto. Com isso, tem-se um ciclo reacional de oxidação-redução. Sendo assim, por estereoinversão, foi possível alcançar rendimentos maiores que 50% do álcool enantiomericamente puro. Com o (*RS*)-1-(4-metilfenil)-etanol como substrato, obteve-se o álcool enantiomericamente puro com rendimento de 79% e excesso enantiomérico >99%.

Palavras-chave: Álcool desidrogenase, resolução cinética enzimática, resolução cinética dinâmica, álcool, biocatálise.

Abstract

Rodrigues, C. **Study of kinetic resolution of secondary alcohols by enantioselective oxidation mediated by bacteria.** 2009. 132 p. Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In this dissertation two bacterial strains were studied, *Arthrobacter atrocyaneus* and *Sphingobacterium* sp, which are alcohol dehydrogenases producers that were able to catalyse racemic secondary alcohols enantioselective oxidation.

Initially, some reaction parameters to carry out the kinetic resolution of (RS)-1-phenylethanol were evaluated, such as substrate amount, bacterial biomass (*Arthrobacter atrocyaneus* and *Sphingobacterium* sp) and the reaction time for complete oxidation of one enantiomer of the substrate. In the reactions with *Sphingobacterium* sp (R1AC23) was observed the presence of alcohol dehydrogenase with high catalytic activity and moderate selective. Therefore, in some cases, the total oxidation of the both enantiomers of (RS)-1-phenylethanol *para*-substitued derivatives to the corresponding ketones were observed.

By studying the reactions of (RS)-1-phenylethanol and *Arthrobacter atrocyaneus* (R1AF57), the reaction parameters to achieve excellent kinetic resolution were determined. Therefore, this methodology was applied to different secondary alcohols under two different reaction media: with growing cells and resting cells in phosphate buffer. The catalytic activity was more efficient with growing cells. The conversions were next to 50% and enantiomeric excess > 99% in most of the cases, especially those reactions with alcohols derived from (RS)-1-phenylethanol *para* and *meta* substituted.

Arthrobacter atrocyaneus was employed in dynamic kinetic resolution (DKR). As during the oxidation reactions, a ketone co-product is obtained, the use of NaBH₄ was studied

to reduce this compound *in situ*. Thus, an oxidation-reduction reactional cycle was achieved. Then, by estereoinversion it was possible to achieve yields higher than 50% of the pure enantiomerically alcohol. With (*RS*)-1-(4-methylphenyl)-ethanol as substrate, enantiomeric excess > 99% and yield 79% of pure enantiomerically alcohol was obtained.

Keywords: Alcohol dehydrogenase, enzymatic kinetic resolution, dynamic kinetic resolution, alcohol, biocatalysis.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ADH: Álcool desidrogenase

NB: Nutrient Broth

RCE: Resolução cinética enzimática

RCD: Resolução cinética dinâmica

sec: secundário

rac: racêmico

e.e.: excesso enantiomérico

conv.: conversão

DMF: Dimetil formamida

THF: Tetrahidrofurano

TMS: Tetrametilsilano

CG: Cromatografia à gás

CG/EM: Cromatografia à gás com detetor de espectrometria de massas

CG/DIC: Cromatografia à gás com detetor de ionização por chama

IV: Infravermelho

UV-vis: Ultravioleta-visível

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

RMN ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13

J: Constante de acoplamento (Hz)

δ : Deslocamento químico (ppm)

ppm: partes por milhão

mult.: Multiplicidade

s: Singleto

d: Dupleteo

dd: Duplo dupleteo

t: Tripleto

q: Quarteto

quint: Quinteto

m: Multipleto

sex: Sexteto

sept: Septeto

$[\alpha]_D$: Rotação específica

Lista de Ilustrações

Figura 1. Exemplo de substâncias cujas características biológicas variam em função de sua configuração absoluta	3
Figura 2. Nicotinamida adenina dinucleotídeo	18
Figura 3. Estado de transição proposto para reações catalisadas por enzimas dependentes de NADH/NAD ⁺	21
Figura 4: (a) cromatograma obtido da reação do (<i>RS</i>)-1-feniletanol com a bactéria R1AF57 após 72 horas; (b) cromatograma obtido da reação do (<i>RS</i>)-1-feniletanol com a bactéria R1AC23 após 72 horas.	24
Figura 5. Alcoóis secundários aromáticos derivados do (<i>RS</i>)-1-feniletanol substituídos nas posições <i>orto</i> , <i>meta</i> e <i>para</i> para uso como substrato nas reações de oxidação enantiosseletiva catalisadas pela bactéria R1AF57	38
Figura 6. Possível ligação de hidrogênio intramolecular no composto 5b	39
Figura 7. Mecanismo proposto para as reações de bio-oxidação de álcool	42
Figura 8. Estrutura de um substrato ideal para reações catalisadas por enzimas	46
Figura 9. Compostos 26b e 27b utilizados para RCE com a bactéria R1AF57	46
Figura 10. (a) Reação de acetilação do (<i>RS</i>)-2-octanol; (b) Cromatograma do (<i>RS</i>)-2-octanol; (c) Cromatograma da separação enantiomérica do éster obtido após reação de acetilação do (<i>RS</i>)-2-octanol	49
Figura 11. Fluxograma do procedimento realizado para a determinação do rendimento isolado da reação de oxidação do (<i>RS</i>)-1-feniletanol mediada pela bactéria R1AF57	53
Figura 12. a) Cromatograma obtido da reação de RCD adicionando o NaBH ₄ no início da reação; b) Cromatograma obtido da reação de RCD adicionando o NaBH ₄ após 24 horas do início da reação	57

Figura 13. Concentração do substrato [S] versus velocidade baseado na equação de Michaelis-Menten. A constante de Michaelis-Menten, K_M , é a concentração do substrato na qual a reação enzimática procede na metade da velocidade, $\frac{1}{2} V_{\max}$, da velocidade máxima $V_{\max}$...	58
Figura 14. a) Cromatograma obtido da reação de RCD utilizando 40 mL de tampão fosfato e 4 equivalentes de NaBH_4 ; b) Cromatograma obtido da reação de RCD utilizando 40 mL de tampão fosfato e 9 equivalentes de NaBH_4	59
Figura 15. Espectro de Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) referente a (17b).....	90
Figura 16. Espectro de ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) referente a (17b)	91
Figura 17. Espectro de CG/EM referente a (17b).....	92
Figura 18. Espectro de IV referente a (17b)	92
Figura 19. Espectro de Espectro de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) referente a (18b).....	93
Figura 20. Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) referente a (18b)	94
Figura 21. Espectro de CG/EM referente a (18b).....	95
Figura 22. Espectro de IV referente a (18b)	95
Figura 23. Espectro de Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) referente a (19b).....	96
Figura 24. Espectro de ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) referente a (19b)	97
Figura 25. Espectro de CG/EM referente a (19b).....	98
Figura 26. Espectro de IV referente a (19b)	98
Figura 27. Espectro de Espectro de ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) referente a (20b).....	99
Figura 28. Espectro de ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) referente a (20b)	100
Figura 29. Espectro de CG/EM referente a (20b).....	101
Figura 30. Espectro de IV referente a (20b)	101
Figura 31. Espectro de Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) referente a (23b).....	102
Figura 32. Espectro de ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) referente a (23b)	103
Figura 33. Espectro de CG/EM referente a (23b).....	104

Figura 34. Espectro de IV referente a (23b)	104
Figura 35. Espectro de Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) referente a (28b).....	105
Figura 36. Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) referente a (28b)	106
Figura 37. Espectro de CG/EM referente a (28b).....	107
Figura 38. Espectro de IV referente a (28b)	107

Lista de Tabelas

Tabela 1. Estudo da variação do volume de meio de cultura com células da bactéria R1AF57 em crescimento na oxidação enantiosseletiva do (RS)-1-feniletanol	29
Tabela 2. Estudo da variação do volume de meio de cultura com células da bactéria R1AC23 em crescimento na oxidação enantiosseletiva do (RS)-1-feniletanol	30
Tabela 3. Cinética da reação de oxidação enantiosseletiva do (RS)-1-feniletanol utilizando a bactéria R1AF57.....	32
Tabela 4. Cinética da reação de oxidação enantiosseletiva do (RS)-1-feniletanol utilizando a bactéria R1AC23	33
Tabela 5. Influência do frasco reacional na reação de oxidação enantiosseletiva mediada pela bactéria R1AC23	36
Tabela 6. Avaliação do espectro de atividade enzimática da bactéria R1AF57 na reação de oxidação enantiosseletiva utilizando as células em crescimento.....	40
Tabela 7. Avaliação do espectro de atividade enzimática da bactéria R1AF57 utilizando as células ressuspensas em tampão fosfato na reação de oxidação enantiosseletiva.....	41
Tabela 8. Avaliação do espectro de atividade enzimática da bactéria R1AF57 na reação de oxidação enantiosseletiva para os compostos 26b e 27b.....	47
Tabela 9. Avaliação do espectro de atividade enzimática na reação de oxidação enantiosseletiva do composto 28b mediada pela bactéria R1AF57	50
Tabela 10. Resultados obtidos dos ensaios de Resolução Cinética Dinâmica utilizando a bactéria R1AF57 e NaBH ₄	56

Lista de Esquemas

Esquema 1. Dessimetrização de compostos pró-quirais. Processo onde uma cetona como material de partida é reduzida enantiosseletivamente a um álcool quiral	4
Esquema 2. Exemplo de resolução cinética de um racemato de álcool secundário através de oxidação enantiosseletiva	5
Esquema 3. Processos para obtenção de alcoóis enantiomericamente puros	5
Esquema 4. Redução catalisada por oxazaborolidina quiral	6
Esquema 5. Síntese de oxazaborolidinas para aplicação em reações de redução enantiosseletiva.....	7
Esquema 6. Redução utilizando como biocatalisador células de <i>Geotrichum candidum</i>	8
Esquema 7. Exemplo de resolução cinética de um álcool racêmico secundário utilizando células de <i>Rhodococcus ruber</i> como biocatalisador.....	9
Esquema 8. Reação de oxidação do (RS)-1-feniletanol catalisada por complexo de paládio e esparteína	10
Esquema 9. Transesterificação do 1-(furan-2-il)etanol secundário catalisada por lipase usando acetato de isopropenila como agente acilante.....	11
Esquema 10. Desracemização por oxidação-redução utilizando um único microrganismo como fonte enzimática.....	11
Esquema 11. Desracemização de alcoóis por concorrente oxidação/redução com dois biocatalisadores acoplados	12
Esquema 12. RCD de 1-feniletanol catalisada por CAL-B e um complexo de Rutênio.....	13
Esquema 13. Primeiro passo da degradação do álcool polivinílico por uma oxidase	15
Esquema 14. Reações de oxidação com oxidases formando água ou peróxido de hidrogênio	16

Esquema 15. Tipos de reciclagem de cofator nicotinamida (a) 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-substrato	19
Esquema 16. Resolução cinética empregando uma oxidase para reciclagem de cofator	19
Esquema 17. Reação catalisada por álcool desidrogenase usando álcool marcado isotopicamente	20
Esquema 18. Reação catalisada por álcool desidrogenase	21
Esquema 19. Reação de oxidação enantiosseletiva utilizando a bactéria R1AC23	24
Esquema 20. Reação de oxidação enantiosseletiva utilizando a bactéria R1AF57	25
Esquema 21. Substratos racêmicos obtidos por redução com borohidreto de sódio para estudos de resolução cinética biocatalisada	26
Esquema 22. Substratos racêmicos 20b e 21b obtidos por reação de acoplamento do tipo <i>Suzuki-Miyaura</i>	26
Esquema 23. Substratos racêmicos 22b-28b utilizados nas reações de oxidação enantiosseletiva	27
Esquema 24. Reação esperada para alcoóis di-arílicos utilizando a bactéria R1AF57	44
Esquema 25. Processo proposto de RCD utilizando a bactéria R1AF57 e NaBH ₄	54
Esquema 26. Reação de transesterificação para determinação da configuração absoluta dos alcoóis <i>para</i> -substituídos	78

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Perfil cinético da reação de oxidação do (<i>RS</i>)-1-feniletanol catalisada pela bactéria R1AC23.....	33
Gráfico 2. Perfil cinético da reação de oxidação do (<i>RS</i>)-1-feniletanol catalisada pela bactéria R1AF57	34
Gráfico 3. Áreas obtidas por CG/DIC dos ensaios realizados com a cetona 28a (2-octanona) para verificar possível degradação do composto durante a reação biocatalisada pela bactéria R1AF57	51
Gráfico 4. Ciclos necessários para desracemização de alcoóis através de uma sequência de oxidação/redução	54

Sumário

Dedicatória.....	i
Agradecimentos	ii
Epígrafe	iv
Resumo	v
Abstract.....	vii
Lista de Abreviaturas e Siglas	ix
Lista de Ilustrações	xi
Lista de Tabelas	xiv
Lista de Esquemas	xv
Lista de Gráficos.....	xvii
Sumário.....	xviii
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	4
2.1 Obtenção de alcoóis secundários enantiomericamente puros.....	4
2.1.1 Redução de cetonas	6
2.1.2 Resolução cinética de racematos	9
2.1.3 Resolução cinética dinâmica	11
2.2 Processos biocatalíticos	13
2.2.1 Enzimas que catalisam reações de oxidação	15
2.2.2 Cofatores.....	17
2.2.3 Mecanismo geral de uma álcool desidrogenase (ADH) em reações de oxidação enantiosseletiva.....	20
3. Objetivos.....	22

3.1	Objetivo principal	22
3.2	Objetivos específicos	22
4.	Resultados e Discussão	23
4.1	Obtenção dos alcoóis racêmicos 1b a 28b	26
4.2	Meios reacionais selecionados para otimização das reações de oxidação	27
4.3	Avaliação da relação biomassa <i>versus</i> substrato para oxidação enantiosseletiva mediada pelas bactérias R1AC23 e R1AF57	29
4.4	Avaliação da cinética da reação de oxidação enantiosseletiva mediada pelas bactérias R1AC23 e R1AF57	31
4.5	Influência das condições reacionais na reação de oxidação mediada pela bactéria <i>Sphingobacterium</i> sp (R1AC23)	34
4.6	Aplicação da bactéria <i>Arthrobacter atrocyaneus</i> (R1AF57) na reação de oxidação enantiosseletiva de alcoóis secundários	37
4.6.1	Oxidação enantiosseletiva de alcoóis secundários derivados do (<i>RS</i>)-1-feniletanol	37
4.6.2	Resolução cinética de alcoóis secundários di- <i>ar</i> licos	44
4.6.3	Resolução cinética dos compostos (<i>RS</i>)-1-fenilpropanol e (<i>RS</i>)-1-fenilpropano-2-ol	46
4.6.4	Resolução cinética do (<i>RS</i>)-2-octanol	49
4.6.5	Rendimento isolado	52
4.6.6	Estudo de Resolução Cinética Dinâmica por estereoinversão utilizando borohidreto de sódio e a bactéria R1AF57 como fonte de ADH/NAD(P) ⁺	53
5.	Conclusão	61
6.	Parte Experimental	62
6.1	Materiais e Métodos	62

6.2	Obtenção dos substratos racêmicos	63
6.2.1	Preparo dos alcoóis secundários derivados do 1-feniletanol 1b-19b e 28b	63
6.2.2	Caracterização de outros compostos.....	74
6.3	Determinação da configuração absoluta.....	78
6.3.1	Reação de transesterificação de feniletanóis catalisada por CAL-B	78
6.4	Reações biocatalisadas	79
6.4.1	Preparo da solução tampão fosfato utilizada nas reações biocatalisadas	79
6.4.2	Preparo da solução de indutor	79
6.4.3	Preparo do meio de cultura <i>NB</i> sem indutor.....	79
6.4.4	Crescimento das bactérias em meio de cultura.....	80
6.4.5	Reação com células das bactérias em crescimento.....	80
6.4.6	Reação com células da bactéria ressuspensas	81
6.5	Manutenção das bactérias.....	81
7.	Referências Bibliográficas.....	83
8.	Anexos.....	90
9.	Curriculum vitae	108

1. Introdução

Pasteur mostrou que as fermentações, conhecidas como práticas artesanais, para obtenção de certos produtos como bebidas alcoólicas e vinagre, estavam associadas à presença de microrganismos. O trabalho pioneiro de Eduard Büchner (laureado com o Nobel de Química de 1907), publicado em 1897, ao mostrar que fermentações são ações puramente químicas que podem ocorrer em meio livre de células, conduziu ao estudo das enzimas, os agentes químicos responsáveis por essas ações fermentativas (BÜCHNER, 1897).

Após o trabalho de Büchner muitos pesquisadores foram encorajados a isolar diferentes enzimas e estudar suas propriedades. No início do século XX, estudos introduzidos por Brown (BROWN, 1902) e Henri (HENRI, 1902), tornaram básica a ideia de que, nos modelos cinéticos e nas considerações mecanísticas, a ação enzimática envolve a etapa inicial de formação de um complexo enzima-substrato.

Nas décadas seguintes, enquanto enzimas eram isoladas, purificadas, cristalizadas e caracterizadas, e substratos e intermediários metabólicos eram identificados, avanços significativos em enzimologia identificaram as enzimas como proteínas dotadas de ação catalítica (HALDANE, 1930). Com os avanços tecnológicos, tais como o surgimento de técnicas cromatográficas tanto para fracionamento e isolamento das proteínas (cromatografia de troca iônica, de filtração em gel, etc. para fracionamento molecular) quanto para fins de análise (HPLC), técnicas como RMN, cristalografia de Raios-X, etc., permitiram uma evolução significativa nos estudos das enzimas. Desde então, vem sendo realizada a caracterização e estudo cinético de várias enzimas de diferentes fontes: animal, vegetal e de microrganismos.

As enzimas foram utilizadas pelo homem desde a antiguidade sob a forma de extratos e tecidos de vegetais e animais, como exemplo tem a seiva da figueira, que contém a

peptidase fictina, usada no preparo de queijo, e o malte da cevada que é rico em amilases usado para a confecção de cerveja e álcool. Entretanto, foi a partir do estudo e conhecimento das propriedades especiais das enzimas como catalisadores, tal como a excepcional seletividade (estereo, regio e quimiosseletividade), que estimulou nos últimos anos, a aplicação de biocatalálise para solução de problemas sintéticos em química orgânica. Tais propriedades especiais são vantajosas ou decisivas para obtenção, principalmente, de compostos quirais enantiomericamente puros (LERESCHE, 2006). Dentre as diversas aplicações dos biocatalisadores, sua utilização na obtenção de blocos de construção quirais, visando à produção de substâncias bioativas, desperta muito interesse principalmente nos setores industriais de fármacos, alimentação e agrícola (STRAATHOF, 2006).

A quiralidade molecular é de fundamental importância em ciência e tecnologia, em particular, a vida depende disso, pois os enantiômeros de uma substância com atividade biológica, usualmente, apresentam efeitos farmacológicos e toxicológicos diferentes (BORMAN, 1997). Os enantiômeros podem ser ambos benéficos, ou um deles benéfico (eutômero) e outro indesejado (distômero), por exemplo, inibidor, tóxico ou inativo. As consequências das diferentes atividades biológicas variam desde a distinção entre sabor e aroma até efeitos teratogênicos. Alguns exemplos de compostos com diferentes atividades biológicas estão representados na figura 1.

Até o início da década de 90, cerca de 90% das drogas quirais sintéticas eram ainda comercializadas na forma racêmica. Em 1992 a *FDA (Food and Drug Administration)*, nos EUA, introduziu uma diretriz considerando que os fármacos quirais devem ser preferencialmente comercializados em sua forma enantiomericamente pura, e não mais na forma racêmica (FDA, site). Para um fármaco quiral ser comercializado na sua forma racêmica ou com diferentes proporções enantioméricas, o fabricante deverá fazer um estudo de atividade biológica para os seus enantiômeros separadamente. Tal regulamentação do

mercado para fármacos sintéticos resultou em um aumento significativo na proporção de drogas enantiomericamente puras no mercado. No ano de 2000 a venda mundial de compostos na forma enantiomericamente pura alcançou 123 bilhões de dólares (STINSON, 2001; ROUHI 2002). Sendo assim, o desenvolvimento e aperfeiçoamento de métodos eficientes para alcançar este objetivo, tem sido um substancial desafio para os químicos de instituições de pesquisa e indústria (MAY, 2002).

CLORANFENICOL

ETAMBUTOL

PACLOBUTRAZOL

Figura 1. Exemplo de substâncias cujas características biológicas variam em função de sua configuração absoluta

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Obtenção de alcoóis secundários enantiomericamente puros

Dentre os diversos intermediários químicos quirais empregados na síntese de produtos farmacêuticos, alimentícios e agroquímicos, os alcoóis secundários quirais destacam-se, pois além da grande versatilidade sintética dessa função orgânica, em inúmeros casos ela está presente na estrutura química do produto desejado. Estes compostos podem sofrer diversas transformações químicas levando a outros grupos funcionais, como por exemplo, aminas e haletos. E ainda os alcoóis secundários são atrativos materiais de partida, porque algumas vezes eles são mais facilmente obtidos do que as correspondentes cetonas (STRAUSS, 1999; GRUBER, 2006)

Os processos empregados para a obtenção de alcoóis secundários enantiomericamente puros são baseados na catálise assimétrica e podem ser classificados nas seguintes categorias:

- (i) Dessimetrização de compostos meso ou pró-quirais leva a um único produto enantiomericamente puro e com 100% de rendimento teórico, esquema 1;

Esquema 1. Dessimetrização de compostos pró-quirais. Processo onde uma cetona como material de partida é reduzida enantiosseletivamente a um álcool quiral

- (ii) Resolução cinética de racematos, processo onde, a partir de um álcool racêmico, um dos enantiômeros é transformado pela ação de um catalisador quiral a um produto (ex: cetona ou éster), restando o outro enantiômero puro (álcool não-

transformado), cada um com rendimento teórico de 50%, esquema 2. Esse último método é dominante no número de aplicações sintéticas (KROUTIL, 1998).

Esquema 2. Exemplo de resolução cinética de um racemato de álcool secundário através de oxidação enantiosseletiva

A resolução cinética de racematos é ainda o método mais utilizado para produção de compostos enantiomericamente puros em escala industrial (HUERTA, 2001). Embora esses processos sejam eficientes em termos de enantiosseletividade, o rendimento máximo é de 50% para cada enantiômero. Para suprir essa limitação, estratégias foram desenvolvidas para alcançar altos rendimentos com alta pureza enantiomérica. A ideia desses processos é utilizar todo material de partida na transformação, e consequentemente o rendimento teórico do produto desejado será de 100%. Esses processos são conhecidos como desracemização, onde um racemato é convertido a um único estereoisômero (FABER, 2001).

No esquema 3 está apresentado um resumo dos métodos citados.

Esquema 3. Processos para obtenção de alcoóis enantiomericamente puros

2.1.1 Redução de cetonas

Uma fonte de hidrogênio é necessária para realizar uma redução de carbonila de cetonas para obtenção de um álcool secundário quiral. A utilização de hidretos de alumínio e de boro para redução de grupos carbonílicos já é bastante conhecida e descrita em literatura (CLAYDEN, 2001). Porém para alcançar controle estereoquímico estudos relatam o uso de NABH_4 , LiAlH_4 ou $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ com reagentes indutores de quiralidade.

Em um desses trabalhos Itsuno *et al.* reportaram que uma mistura de amino-álcoois quirais, tais como *S*-valinol, e $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ numa razão de 1:2, realizavam redução enantiosseletiva de algumas cetonas para álcoois secundários quirais com aproximadamente 99% de rendimento e excesso enantiomérico de 10-73% (ITSUNO, 1983).

Bakshi e Shibata descobriram que derivados do *S*-valinol **I** atuam como catalisadores na redução da acetofenona para (*R*)-1-feniletanol com 94,7% de excesso enantiomérico, e essa reação passa pelo intermediário oxazaborolidina **II**, esquema 4 (COREY, 1987).

Esquema 4. Redução catalisada por oxazaborolidina quiral

Corey *et al.* foram os pioneiros em estudos com estes tipos de catalisadores. Os autores desenvolveram algumas oxazaborolidinas utilizando amino-álcoois. Foi notado que a

oxazaborolidina **III** foi superior ao análogo **IV** em relação a redução enantiosseletiva, esquema 5. Os autores conseguiram alcançar maior controle estereoquímico na redução de diversas cetonas arílicas e alifáticas, alcançando excessos enantioméricos de 84 a 97,6% (COREY, 1998).

Esquema 5. Síntese de oxazaborolidinas para aplicação em reações de redução enantiosseletiva

Tratando-se de bio-redução a fonte de hidrogênio necessária para essa reação é o NADH ou NADPH e o reagente indutor de quiralidade é a álcool desidrogenase. Há um grande número de exemplos na literatura de eficientes métodos utilizando biocatalisadores (MOORE, 2007). Utilizando cetonas alifáticas como substrato, células secas de *Geotrichum candidum*, NAD^+ , o álcool 2-propanol como auxiliar para geração de cofator, Matsuda *et al.* obtiveram bons resultados na reação de redução enantiosseletiva dessas cetonas. Nesse processo primeiro gera-se NADH e então o substrato cetona é reduzido ao produto álcool, NAD^+ é formado, o qual é reduzido de volta ao NADH pela oxidação acoplada de 2-propanol, esquema 6 (MATSUDA, 2002).

Esquema 6. Redução utilizando como biocatalisador células de *Geotrichum candidum*

As reações de redução também podem ser conduzidas utilizando vegetais. Yadav *et al.* utilizaram cenoura para realizar as reações de redução com diversos substratos. No caso de acetofenonas *para*-substituídas como substrato, as reduções levaram de 40-50 horas para se completar, com rendimentos de 61-80% e excessos enantioméricos >90%. Com as acetofenonas contendo substituintes elétron-doadores (-Me, -OMe) a reação foi mais lenta (YADAV, 2002).

Porto *et al.* utilizaram células dos fungos *Aspergillus terreus* e *Rhizopus oryzae* cultivadas em meio de cultura para redução de flúor-acetofenonas. Os melhores resultados para bio-redução foram alcançados com *R. oryzae*, que converteu o-flúor-acetofenona ao (*S*)-o-flúor-feniletanol com 98% de rendimento e excesso enantiomérico de 99%. No caso da *m*-flúoracetofenona e *p*-fluoracetofenona, *A. terreus* foi o melhor biocatalisador, pois foi possível obter os alcoóis correspondentes com 91% de rendimento e >99% de e.e. e 30% de rendimento e 95% de e.e., respectivamente (PORTO, 2003).

2.1.2 Resolução cinética de racematos

A resolução cinética de um racemato é baseada na diferença de velocidades reacionais dos enantiômeros durante uma reação química mediada por um catalisador quiral ou um reagente quiral (FABER, 2001).

Misturas racêmicas de álcoois secundários podem ser eficientemente resolvidas por oxidação enantiosseletiva catalisada por enzimas, resultando em uma mistura da cetona correspondente e o enantiômero remanescente do álcool. Uma aplicação dessa metodologia foi reportada por Stampfer *et al.*, onde foi utilizado células liofilizadas de *Rhodococcus ruber* e acetona como aceptor de hidrogênio para oxidar enantiosseletivamente álcoois secundários alifáticos (STAMPFER, 2002). Os substratos com triplas ligações não foram convertidos com alto rendimento, com duplas ligações foram obtidos com melhores rendimentos com destaque para o (*E*)-3-penten-2-ol que teve conversão de 53% e >99% de excesso enantiomérico, esquema 7.

Esquema 7. Exemplo de resolução cinética de um álcool racêmico secundário utilizando células de *Rhodococcus ruber* como biocatalisador

As reações de oxidações enantiosseletivas também podem ser realizadas mediadas por um metal, por exemplo, Pd(II) e esparteína, um alcalóide. Mueller *et al.* estudaram a dupla função desempenhada pela (-)-esparteína durante o ciclo reacional. Além de atuar como ligante no paládio, complexo **XII**, a esparteína pode atuar também como base. Segundo os

autores a base pode ser necessária para desprotonar o álcool. Nesse estudo foi obtido (*S*)-1-feniletanol com 51,5% de conversão e 82,4% de excesso enantiomérico, esquema 8 (MUELLER, 2002).

Esquema 8. Reação de oxidação do (*RS*)-1-feniletanol catalisada por complexo de paládio e esparteína

A resolução cinética de alcoóis secundários também pode ser realizada por lipases, por acetilação de um dos enantiômeros. Esta metodologia é amplamente estudada e pode-se encontrar inúmeros exemplos na literatura. Por exemplo, Ghanem *et al.* reportaram um trabalho mostrando a utilidade do acetato de isopropenila como agente acilante na reação de transesterificação catalisada por lipases. Na transesterificação do (*RS*)-*sec*-álcool, o (*R*)-álcool foi o enantiômero que reagiu mais rápido formando o (*R*)-acetato em alto excesso enantiomérico e deixando o (*S*)-álcool como o enantiômero puro, esquema 9. Dentre as condições reacionais testadas, aquela que se obteve o melhor resultado foi com tempo reacional de 21 horas em solvente isoctano e lipase PSL (*Pseudomonas cepacia*), apresentando conversão de 48% (GHANEM, 2001).

Esquema 9. Transesterificação do 1-(furan-2-il)etanol secundário catalisada por lipase usando acetato de isopropenila como agente acilante

2.1.3 Resolução cinética dinâmica

Diversas técnicas de resolução cinética dinâmica são desenvolvidas para permitir completa transformação de um racemato em um único enantiômero com até 100% de rendimento.

Alguns protocolos de desracemização empregam um único biocatalisador. Voss *et al.* desenvolveram uma sequência de oxidação/redução para estero inversão do *rac*-2-decanol. Neste caso para alcançar eficientes e rápidas transformações, o biocatalisador deveria apresentar na etapa de oxidação, idealmente, nenhuma enantiosseletividade enquanto o passo da redução deveria ter perfeita estereosseletividade. Após testar algumas cepas de *Rhodococci*, os autores empregaram células liofilizadas de *Rhodococcus* sp para transformar o racêmico 2-decanol em (*S*)-2-decanol com excesso enantiomérico de 92% e rendimento de 82%, esquema 10 (VOSS, 2007).

Esquema 10. Desracemização por oxidação-redução utilizando um único microrganismo como fonte enzimática

Os mesmos autores, Voss *et al.* desenvolveram um processo de desracemização por estereoinversão utilizando uma sequência de reações, primeiro uma oxidação enantiosseletiva por células liofilizadas de *Alcaligenes faecalis* e uma redução estereosseletiva por uma ADH isolada de *Rhodococcus ruber*. Para a etapa de redução foi necessário um sistema de reciclagem de cofator. Vários substratos foram testados, os melhores resultados foram obtidos com *rac*-2-octanol e *rac*-sulcatol, que foram desracemizados após 4 horas de reação e com excesso enantiomérico do *S*-álcool em >99% sem traço das cetonas, esquema 11. Estes resultados indicam que a passo de redução é a etapa rápida da reação (VOSS, 2008).

Esquema 11. Desracemização de álcoois por concorrente oxidação/redução com dois biocatalisadores acoplados

Metodologias empregando processos quimio-enzimáticos também são utilizadas em resolução cinética dinâmica. Por exemplo, combinação de uma lipase com um complexo de rutênio. Nesse processo a lipase catalisa a acetilação de um dos enantiômeros do álcool racêmico e o complexo de rutênio racemiza o enantiômero do álcool não-acetilado. Nesse caso, tem-se um ciclo reacional que atingirá, teoricamente, 100% de rendimento do produto acetilado. Martin-Matute *et al.* sintetizaram alguns complexos de rutênio para desracemização de vários álcoois secundários. Em uma resolução cinética dinâmica catalisada por lipase de *Candida antarctica* e um complexo de rutênio **XIII**, e utilizando como substrato (*RS*)-1-feniletanol, obteve-se o *S*-acetato correspondente com rendimento de 98% e excesso

enantiomérico de >99%, esquema 12 (MARTIN-MATUTE *et al*, 2005). A etapa de acetilação deve ser a etapa rápida da reação para alcançar ótimos rendimentos.

Esquema 12. RCD de 1-feniletanol catalisada por CAL-B e um complexo de Rutênio

2.2 Processos biocatalíticos

A biocatálise está relacionada às transformações de compostos através do metabolismo dos seres vivos utilizando enzimas para catalisar tais reações. Os biocatalisadores podem ser utilizados em síntese orgânica na forma de células integras de animais, vegetais e microrganismos, ou de enzimas isoladas dessas fontes (FABER, 2004). A escolha do sistema que será utilizado depende do tipo de reação, solvente, necessidade de cofatores e escala reacional em que a reação será realizada.

Dentre os métodos descritos nos itens 2.1.1 a 2.1.3 a biocatálise como método de obtenção de álcoois secundários quirais tem características únicas quando comparadas com a catálise química. Algumas dessas características que distinguem esses dois tipos de catálise estão listadas abaixo:

Seletividade:

Enzimas apresentam alta enantio-, regio-, e quimiosseletividade que podem ser alcançadas devido ao efetivo reconhecimento do substrato pela enzima, permitindo realizar reações difíceis de ocorrer por química clássica. A capacidade de produzir um dos isômeros é uma característica fundamental em áreas em que a pureza ótica dos produtos é imprescindível.

Segurança da reação:

Reações biocatalíticas são geralmente seguras. As condições reacionais são brandas, o que permite reduzir as reações secundárias, diminuindo assim a formação de subprodutos indesejáveis. Geralmente as enzimas atuam em pH entre 5 e 9 e temperaturas que variam entre 20 a 40°C. O solvente usualmente é água, e reagentes tóxicos ou perigosos não são necessários.

Catalisadores naturais:

Os biocatalisadores, por exemplo: microrganismos, plantas, animais ou enzimas isoladas podem ser facilmente decompostos no meio ambiente após o uso e sua inativação. Importante fator devido à tendência mundial de investimentos em tecnologias limpas. Os biocatalisadores são muito eficientes podendo aumentar a velocidade de reação numa ordem de 10^{14} vezes em relação à reação não catalisada.

Preparo do catalisador:

Alguns biocatalisadores para oxidação, enzimas isoladas ou células inteiras, são comercialmente disponíveis e prontos para uso como qualquer outro catalisador químico. Para essas reações os biocatalisadores comercialmente disponíveis incluem leveduras e álcool desidrogenases. No caso do uso de microrganismos como biocatalisador, para obtê-los é necessário cultivar células em meios de cultura que são disponíveis comercialmente.

Síntese em larga escala

Uma das desvantagens de usar os biocatalisadores é a dificuldade encontrada em sínteses em larga escala: (1) processos de *work-up* podem ser complicados, (2) grandes espaços para cultivo das células podem ser necessários, ou (3) os rendimentos relacionando espaço-tempo não são tão altos devido à baixa concentração do substrato no meio reacional e longos tempos reacionais. No entanto, essas desvantagens podem ser contornadas modificando-se geneticamente os microrganismos produtores de biocatalisadores e/ou investigando as condições reacionais.

2.2.1 Enzimas que catalisam reações de oxidação

As enzimas empregadas em reações de oxidação de alcoóis secundários a cetonas são classificadas em duas categorias: álcool desidrogenases e álcool oxidases. As desidrogenases são as enzimas primordialmente empregadas para oxidação enantiosseletiva de álcoois. Enquanto que as oxidases são empregadas quando é necessário alcançar principalmente regio- e quimiosseletividade e o produto final desejado é somente a cetona. Um exemplo do uso de uma oxidase pode ser observado numa etapa de degradação do álcool polivinílico (SAKAI, 1986), esquema 13.

Esquema 13. Primeiro passo da degradação do álcool polivinílico por uma oxidase

O uso mais comum das oxidases é em oxidação não-seletiva, do ponto de vista sintético, elas não são extensivamente utilizadas (FABER, 2004). O oxigênio molecular é o

oxidante dessa classe de enzimas, a oxidação ocorre através da transferência de 2 a 4 elétrons, formando H_2O_2 ou H_2O como sub-produto, respectivamente, esquema 14. Essa classe de enzima são flavina-dependentes, ou seja, o cofator utilizado é derivado da riboflavina ou vitamina B_2 (SILVERMAN, 2000; KROUTIL, 2004).

Esquema 14. Reações de oxidação com oxidases formando água ou peróxido de hidrogênio

As alcoóis desidrogenases (ADH's) são enzimas mais comumente utilizadas para oxidações e reduções enantiosseletivas. Elas são dependentes de nicotinamida, ou seja, depende do cofator NAD^+ ou NADP^+ para realizar reação de oxidação. Elas catalisam oxidação de alcoóis secundários a cetonas, e também de alcoóis primários a aldeídos. (RIBAS, 1991).

ADH's são enzimas que estão presentes em toda a natureza e são obtidas de diversas fontes, incluindo bactérias, fungos, leveduras, plantas e animais. As ADH's são classificadas em três famílias: álcool desidrogenase dependente de zinco, desidrogenase/redutase de pequena cadeia (SDRs) e aldo-ceto redutases (NIE, 2007). Essa classificação é baseada em suas propriedades catalíticas e informação sequencial dos aminoácidos da cadeia peptídica (KALLBERG, 2006).

Embora o metabolismo do etanol seja reconhecidamente o papel fisiológico da ADH, algumas ADH's apresentam alta atividade frente a outros substratos. A habilidade de utilizar uma variedade de diferentes substratos sugere papéis alternativos para as ADH's, por isso a

difficuldade de determinar a principal reação e importância fisiológica de uma ADH (ISMAIEL, 1993).

2.2.2 Cofatores

A remoção de elétrons de um substrato durante as reações de oxidação, quando mediada por uma ADH, requer um aceptor para esses elétrons, e não há grupos conhecidos na cadeia de aminoácidos dessas enzimas que atuem nesse sentido. Experimentalmente, as ADH's requerem uma molécula orgânica adicional, conhecida como coenzima ou cofator, no sítio ativo para participar da transferência de elétrons.

Esses cofatores requeridos pelas ADH's incluem a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+), e o fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADP^+), figura 2, para reações de oxidação. Quando os cofatores estão na forma NAD^+ ou NADP^+ , eles são chamados de cofatores na forma oxidada. Os cofatores na forma reduzida (NADH e NADPH) são utilizados nas reações de redução. Embora a parte nucleotídica seja muito importante por se ligar ao sítio ativo, a química desses cofatores deriva da parte piridínica. Algumas reações requerem a forma NADP^+ ao invés do NAD^+ . A principal diferença entre eles é somente um grupo fosfato a mais no grupo adenina. Geralmente uma enzima não possuirá a mesma atividade específica para ambos cofatores (CLAYDEN, 2001), entretanto ela catalisará a reação normalmente.

Esses cofatores são ligados ao sítio ativo das enzimas por interações não-covalentes. Cofatores são tipicamente derivados de vitaminas. Os cofatores nucleotídicos são derivados do ácido nicotínico (vitamina B_3 , também conhecida como niacina). O potencial de oxidação para o par $\text{NAD}^+/\text{NADPH}$ é -0,32V, o qual permite catalisar as reações de oxidação de alcoóis (SILVERMAN, 2000).

Figura 2. Nicotinamida adenina dinucleotídeo

Fonte: CLAYDEN, 2001.

Em reações de óxido-redução os cofatores são necessários em quantidades estequiométricas em relação ao substrato, porém os cofatores são moléculas instáveis e caras. Para reverter esses inconvenientes, sistemas de regeneração *in-situ* do cofator são necessários, o que reduz o custo drasticamente. Para eficientes sistemas de reciclagem, duas estratégias são possíveis (KROUTIL, 2004), esquema 15.

O método mais simples é fazer uso de uma única enzima, a qual transforma simultaneamente substrato e co-substrato, porém em direção oposta, esquema 15(a). Este co-substrato geralmente é um álcool secundário de baixo custo. 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.

Esquema 15. Tipos de reciclagem de cofator nicotinamida (a) 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-substrato

Um segundo método seria uma reciclagem de cofator usando uma segunda (e preferencialmente irreversível) reação enzimática, esquema 15(b). Para alcançar resultados satisfatórios, as duas enzimas utilizadas devem ter especificidades diferentes para seus respectivos substratos, pois as reações devem ser independentes e os substratos não competir pelo sítio ativo da enzima.

Um exemplo em reação de oxidação enantiosseletiva utilizando como oxidante o oxigênio molecular produzindo água como sub-produto foi reportado por Geueke *et al.* O sistema utiliza duas enzimas, uma ADH (*R*)-específica para oxidação do substrato e uma oxidase para reciclagem do cofator, esquema 16 (GEUEKE, 2003).

Esquema 16. Resolução cinética empregando uma oxidase para reciclagem de cofator

Células de microrganismos podem ser empregadas ao invés de desidrogenases isoladas. As células podem conter múltiplas desidrogenases que são hábeis a aceitar substratos não-naturais, e conter ainda o cofator necessário para a reação, juntamente com sistemas metabólicos para sua regeneração (NAKAMURA, 1991). Portanto, o emprego de um processo de reciclagem de cofator adicional pode ser omitido porque ele é realizado automaticamente pela célula. Além disso, as enzimas e os cofatores estão bem protegidos pelo ambiente natural celular (FABER, 2004).

2.2.3 Mecanismo geral de uma álcool desidrogenase (ADH) em reações de oxidação enantiosseletiva

O mecanismo geral de uma álcool desidrogenase suporta as evidências de que o hidreto perdido pelo substrato é adicionado a posição 4 do anel piridiníco do cofator. Se a reação é realizada em $^3\text{H}_2\text{O}$ nenhum ^3H é encontrado no NADH produzido, o que sugere uma transferência de próton sem troca com o solvente. Adicionalmente, se um álcool que tem deutério [^2H] ou trítio [^3H] ligado ao carbono carbinólico, e é usado na reação enzimática em H_2O , o deutério ou o trítio é encontrado exclusivamente no NADH, e nenhum é encontrado na H_2O , esquema 17. O reverso também é verdadeiro, NADH marcado é transferido ao substrato sem incorporação do solvente (SILVERMAN, 2000).

Esquema 17. Reação catalisada por álcool desidrogenase usando álcool marcado isotopicamente

A enzima e o NAD⁺ possuem quiralidade definida, devido a essa característica intrínseca, a reação de oxidação pode levar a uma resolução cinética do álcool racêmico, onde

um dos enantiômeros é quimicamente transformado mais rapidamente do que sua imagem especular. A formação de estados de transição diastereisôméricos entre o par de enantiômeros e a enzima é o fenômeno responsável pelas diferentes velocidades de reação.

A enzima atua coordenando o substrato e o NAD^+ ao seu sítio ativo, a enantiosseletividade vai depender da interação dos enantiômeros *R* e *S* do substrato com a enzima. No Esquema 18 está representada a reação catalisada por uma álcool desidrogenase onde B é um resíduo de aminoácido básico da enzima.

Esquema 18. Reação catalisada por álcool desidrogenase

O estado de transição, figura 3, proposto por Almarsson *et al* (ALMARSSON, 1992) sugere um mecanismo concertado onde a transferência do próton do álcool é simultânea a transferência do hidreto pelo cofator.

Figura 3. Estado de transição proposto para reações catalisadas por enzimas dependentes de NADH/NAD^+

Fonte: SILVERMAN, 2000.

3. Objetivos

3.1 Objetivo principal

Seguindo as atuais tendências mundiais por investimentos em tecnologias limpas, a biocatálise se apresenta como uma alternativa ambientalmente segura e principalmente uma importante ferramenta na preparação de compostos enantiomericamente puros de interesse industrial. Visando estes propósitos, este trabalho tem por objetivo principal estudar novas bactérias produtoras de álcool desidrogenases para reações de oxidação enantiosseletiva de alcoóis.

3.2 Objetivos específicos

No presente trabalho estudaram-se duas bactérias, inicialmente denominadas R1AC23 e R1AF57, produtoras de álcool desidrogenases com estereoespecificidades complementares. Com isso, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- I) Estudo de otimização para resolução cinética de alcoóis secundários analisando condições reacionais adequadas para alcançar os melhores rendimentos e enantiosseletividade;
- II) Aplicação sintética dos novos biocatalisadores, avaliando a sua enantiosseletividade na oxidação de diferentes alcoóis secundários;
- III) Estudos de Resolução Cinética Dinâmica de alcoóis secundários racêmicos via reação de estereoinversão para obtenção do álcool enantiomericamente puro utilizando NaBH_4 e a bactéria R1AF57 como fonte de ADH/NAD(P)⁺.

4. Resultados e Discussão

Inicialmente foi realizado um estudo de bioprospecção de microrganismos pelo ICB (Instituto de Ciências Biológicas) e LQFB (Laboratório de Química Fina e Biocatálise) sob o Projeto FAPESP 2007/51521-0. Esse estudo consistiu em isolar microrganismos de amostras de solo e avaliar sua atividade enzimática. As amostras de solo foram coletadas na cidade de Monte Negro (Reserva Florestal da Fazenda Izidoro próximo ao pólo avançado da USP situado no estado de Rondônia, local de Floresta Amazônica), local com vegetação nativa da região e pouco impacto humano.

Após a coleta do solo foi realizado o isolamento dos microrganismos onde 30 bactérias foram obtidas. Em seguida, essas bactérias isoladas foram avaliadas quanto a enantiosseletividade nas reações de oxidação de alcoóis secundários racêmicos. Nesta etapa duas bactérias (R1AC23 e R1AF57) mostraram excelentes enantiosseletividade e taxas de conversão.

Na figura 4, apresentam-se os cromatogramas dos produtos das reações com as duas bactérias frente ao (*RS*)-1-feniletanol. Como pode ser observado no cromatograma da figura 4(a) a reação com a bactéria R1AF57 levou ao enriquecimento do álcool com configuração *S*, enquanto que a reação com a bactéria R1AC23 levou ao enriquecimento do álcool com configuração *R*, figura 4(b).

Figura 4: (a) cromatograma obtido da reação do (RS)-1-feniletanol com a bactéria R1AF57 após 72 horas; (b) cromatograma obtido da reação do (RS)-1-feniletanol com a bactéria R1AC23 após 72 horas.

No esquema 19 está representada a reação de oxidação enantiosseletiva utilizando a bactéria R1AC23 como catalisador. O curso da oxidação se dá preferencialmente consumindo o enantiômero *S* e consequentemente restando o enantiômero *R* no meio reacional. Portanto essa bactéria possui álcool desidrogenase com seletividade para o enantiômero (*S*).

Esquema 19. Reação de oxidação enantiosseletiva utilizando a bactéria R1AC23

Por outro lado a bactéria R1AF57, que também apresentou atividade catalítica enantiosseletiva, oxidou o enantiômero **R** do álcool racêmico, restando o enantiômero **S** no meio reacional. Portanto, essa bactéria possui álcool desidrogenase com seletividade para o enantiômero (**R**), esquema 20.

Esquema 20. Reação de oxidação enantiosseletiva utilizando a bactéria R1AF57

A identificação das bactérias foi realizada pelo grupo de pesquisadores sob a coordenação da Profa. Vivian Pellizari do ICB-USP (Instituto de Ciências Biológicas – Universidade de São Paulo), através do sequenciamento do gene 16S do DNA ribossomal. O sequenciamento foi obtido pelo “Centro de Estudos do Genoma Humano - Universidade de São Paulo”. A análise filogenética foi determinada utilizando a base de dados pública *National Center for Biotechnology Information – NCBI* www.ncbi.nlm.nih.gov e *Ribosomal Database Project II – RDB* <http://rdp.cme.msu.edu> (ALTSCHUL *et al.* 1990; COLE *et al.* 2003; COLE *et al.* 2007).

A bactéria R1AC23 foi identificada como *Sphingobacterium* sp e a R1AF57 como sendo *Arthrobacter atrocyaneus*, porém durante a escrita da dissertação continuarão sendo citadas como R1AC23 e R1AF57 somente como forma de facilitar o reconhecimento da cepa utilizada nos ensaios.

4.1 Obtenção dos alcoóis racêmicos 1b a 28b

O preparo dos alcoóis racêmicos **1b** a **19b** foi realizado através de redução das respectivas cetonas **1a** a **19a** com borohidreto de sódio em etanol, esquema 21. Essas reduções foram realizadas conforme metodologias conhecidas em literatura (PORTO, 2004).

Esquema 21. Substratos racêmicos obtidos por redução com borohidreto de sódio para estudos de resolução cinética biocatalisada

Os compostos **20b** e **21b** foram obtidos através de reações de acoplamento do tipo *Suzuki-Miyaura* (ANDRADE, 2009), esquema 22. Os compostos **22b** a **26b** foram obtidos de projetos anteriores. O composto **27b** é disponível comercialmente (Sigma Aldrich). O composto alifático **28b** também foi obtido por redução com borohidreto de sódio a partir da cetona **28a** (Esquema 23).

Esquema 22. Substratos racêmicos 20b e 21b obtidos por reação de acoplamento do tipo *Suzuki-Miyaura*

Esquema 23. Substratos racêmicos 22b-28b utilizados nas reações de oxidação enantiosseletiva

4.2 Meios reacionais selecionados para otimização das reações de oxidação

O meio de cultura utilizado nos estudos para otimização da reação de oxidação enantiosseletiva foi o *Bacto Nutrient Broth* – NB, preparado a partir de 0,3 g de extrato de carne e 0,5 g de peptona para 100 mL de água destilada. O NB é o meio de cultura geralmente proposto para o cultivo de bactérias que não são exigentes em suas necessidades alimentares (Manual DIFCO, 1984).

Antes da etapa de crescimento das bactérias foi adicionado ao meio de cultura um composto indutor de produção de álcool desidrogenases [(RS)-1-(4-clorofenil)-etanol ou (RS)-1-(4-metilfenil)-etanol]. Esses compostos são os mesmos utilizados durante a etapa de bioprospecção com concentração final de 0,5 mM no meio reacional.

O crescimento das bactérias foi realizado em duas etapas, a primeira denominada pré-inóculo, foi realizado durante 2 dias. E a segunda, também de 2 dias, compreende a fase de produção de células bacterianas em maior quantidade. As duas etapas estavam sob temperatura de 32°C e agitação orbital de 160 rpm.

Após esse período de crescimento das bactérias, as reações de oxidação foram realizadas com as células bacterianas de duas formas distintas:

- A primeira forma foi utilizar o meio de cultura com as bactérias ainda **em crescimento**.

Essa metodologia geralmente apresenta alta atividade catalítica frente ao substrato, pela possibilidade de produção da enzima e regeneração do cofator constantes.

- Outra forma foi a **ressuspensão** das bactérias em solução tampão, ou seja, centrifuga-se o meio reacional com as bactérias em crescimento, retira-se o sobrenadante e ressuspende a biomassa em meio tamponado. Essa metodologia geralmente apresenta *work-up* simplificado, facilitando a purificação do produto obtido e menor probabilidade de formação de sub-produtos (pois elimina-se metabólitos e/ou outras enzimas produzidos pela bactéria durante o crescimento bacteriano que seja um possível interferente ou que não seja necessário para a reação), porém pode-se afetar o curso da reação pela mudança do meio reacional.

Depois do meio reacional preparado, tanto na forma de células em crescimento ou ressuspensas, foram adicionados 20 mg dos reagentes/substratos solubilizados em 100 µL de DMF, e a partir de então deixou-se o sistema reacional em agitação orbital a 160 rpm e a 32°C pelo tempo determinado em cada caso. O estudo com 20 mg, que é uma massa cinco vezes maior de substrato do que a utilizada na etapa de bioprospecção, tem como objetivo verificar o comportamento da reação em uma escala maior, e com isso avaliar possíveis divergências dos resultados entre as fases de *screening* e *scale-up* de reações biocatalisadas. Essas diferenças podem surgir e são comuns nestes tipos de reações (WELLS, 2006). O DMF foi utilizado para solubilização dos compostos/substratos com pouca ou nenhuma solubilidade em água, que é o solvente no qual a reação é realizada.

Os produtos das reações foram extraídos com solventes apropriados, o extrato seco com sulfato de magnésio, em seguida concentrados por evaporação à vácuo e analisados por cromatografia gasosa ou cromatografia líquida, ambos os cromatógrafos equipados com colunas cromatográficas quirais, para avaliação da conversão e excesso enantiomérico da biotransformação.

Todo o material utilizado para a manipulação das bactérias foi esterilizado em autoclave antes do uso, e os procedimentos realizados em capela de fluxo laminar.

4.3 Avaliação da relação biomassa *versus* substrato para oxidação enantiosseletiva mediada pelas bactérias R1AC23 e R1AF57

O conhecimento da relação do volume de meio de cultura com células em crescimento utilizado para realizar as reações *versus* a massa do substrato é essencial para alcançar eficientes biotransformações utilizando quantidades mínimas do catalisador enzimático, a fim de não causar desperdício do catalisador ou do substrato/reagente. Para esse estudo foi selecionado como substrato modelo o (*RS*)-1-feniletanol para as reações de bio-oxidação.

Inicialmente, realizou-se o crescimento das bactérias em meio de cultura apropriado. Após o período de crescimento bacteriano, diferentes volumes desse meio de cultura contendo a biomassa celular foram utilizados para a reação de oxidação do álcool racêmico. Foi adicionado 20 mg do (*RS*)-1-feniletanol solubilizado em 100 μ L de DMF, o tempo de reação foi de 72 horas, tempo igual ao utilizado na etapa de bioprospecção.

Tabela 1. Estudo da variação do volume de meio de cultura com células da bactéria R1AF57 em crescimento na oxidação enantiosseletiva do (*RS*)-1-feniletanol

Volume de meio de cultura (mL)	Cetona	Álcool	
	Conc. (%) ^a	Conc. (%) ^a	e.e. (%) ^b
10	44	56	97
20	44	56	>99
40	51	49	>99
60	52	48	>99
80	54	46	>99
100	55	45	>99

Condições reacionais: 32°C; 160 rpm; 20 mg do (*RS*)-1-feniletanol/100 μ L DMF; meio de cultura *NB* com células da bactéria R1AF57 em crescimento; tempo de reação: 72 horas; ^aconc.= concentração e ^be.e.= excesso enantiomérico determinados por cromatografia gasosa.

Os resultados apresentados na tabela 1 são da bactéria R1AF57. Após a avaliação dos cromatogramas obtidos das reações, verificou-se que a bactéria R1AF57 apresentou comportamento ideal em relação a performance da resolução cinética, pois o enantiômero *R* foi oxidado a cetona correspondente restando somente o enantiômero *S* no meio reacional com excesso enantiomérico >99%. Ainda observa-se pela tabela 1 que 20 mL de meio de cultura contendo a bactéria R1AF57 em crescimento são suficientes para alcançar o melhor resultado (>99% de excesso enantiomérico e 56% do *S*-álcool), portanto este volume foi fixado para os próximos estudos. Com base nos resultados pode-se dizer que a bactéria R1AF57 possui ADH altamente eficiente para a oxidação do enantiômero *R* do 1-feniletanol.

Esse mesmo estudo foi realizado com a bactéria R1AC23, os resultados estão na tabela 2.

Tabela 2. Estudo da variação do volume de meio de cultura com células da bactéria R1AC23 em crescimento na oxidação enantiosseletiva do (*RS*)-1-feniletanol

Volume de meio de cultura (mL)	Cetona	Álcool	
	Conc.(%) ^a	Conc. (%) ^a	e.e. (%) ^b
10	58	42	79
20	90	10	>99
40	95	5	>99
60	98	2	n.d. ^c
80	98	2	n.d. ^c
100	99	1	n.d. ^c

Condições reacionais: 32°C; 160 rpm; 20 mg (*RS*)-1-feniletanol/100μL DMF; meio de cultura *NB* com células da bactéria R1AC23 em crescimento; tempo de reação: 72 horas; ^aconc.= concentração e ^be.e.= excesso enantiomérico determinados por cromatografia gasosa ; ^cn.d.= e.e. não determinado devido baixa concentração do álcool.

A bactéria R1AC23 não apresentou resultados satisfatórios em relação à concentração final do álcool obtida após atingir excesso enantiomérico ideal (>99%). Como pode ser observada pelos dados apresentados na tabela 2, com 10 mL de meio de cultura contendo a bactéria em crescimento a concentração do álcool é de 58%, porém com excesso enantiomérico de 79%. Para obtenção do *R*-álcool com excesso enantiomérico de 99% seriam necessários 20 mL de meio de cultura com a biomassa celular, porém com rendimento de 10% do álcool enantiomericamente puro.

4.4 Avaliação da cinética da reação de oxidação enantiosseletiva mediada pelas bactérias R1AC23 e R1AF57

Alguns tempos de reação foram testados para o acompanhamento da cinética da reação de oxidação utilizando as bactérias em estudo. Fixou-se o volume de 20 mL de meio de cultura com células em crescimento para ambas as bactérias (definido no estudo anterior) e 20 mg do (*RS*)-1-feniletanol como substrato modelo.

Os resultados para a bactéria R1AF57 estão apresentados na Tabela 3. Observou-se que no tempo de 48 horas a reação com a bactéria R1AF57 se completa consumindo um dos enantiômeros, o (*R*)-1-feniletanol, e restando o outro, o (*S*)-1-feniletanol como substrato não-convertido com excesso enantiomérico >99%. Observa-se também que após 48 horas de reação, ou seja, o momento em que não é mais detectado o *R*-enantiômero, a oxidação do *S*-enantiômero não é observada. A partir desses resultados podemos supor que as velocidades das reações de oxidação dos dois enantiômeros são diferentes o suficiente para se obter o *S*-álcool enantiomericamente puro.

Tabela 3. Cinética da reação de oxidação enantiosseletiva do (*RS*)-1-feniletanol utilizando a bactéria R1AF57

Tempo de Reação (h)	Cetona	Álcool	
	Conc. (%) ^a	Conc. (%) ^a	e.e. (%) ^b
1	16	84	24
6	42	58	67
12	41	59	67
24	46	54	88
48	53	47	>99
72	51	49	>99

Condições reacionais: 32°C; 160 rpm; 20 mg (*RS*)-1-feniletanol/100µL DMF; 20 mL de meio de cultura *NB* com células da bactéria R1AF57 em crescimento; ^aconc.= concentração e ^be.e.= excesso enantiomérico determinados por cromatografia gasosa.

O tempo reacional de 48 horas será utilizado para estudos posteriores, onde será avaliada a enantiosseletividade da reação de oxidação com a bactéria R1AF57 e outros alcoóis secundários como substrato.

Por outro lado avaliando a reação com a bactéria R1AC23 (tabela 4) pode-se observar que somente é atingido >99% de excesso enantiomérico para o álcool desejado (enantiômero *R*) quando houve praticamente total oxidação dos dois enantiômeros (*R*) e (*S*), em 72 horas de tempo reacional. A partir da análise desses dados pode-se inferir que a bactéria R1AC23 produz álcool desidrogenase cuja velocidade de oxidação do enantiômero *S* é muito próxima do enantiômero *R*. Devido a isso se obtêm elevada conversão do álcool a cetona nas condições reacionais testadas.

Tabela 4. Cinética da reação de oxidação enantiosseletiva do (*RS*)-1-feniletanol utilizando a bactéria R1AC23

Tempo de Reação (h)	Cetona	Álcool	
	Conc. (%) ^a	Conc. (%) ^a	e.e. (%) ^b
1	11	89	10
6	60	40	45
12	76	24	62
24	83	17	78
48	87	13	89
72	90	10	>99

Condições reacionais: 32°C; 160 rpm; 20 mg (*RS*)-1-feniletanol/100µL DMF; 20 mL meio de cultura *NB* com células da bactéria R1AF57 em crescimento; ^aconc.= concentração e ^be.e.= excesso enantiomérico determinados por cromatografia gasosa.

Com os dados das tabelas 3 e 4, plotaram-se os gráficos 1 e 2 onde é possível observar claramente a diferença entre o perfil de oxidação ao longo do tempo pelas duas bactérias. No gráfico 1 observa-se a oxidação mediada pela bactéria R1AC23, e a oxidação praticamente simultânea dos dois enantiômeros e a formação da cetona.

Gráfico 1. Perfil cinético da reação de oxidação do (*RS*)-1-feniletanol catalisada pela bactéria R1AC23

No gráfico 2 está representada a reação catalisada pela bactéria R1AF57, onde ao final de 48 horas não é mais detectada a presença do enantiômero *R*, pois foi completamente oxidado a cetona, deixando aproximadamente 50% do *S*-álcool.

Gráfico 2. Perfil cinético da reação de oxidação do (*RS*)-1-feniletanol catalisada pela bactéria R1AF57

4.5 Influência das condições reacionais na reação de oxidação mediada pela bactéria *Sphingobacterium* sp (R1AC23)

Numa tentativa de avaliar a causa da variação da enantiosseletividade apresentada pela reação com a bactéria R1AC23 nos estudos anteriores em relação aos resultados obtidos na fase de bioprospecção, realizou-se uma análise das condições experimentais utilizadas.

Avaliando as diversas variáveis que pode influenciar uma reação enzimática, uma das causas desses resultados poderia ser a diferença experimental empregada nos dois estudos (estudo atual e a etapa de bioprospecção). A principal diferença acredita-se que foi o emprego de frasco reacional com capacidade volumétrica diferenciadas (estudo atual: utilizou-se como frasco reacional erlenmeyers de 250 mL e na etapa de bioprospecção utilizou-se como frasco reacional microplacas de 24 poços com capacidade individual de 10 mL). Considerando que oxigênio molecular pode fazer parte da reação de oxidação catalisada por algumas enzimas,

fato também observado recentemente na literatura (VOSS, 2007), a enantiosseletividade da reação de oxidação de alcoóis pode ser influenciada. Devido ao formato e volume do frasco reacional, a agitação mesmo sendo na mesma frequência (160 rpm), levam a diferentes perfis de agitação e consequentemente disponibilidade diferente de oxigênio molecular (DUETZ, 2001; MINAS, 2000).

Com isto decidiu-se realizar um teste em dois tipos de frascos reacionais diferentes. Para este estudo foram utilizados frascos do tipo “penicilina” com capacidade máxima de 100 mL e microplacas próprias para estudos com microrganismos com capacidade máxima de 10 mL.

Para termos uma comparação direta (mesma concentração molar) o ensaio foi realizado utilizando a mesma concentração e tempo reacional da fase de bioprospecção, ou seja, 4 mg do substrato/reagente (somente os alcoóis secundários aromáticos derivados do 1-feniletanol *para*-substituídos) para 2 mL de meio de cultura contendo as células bacterianas e 72 horas de reação. Para os substratos foram preparadas soluções de 0,75mM em DMF e utilizados 40 µL dessa solução, o que representa uma adição de 4 mg de cada composto por reação. O crescimento da bactéria foi realizado igual a estudos anteriores, após o período de crescimento da bactéria, adicionaram-se os substratos ao meio reacional.

Os resultados obtidos, tabela 5, suportam o pressuposto que a disponibilidade de oxigênio, o formato do frasco reacional e agitação podem ser determinantes para o curso da reação com essa bactéria. Destaca-se a reação do (*RS*)-1-feniletanol em microplaca que apresentou 86% de excesso enantiomérico. Em microplaca as reações apresentaram melhores resultados em relação ao frasco tipo “penicilina”.

Tabela 5. Influência do frasco reacional na reação de oxidação enantiosseletiva mediada pela bactéria R1AC23

Composto	Microplaca			Frasco tipo “penicilina”		
	Cetona	Álcool		Cetona	Álcool	
	Conc. (%) ^a	Conc. (%) ^a	e.e. (%) ^b	Conc. (%) ^a	Conc. (%) ^a	e.e. (%) ^b
1b R= H	67	32	86	71	30	39
4b R= Me	>99	<1	n.a. ^c	47	52	20
7b R= OMe	>99	<1	n.a. ^c	97	5	17
13b R= Cl	20	79	32	4	96	4
16b R= Br	8	92	12	3	97	0,5
19b R= NO ₂	93	7	44	98	2	14

Condições reacionais: 32°C; 160 rpm; 4 mg do substrato solubilizados em DMF; células da bactéria R1AC23 em meio de cultura; tempo de reação: 72 horas; ^cn.a. = não se aplica; ^aconc.= concentração e ^be.e.= excesso enantiomérico determinados por cromatografia.

Apesar da bactéria R1AC23 apresentar baixa enantiosseletividade durante a resolução cinética, ela apresenta alta atividade para oxidar todos os álcoois avaliados (**1b**, **4b**, **7b**, **13b**, **16b** e **19b**) para as correspondentes cetonas. As reações apresentaram >99% de conversão quando se utilizou o biocatalisador na proporção de 100 mL de meio de cultura com biomassa para 20 mg do substrato e 72 horas de reação.

Considerando os resultados expostos, os próximos estudos serão aplicados somente a bactéria R1AF57, pois o objetivo deste trabalho é realizar a oxidação enantiosseletiva dos alcoóis racêmicos. Porém sabendo-se que a oxidação de álcool para compostos carbonílicos é uma importante reação em síntese orgânica (MIYAMOTO, 2004), não se descartou a utilidade da bactéria R1AC23 como um promissor biocatalisador para quando o produto desejado seja a cetona correspondente. Levando-se também em consideração que as

condições reacionais são brandas e não há a utilização de metais pesados como é comum em oxidações via química clássica. Além disso, estudos de purificação enzimática podem levar ao isolamento da enzima específica para oxidação do enantiômero (*S*).

4.6 Aplicação da bactéria *Arthrobacter atrocyaneus* (R1AF57) na reação de oxidação enantiosseletiva de alcoóis secundários

Os próximos estudos foram realizados utilizando a bactéria *Arthrobacter atrocyaneus* (R1AF57) e alguns alcoóis racêmicos secundários como substrato, com o objetivo de elucidar qual o(s) substrato(s) ideal(is) para a reação de oxidação com a(s) álcool(is) desidrogenase(s) produzida(s) por esta bactéria.

Com esse estudo analisou-se a enantiosseletividade da reação de oxidação e o rendimento do álcool enantiomericamente puro e da cetona.

4.6.1 Oxidação enantiosseletiva de alcoóis secundários derivados do (*RS*)-1-feniletanol

A próxima etapa foi testar a seletividade da reação de oxidação para diversos alcoóis racêmicos secundários. Foram selecionados diversos substratos com substituintes doadores e atraentes de elétrons nas posições *orto*, *meta* e *para* do anel aromático. Os substratos propostos **2b** a **21b** são derivados do **1b** (*RS*)-1-feniletanol (figura 5).

O tempo reacional utilizado foi de 48 horas, exceto para os compostos **20b** e **21b**, onde foi verificada a necessidade de 72 horas de reação para alcançar melhores resultados em meio de cultura com células em crescimento.

Figura 5. Alcoóis secundários aromáticos derivados do (RS)-1-feniletanol substituídos nas posições *orto*, *meta* e *para* para uso como substrato nas reações de oxidação enantiosseletiva catalisadas pela bactéria R1AF57

O meio reacional foi utilizado das duas formas propostas no item 4.2, ou seja, além das reações com as células em crescimento, também a reação com as células ressuspensas em tampão fosfato para avaliação do comportamento das enzimas nos dois meios reacionais. A reação com as células em ressuspensão teria outra vantagem, além da facilidade de *work-up* e menor probabilidade de formação de sub-produtos, as bactérias poderiam ser utilizadas como reagente comum, ou seja, uma vez as células produzidas e armazenadas, elas poderiam ser utilizadas a qualquer momento, somente ressuspendendo-as em meio tamponado.

Os resultados da reação de oxidação estão apresentados nas tabelas 6 para reação com as bactérias em meio de cultura e tabela 7 para células ressuspensas em tampão fosfato.

Analisando os resultados obtidos com as reações em meio de cultura com as células em crescimento, observa-se na tabela 6, que todos os álcoois *para*-substituídos o enantiômero (*R*) foi convertido a cetona, deixando o enantiômero (*S*) com excesso enantiomérico >99% para todos os casos. Os mesmos resultados foram obtidos para os álcoois *meta*-substituídos,

com exceção do composto **20b**, que apresentou e.e. de 13% (reação 20, tabela 6). Acredita-se que esse resultado se deve ao impedimento estérico do substituinte fenila nesta posição.

Para os compostos *orto*-substituídos a reação não apresentou oxidação do álcool com exceção das reações **5** e **8** da tabela 6, apresentando o seguinte resultado para o **5b** (6% da cetona, 94% do álcool e e.e. de 8%) e para o **8b** (3% da cetona, 97% do álcool e e.e. de 4%). A ausência do produto da oxidação para os compostos *orto*-substituídos possivelmente é devida ao impedimento estérico ocasionado pela aproximação do substituinte ao grupo funcional que sofre a oxidação. Entretanto, no caso do composto **5b** é possível que a presença do oxigênio forme uma ligação de hidrogênio intramolecular com o hidrogênio alcoólico, figura 6, e com isto facilite a retirada do hidreto pelo cofator. No caso do composto **8b** a oxidação observada provavelmente é devido ao tamanho do átomo de flúor (menor dos substituintes avaliados) o que pode ter permitido uma aproximação do substrato ao sítio ativo da enzima e uma pequena oxidação foi observada.

Figura 6. Possível ligação de hidrogênio intramolecular no composto **5b**

Tabela 6. Avaliação do espectro de atividade enzimática da bactéria R1AF57 na reação de oxidação enantiosseletiva utilizando as células em crescimento

Reação	Composto	Cetona		Álcool	
		Conc. (%) ^a	Conc. (%) ^a	e.e. (%) ^b	Conf. ^c
1	1b R = H	51	49	>99	S
2	2b R = 2-Me	<1	99	<1	-
3	3b R = 3-Me	44	56	>99	S
4	4b R = 4-Me	50	50	>99	S
5	5b R = 2-OMe	6	94	8	-
6	6b R = 3-OMe	51	49	>99	S
7	7b R = 4-OMe	50	50	>99	S
8	8b R = 2-F	3	97	4	-
9	9b R = 3-F	48	52	>99	S
10	10b R = 4-F	53	47	>99	S
11	11b R = 2-Cl	<1	99	<1	-
12	12b R = 3-Cl	49	51	>99	S
13	13b R = 4-Cl	49	51	>99	S
14	14b R = 2-Br	<1	99	<1	-
15	15b R = 3-Br	45	54	>99	S
16	16b R = 4-Br	51	49	>99	S
17	17b R = 2-NO ₂	<1	99	<1	-
18	18b R = 3-NO ₂	54	46	>99	S
19	19b R = 4-NO ₂	50	50	>99	S
20	20b R = 3-Ph	31	69	13 ^d	S
21	21b R = 4-Ph	54	46	>99 ^d	S

Condições reacionais: 32°C; 160 rpm; 20 mg do substrato **1b-21b**/100µL DMF; 20 mL meio de cultura *NB* com células da bactéria R1AF57 em crescimento; tempo reacional: 48 horas; ^aconc.= concentração e ^be.e.= excesso enantiomérico determinados por cromatografia gasosa; ^cconfiguração absoluta; ^dtempo reacional: 72 horas e excesso enantiomérico determinado por cromatografia líquida.

Tabela 7. Avaliação do espectro de atividade enzimática da bactéria R1AF57 utilizando as células ressuspenas em tampão fosfato na reação de oxidação enantiosseletiva

Reação	Composto	Cetona		Álcool	
		Conc. (%) ^a	Conc. (%) ^a	e.e. (%) ^b	Conf. ^c
1	1b R = H	39	61	85	S
2	2b R = 2-Me	<1	99	<1	-
3	3b R = 3-Me	47	53	>99	S
4	4b R = 4-Me	49	51	>99	S
5	5b R = 2-OMe	3	97	4	-
6	6b R = 3-OMe	47	53	>99	S
7	7b R = 4-OMe	44	56	>99	S
8	8b R = 2-F	<1	99	<1	-
9	9b R = 3-F	40	60	88	S
10	10b R = 4-F	37	63	93	S
11	11b R = 2-Cl	<1	99	<1	-
12	12b R = 3-Cl	18	82	22	S
13	13b R = 4-Cl	13	87	24	S
14	14b R = 2-Br	<1	99	<1	-
15	15b R = 3-Br	14	86	23	S
16	16b R = 4-Br	14	86	23	S
17	17b R = 2-NO ₂	<1	99	<1	-
18	18b R = 3-NO ₂	52	48	>99	S
19	19b R = 4-NO ₂	52	48	>99	S
20	20b R = 3-Ph	37	63	21 ^d	S
21	21b R = 4-Ph	53	47	>99 ^d	S

Condição reacional: 32°C; 160 rpm; 20 mg do substrato **1b-21b** /100 µL DMF; 20 mL de células centrifugadas da bactéria R1AF57 e ressuspenas em 20 mL de tampão fosfato pH 7; tempo reacional: 48 horas; ^aconc.= concentração e ^be.e.= excesso enantiomérico determinados por cromatografia gasosa; ^cconfiguração absoluta; ^dtempo reacional: 72 horas e excesso enantiomérico determinado por cromatografia líquida.

A biotransformação com células ressuspensas em meio tamponado (Tabela 7) mostrou que o 1-feniletanol e seus derivados em alguns casos não alcançam a mesma conversão e excessos enantioméricos quando comparado as reações com células da bactéria em crescimento (Tabela 6). Para uma tentativa de explicar os resultados observados, conceitos do mecanismo da reação foram retomados.

Dentre as variáveis que podem influenciar uma reação biocatalisada o pH do meio reacional é um fator importante. A princípio utilizou-se o pH 7 para a solução aquosa de tampão fosfato porque o pH do meio de cultura *NB* após o preparo é 7, ou seja, seria utilizado o mesmo pH em que as bactérias são cultivadas. Além disso, o pH ótimo no qual ocorrem a maioria das reações com microrganismos descritas em literatura é próximo da neutralidade, pH 7 (BENDER, 1971).

Depois de analisar os resultados da oxidação em meio tamponado e avaliar o mecanismo de reação, verificou-se que para a reação ocorrer é necessário um resíduo de aminoácido básico para retirar o hidrogênio alcoólico tornando a ligação C-O mais polarizada e facilitando a retirada do íon hidreto pelo cofator, figura 7.

Figura 7. Mecanismo proposto para as reações de bio-oxidação de álcool

Considerando a dependência do pH para a reação e o mecanismo exposto anteriormente, mediu-se o pH do meio de cultura *NB* após o período de crescimento das

bactérias, e então verificou-se um pH 9, ou seja, no momento do preparo do meio de cultura este tem pH 7, durante o crescimento das bactérias o pH se altera para 9.

A dependência do pH de reações enzimáticas pode indicar participação de um ou mais grupos ionizáveis durante a catálise, tanto grupos ionizáveis de caráter ácido ou básico. Esses grupos ionizáveis podem ser necessários para a ligação do substrato a enzima, para a reação catalítica ou para a manutenção da propriedade conformacional da enzima (BENDER, 1971).

No caso da reação biocatalisada com a bactéria R1AF57 em meio tamponado, acredita-se que a dependência do pH esteja associada a ionização do resíduo de aminoácido necessário para desprotonar o álcool. Em pH 7 esse aminoácido pode estar protonado e não participa da reação de maneira efetiva na formação do complexo enzima-substrato para que a reação ocorra. Observa-se pelos resultados uma forte dependência da reação com os substituintes do anel aromático. Por exemplo, observando somente os compostos *para*-substituídos da tabela 7, os compostos **4b** e **7b** (Reações 4 e 7), com respectivamente, substituintes metila e metoxila, de natureza doadores de elétrons, a reação tem conversões aproximadas de 50% e e.e. >99%. Com os compostos **10b** (Reação 10, concentração do álcool 63% e e.e. 93%), **13b** (Reação 13, concentração do álcool 87% e e.e. 24%) e **16b** (Reação 16, concentração do álcool 86% e e.e. 23%), respectivamente, substituintes flúor, cloro e bromo, a reação não se completa, nem com maiores tempos reacionais, sendo que foram testados 72 e 96 horas de reação obtendo-se resultados semelhantes a 48 horas de reação.

Os halogênios são substituintes elétron-doadores por conjugação e elétron-atraentes por indução (CLAYDEN, 2001). A maior conversão foi observada no caso em que o flúor é substituinte, possivelmente seja devido a maior eficiência de conjugação entre os elétrons do orbital $2p$ do flúor e o sistema π do anel aromático, prevalecendo o efeito doador de elétrons por conjugação, o que parece tornar o composto mais reativo para a reação de oxidação. No caso do cloro e bromo, os orbitais envolvidos são o $3p$ para o cloro e $4p$ para o bromo,

tornando o efeito doador de elétrons por conjugação menos eficiente. No caso do composto **1b** (*R,S*)-1-feniletanol, que não possui substituintes, a reação apresenta concentração do álcool de 61% e e.e. de 85%.

Para o composto **19b** (Reação 19) que tem como substituinte o grupo nitro, que é por natureza atraente de elétrons e neste caso desativante para a reação de oxidação, observa-se conversões na faixa de 50% e e.e. >99%. Fato que não sustentaria o proposto acima, porém é descrito em literatura casos em que grupos ricos em elétrons pode se complexar com o anel aromático elétron-deficiente do cofator NAD^+ e esta interação tornar a reação eficiente (BENDER, 1971).

4.6.2 Resolução cinética de alcoóis secundários di-arílicos

Pelos excelentes resultados obtidos até esta etapa do projeto resolveu-se testar a eficácia da reação de oxidação utilizando a bactéria R1AF57 também para alguns alcoóis secundários di-arílicos, esquema 24. Esses alcoóis têm como característica possuir dois anéis aromáticos sobre o carbono que possui o grupo funcional que sofre a reação de oxidação durante o curso reacional. Normalmente as reações de oxidação utilizando biocatalisador não apresentam bom desempenho para esse tipo de composto (PÉREZ, 2000).

Esquema 24. Reação esperada para alcoóis di-arílicos utilizando a bactéria R1AF57

Os alcoóis **22b** a **25b**, com substituintes na posição *para* em um dos anéis aromáticos foram testados. A presença de um substituinte em um dos anéis aromáticos se faz necessária considerando que o composto não pode apresentar similaridade entre os grupos ligados ao carbono quartenário (neste caso, o carbono que carrega o grupo funcional), deve haver alguma diferença estrutural entre os substituintes do grupo funcional para o reconhecimento do substrato pela enzima. A posição *para* foi selecionada observando os resultados dos estudos anteriores, onde percebeu-se que a atividade da ADH presente na bactéria R1AF57 pode ser influenciada por substituintes nesta posição, porém sem efeito negativo de impedimento estérico.

As condições de análise foram idênticas aos estudos anteriores. A reação de oxidação foi avaliada tanto com bactérias em crescimento quanto para bactérias ressuspensas em tampão fosfato. Porém foram testados tempos reacionais de 48, 72 e 96 horas. A avaliação da conversão e excesso enantiomérico foi realizada por cromatografia líquida. A coluna ODH foi utilizada para os compostos **22b** e **23b** e ADH para os compostos **24b** e **25b**.

A reação para estes compostos está representada no esquema 24. Os resultados obtidos estão de acordo com o descrito em literatura, pois não foi detectada qualquer oxidação desses compostos. As reações biocatalisadas de maneira enantiosseletiva normalmente ocorrem quando o composto tem dois grupos de tamanhos diferentes ao redor do grupo funcional (figura 8), pois se acredita que seja através dessa estrutura que haja o reconhecimento e orientação espacial do substrato pela enzima. Além disso, com a presença de dois anéis aromáticos o acesso ao hidreto que deve ser retirado pode estar impedido estericamente.

Figura 8. Estrutura de um substrato ideal para reações catalisadas por enzimas

4.6.3 Resolução cinética dos compostos *(RS)*-1-fenilpropanol e *(RS)*-1-fenilpropano-2-ol

Foi verificado no item anterior que a reação não é possível com a presença de dois anéis aromáticos como substituinte no carbono que carrega o grupo funcional. Ou seja, pode-se concluir que seja necessário ao menos um grupo alifático (grupo pequeno) ligado ao carbono que carrega o grupo funcional para que ocorra a reação.

Neste estudo foi verificado se uma mudança neste grupo alifático afetaria a oxidação, considerando que até o momento foi testado somente derivados do 1-feniletanol, ou seja, somente foram testados compostos com o grupo alifático *metila*.

Figura 9. Compostos **26b** e **27b** utilizados para RCE com a bactéria R1AF57

Foi analisado o comportamento reacional para os compostos **26b**-(*RS*)-1-fenilpropanol e **27b**-(*RS*)-1-fenilpropan-2-ol, figura 9. O composto **26b** apresenta um aumento de um carbono no grupo alifático e o **27b** tem um carbono excedente entre o grupo funcional álcool

e o anel aromático, o que permite avaliar a necessidade da presença do anel aromático em conjugação com o carbono do grupo funcional.

Tabela 8. Avaliação do espectro de atividade enzimática da bactéria R1AF57 na reação de oxidação enantiosseletiva para os compostos 26b e 27b

Reação	Composto	Tempo reacional	Biomassa	Cetona		
				Conc. (%) ^a	Conc. (%) ^a	e.e. (%) ^b
1	26b	48 horas	crescimento ^c	41	59	82
2			suspensão ^d	36	54	81
3		72 horas	crescimento	47	53	95
4			suspensão	45	55	93
5	27b	48 horas	crescimento	55	45	>99
6			suspensão	48	52	92
7		72 horas	crescimento	50	50	>99
8			suspensão	48	52	>99

Condições reacionais: 32°C; 160 rpm; 20 mg substrato/100µL DMF; ^aconc.= concentração e ^be.e.= excesso enantiomérico determinados por cromatografia gasosa; ^c20 mL meio de cultura NB com células da bactéria R1AF57 em crescimento; ^d20 mL de células centrifugadas da bactéria R1AF57 e ressuspensas em 20 mL de tampão fosfato pH 7.

Pelos resultados apresentados na tabela 8 pode-se observar que o composto **26b**, que possui como substituinte o grupo etila no carbono do grupo funcional, não alcança a conversão e enantiosseletividade no tempo de 48 horas, ou seja não atinge 50% de conversão e >99% de excesso enantiomérico (Reações **1** e **2**). E mesmo em 72 horas de reação o excesso enantiomérico é de 95% para reação com as bactérias em crescimento (Reação **3**), e 93% para

as bactérias ressuspensas em tampão fosfato (Reação **4**). Pode-se concluir que o aumento do grupo alifático afeta a enantiosseletividade de forma moderada, pois o excesso enantiomérico e conversão continuam altos e próximos das condições ideais de uma resolução cinética.

Por outro lado o composto **27b** apresentou excelentes resultados já em 48 horas de reação, com excessos enantioméricos >99% (Reação **5**) e 92% (Reação **6**) nos dois meios reacionais avaliados (bactérias em crescimento e biomassa ressuspensa, respectivamente). Após 72 horas de reação o excesso enantiomérico nos dois casos foi >99% (Reações **7** e **8**).

Comparando-se os resultados obtidos com a biomassa ressuspensa em tampão fosfato, os compostos **1b**-(*RS*)-1-feniletanol (concentração do álcool 61% e e.e. 85%, reação **1** da tabela 8) e **27b**-(*RS*)-1-fenilpropano-2-ol (concentração do álcool 52% e e.e. 92%, reação **2** da tabela 9) no tempo de 48 horas de reação, pode-se notar que o deslocamento do anel aromático para a posição β ao grupo funcional torna o composto mais reativo.

Dos diversos substratos avaliados até o momento, pode-se notar alguma regularidade de comportamento em relação à estrutura do substrato e a reação de oxidação com a bactéria R1AF57. Porém para alguns comportamentos que fogem a essa regularidade um fator não considerado ainda, mas de grande importância pode estar influenciando esses resultados, que é em relação a álcool desidrogenase atuante na oxidação, por utilizar a célula da bactéria inteira pode ser que um extrato enzimático (diversas enzimas) e não somente uma enzima participe da reação e alguns substratos, por exemplo, o **27b**, seja um melhor substrato para uma dessas enzimas.

4.6.4 Resolução cinética do (*RS*)-2-octanol

Incentivados pelos excelentes resultados obtidos para o composto **27b**, onde não se faz necessária a presença de um anel aromático ligado ao carbono que possui o grupo funcional para a reação ocorrer, resolveu-se testar a atividade enzimática da bactéria R1AF57 na resolução cinética do **28b**-(*RS*)-2-octanol, um composto alifático.

A avaliação da conversão e excesso enantiomérico foi realizada por cromatografia gasosa, porém para a análise do excesso enantiomérico houve a necessidade de realizar acetilação do composto **28b**, pela dificuldade de sua separação enantiomérica, figura 10.

Figura 10. (a) Reação de acetilação do (*RS*)-2-octanol; (b) Cromatograma do (*RS*)-2-octanol; (c) Cromatograma da separação enantiomérica do éster obtido após reação de acetilação do (*RS*)-2-octanol

Os resultados da reação biocatalisada com a bactéria R1AF57 para o composto **28b** estão apresentados na tabela 9. Como se pode observar nos dados obtidos, a reação de

oxidação enantiosseletiva, diferente dos compostos aromáticos avaliados, é mais eficiente quando se utiliza as bactérias ressuspensas em meio tamponado, onde são observados maiores excessos enantioméricos (81%, reação 4, tabela 9), após 72 horas de reação.

Tabela 9. Avaliação do espectro de atividade enzimática na reação de oxidação enantiosseletiva do composto 28b mediada pela bactéria R1AF57

28b

Composto	Tempo reacional	Biomassa	Cetona	Álcool	
			Conc. (%) ^a	Conc. (%) ^a	e.e. (%) ^b
28b	48 horas	crescimento ^c	-	100	20
		suspensão ^d	6	94	46
	72 horas	crescimento	-	100	20
		suspensão	11	89	81

Condições reacionais: 32°C; 160 rpm; 20 mg substrato/100µL DMF; ^aconc.= concentração e ^be.e.= excesso enantiomérico determinados por cromatografia gasosa; ^c20 mL meio de cultura NB com células da bactéria R1AF57 em crescimento; ^d20 mL de células centrifugadas da bactéria R1AF57 e ressuspensas em 20 mL de tampão fosfato pH 7.

Observa-se também que a concentração da cetona **28a** produzida não é proporcional a concentração de álcool, fato que deveria ser observado em reações de resolução cinética de alcoóis através de oxidação de um dos enantiômeros. Nos casos em que a reação foi realizada em meio de cultura com as bactérias em crescimento nenhum traço de cetona foi observado, porém o álcool apresentou 20% de excesso enantiomérico, ou seja, ocorreu oxidação. Neste caso teriam-se duas possíveis causas: 1. Oxidação do álcool racêmico seguida de degradação da cetona produzida; ou 2. Oxidação seguida de redução da cetona, num ciclo de desracemização desse composto alifático.

Para elucidar a questão, um teste seguindo idênticas condições reacionais da reação com o 2-octanol foi realizado, porém utilizando como substrato a 2-octanona **28a**. Para isso

três reações foram avaliadas simultaneamente: a) meio de cultura com bactérias em crescimento; b) biomassa ressuspensa em tampão fosfato; c) branco de análise (mesmas condições reacionais, porém sem utilizar a bactéria). As análises foram realizadas em duplicata.

Ao final de 48 horas as amostras foram extraídas com um mesmo volume de acetato de etila (5 mL) e avaliadas por cromatografia gasosa. A comparação entre o branco de análise e as reações com a bactéria foi realizada em relação a área de resposta do pico da cetona. Considerando o branco de análise como sendo 100% do composto **28a** adicionado, por não ter sofrido influência do biocatalisador. Os resultados apresentados no gráfico 3 foram obtidos.

Gráfico 3. Áreas obtidas por CG/DIC dos ensaios realizados com a cetona 28a (2-octanona) para verificar possível degradação do composto durante a reação biocatalisada pela bactéria R1AF57

Ressaltando que não foi detectada a presença do álcool nos ensaios realizados, podemos concluir pelos resultados do gráfico 3 que pode estar ocorrendo degradação da cetona na presença do biocatalisador, pois as áreas observadas no caso em que as reações ocorrem na presença do biocatalisador são muito menores do que no ensaio do “branco”. Outra possibilidade seria a ineficiente extração do composto alifático das células da bactéria.

Através de testes realizados observou-se que a reação é intracelular. Ou seja, é necessário extrair os produtos da reação do interior da célula para posterior análise, sendo o álcool mais facilmente extraído por ser uma molécula mais polar que a cetona. Porém pela diferença de área observada entre os ensaios realizados, a primeira opção, que considera a degradação da cetona seria mais plausível. Uma forma de esclarecer essa dúvida é realizar a purificação enzimática e repetir os ensaios com a enzima purificada.

4.6.5 Rendimento isolado

Foram realizados testes de rendimento isolado para verificar a recuperação do produto, visto que o mesmo poderia ficar retido no interior da célula, e até este momento, somente haviam sido realizados ensaios qualitativos.

Para isto, primeiro realizou-se um ensaio para verificar se a reação era intra ou extracelular. Utilizou-se como substrato modelo o (*RS*)-1-feniletanol. Preparou-se o meio de cultura e após o crescimento celular centrifugou-se as células da bactéria e foi utilizado como meio reacional o sobrenadante. Neste caso, obteve-se ao final de 48 horas de reação, concentração do álcool de 92% e excesso enantiomérico <1%. Ou seja, é necessária a presença das células para ocorrer a reação, podendo-se supor que a reação seja intracelular, ou que as enzimas responsáveis pela oxidação se mantêm no interior da célula.

Para os testes de rendimento isolado, foi também utilizado como substrato modelo o (*RS*)-1-feniletanol, aumentando-se a escala reacional em 10 vezes, ou seja, foi utilizado 200 mg de substrato. Para a extração foram testados 2 solventes (diclorometano e acetato de etila), sendo que o diclorometano formou emulsão com o meio reacional e ocorreu perda do produto. Utilizando o acetato de etila não foi observado emulsão. Seguiu-se o procedimento como descrito na figura 11.

Figura 11. Fluxograma do procedimento realizado para a determinação do rendimento isolado da reação de oxidação do (RS)-1-feniletanol mediada pela bactéria R1AF57

A extração do sobrenadante foi realizada 3 vezes com 50 mL de acetato de etila, e das células 3 vezes com 5 mL de acetato de etila. Como pode ser observado na figura 11, não foi observado produto na extração das células mostrando que a reação é intracelular porém depois da oxidação o produto retorna ao sobrenadante. O ensaio foi realizado em triplicata, e a média do rendimento isolado foi de 33% e em todos os casos excesso enantiomérico maior que 99%. Lembrando que o rendimento máximo seria de 50% para essa reação.

4.6.6 Estudo de Resolução Cinética Dinâmica por estereoinversão utilizando borohidreto de sódio e a bactéria R1AF57 como fonte de ADH/NAD(P)⁺

Nesta etapa, na tentativa de obter maiores rendimentos do álcool enantiomericamente puro a partir do substrato racêmico, foi proposto um protocolo de Resolução Cinética Dinâmica (RCD), o qual consistiu em desenvolver uma sequência de oxidação/redução para estereoinversão do álcool racêmico. Esta sequência trata-se de um processo quimio-enzimático “one-pot” por utilizar num mesmo frasco reacional, a bactéria R1AF57 como fonte de ADH/NAD(P)⁺ para o passo da oxidação enantiosseletiva, e borohidreto de sódio

para reduzir não-seletivamente a cetona formada retornando ao álcool racêmico, esquema 25, formando um ciclo reacional.

Esquema 25. Processo proposto de RCD utilizando a bactéria R1AF57 e NaBH₄

Considerando que o primeiro passo da reação é uma oxidação enantiosseletiva e o segundo passo uma redução não-seletiva, no primeiro ciclo a cetona seria reduzida para iguais quantidades de enantiômeros *S* e *R*, ou seja, 25% de cada. Como consequência, a composição enantiomérica de *S/R* seria 75/25. Teoricamente, em quatro ciclos seria obtido o álcool com >90% de excesso enantiomérico, gráfico 4.

Gráfico 4. Ciclos necessários para desracemização de alcoóis através de uma sequência de oxidação/redução

Em testes anteriores foi verificado que 20 mL de meio de cultura com células de bactérias centrifugadas seriam suficientes para oxidar 20 mg de substrato, ou seja, essa quantidade de biocatalisador é suficiente para oxidar um dos enantiômeros, o que caracteriza 10 mg do substrato. Portanto, se a intenção é oxidar todo o substrato seria necessário centrifugar 40 mL de meio de cultura para a obtenção da biomassa, resultando em aproximadamente 800 mg de biomassa (células úmidas).

O meio reacional utilizado foi em tampão fosfato para minimizar presença de possíveis interferentes do meio de cultura no qual a bactéria foi cultivada. Sabendo-se também de estudos anteriores, que nem todos os substratos foram completamente oxidados em tampão fosfato, foi selecionado como substrato modelo o composto **4b**-(*RS*)-1-(4-metilfenil)-etanol que apresentou excelentes resultados tanto em meio de cultura com bactérias em crescimento (Reação 4, tabela 6, concentração do álcool 50% e e.e. >99%) quanto em células ressuspensas em tampão fosfato (Reação 4, tabela 7, concentração do álcool 51% e e.e. >99%). O borohidreto de sódio foi adicionado ao meio reacional em duas razões estequiométricas: 4 equivalentes (22,2 mg) e 9 equivalentes (50,0 mg) em relação ao substrato.

Para controle das reações foi realizado um controle-padrão junto aos ensaios de RCD, que neste caso, seguiu-se todo o protocolo e condições reacionais dos ensaios, porém sem a adição do borohidreto de sódio. O primeiro ensaio realizado envolveu a adição do borohidreto no início da reação e após 24 horas do início da oxidação enantiosseletiva. Escolheu-se este tempo de 24 horas para adição do borohidreto, pois observando o gráfico 2 percebeu-se, pela cinética da reação, que em 24 horas já havia uma quantidade significativa da cetona formada pela oxidação e o enantiômero *R* havia sido quase completamente oxidado. Os resultados obtidos de todos os ensaios estão apresentando na tabela 10.

Tabela 10. Resultados obtidos dos ensaios de Resolução Cinética Dinâmica utilizando a bactéria R1AF57 e NaBH₄

Reação	Tempo de adição do NaBH ₄ (h) ^c	Equival. de NaBH ₄ (eq)	Vol. de tampão fosfato (mL)	Tempo de reação (h) ^d	Biomassa (g) ^e	Cetona	Álcool	
						Conc. (%) ^a	Conc. (%) ^a	e.e. (%) ^b
1^f	-	-	-	-	-	50	50	>99
2	0	9	20	48	0,8	4	96	8
3	24	9	20	48	0,8	2	98	51
4	24	4	20	48	0,8	4	96	55
5	24	4	20	72	0,8	4	96	59
6	24	9	20	48	0,8	2	98	51
7	24	9	20	72	0,8	2	98	51
8	24	4	40	48	0,8	24	76	>99
9	24	4	40	72	0,8	21	79	>99
10	24	9	40	48	0,8	3	97	57
11	24	9	40	72	0,8	5	95	62
12	24	4	40	72	1,6	22	78	>99
13	24	9	40	72	1,6	7	93	65

Condições reacionais: 32°C; 160 rpm; 20 mg **4b**-(*RS*)-1-(4-metilfenil)-etanol /100μL DMF; ^aconc.= concentração e ^be.e.= excesso enantiomérico determinados por cromatografia gasosa; ^cTempo no qual o borohidreto é adicionado após o início da reação enzimática; ^dTempo reacional total; ^eCélulas centrifugadas da bactéria R1AF57 e ressuspensas em tampão fosfato; ^fControle-padrão sem adição de borohidreto de sódio, foram obtidos resultados semelhantes para todas as condições reacionais de volume de tampão fosfato, tempo reacional e quantidade de biomassa.

Utilizando idênticas condições reacionais (equivalentes de NaBH₄, volume de tampão fosfato e quantidade de biomassa), os resultados com o borohidreto adicionado após 24 horas de reação, figura 12b (Reação **3** da tabela 10, e.e. 51%) foram significativamente melhores do que adicionando o borohidreto no início da reação, figura 12a (Reação **2** da tabela 10, e.e. de 8%).

Figura 12. a) Cromatograma obtido da reação de RCD adicionando o NaBH_4 no início da reação; b) Cromatograma obtido da reação de RCD adicionando o NaBH_4 após 24 horas do início da reação

Estabelecido o tempo de adição de borohidreto de sódio nas reações. Para o segundo ensaio foi utilizado 20 mL de tampão fosfato para ressuspensão das células (o mesmo volume de estudos anteriores) e variou-se os equivalentes de NaBH_4 adicionado e o tempo reacional. Os resultados obtidos nas reações **4**, **5**, **6** e **7** da tabela 10, apresentaram-se muito semelhantes em termos de conversão e excesso enantiomérico, com destaque para a reação **5** que apresentou excesso enantiomérico de 59%.

Considerando o volume de meio de cultura com o biocatalisador (20 mL) definido no item 4.3 para 20 mg de substrato e também que a reação pode estar seguindo um perfil cinético semelhante ao proposto por Michaelis-Menten, figura 13, onde a concentração do substrato é fator determinante para a velocidade da reação, maiores concentrações de

substrato [S] não alterariam a velocidade da reação, uma vez que a velocidade máxima ($V_{\max}$) já foi atingida.

Figura 13. Concentração do substrato [S] versus velocidade baseado na equação de Michaelis-Menten. A constante de Michaelis-Menten, K_M , é a concentração do substrato na qual a reação enzimática procede na metade da velocidade, $\frac{1}{2} V_{\max}$, da velocidade máxima $V_{\max}$.

Portanto devia-se utilizar a mesma concentração do substrato no meio reacional dos ensaios anteriores. Se 20 mL foi o volume de meio reacional onde o biocatalisador oxidou 10 mg do enantiômero *R*, pois numa RCE somente um dos enantiômeros é oxidado, a concentração do substrato no meio reacional era de 0,5 mg/mL (10 mg do enantiômero a ser oxidado em 20 mL de meio reacional). No presente estudo, para se alcançar a mesma razão de concentração, onde os 20 mg de substrato deveriam ser completamente oxidados, teria-se que usar o dobro do volume de tampão fosfato para realizar as reações (20 mg de substrato em 40 mL de tampão fosfato), caso contrário restaria substrato no meio reacional, como observado nas reações **4**, **5**, **6** e **7** da tabela 10, onde foi utilizado 20 mL de tampão fosfato para ressuspender a biomassa.

Alterando o volume de tampão fosfato para 40 mL, foram obtidos os resultados das reações **8**, **9**, **10** e **11** da tabela 10. O melhor resultado, considerando excesso enantiomérico foi em 72 horas e 4 equivalentes de NaBH_4 onde alcançou-se e.e. >99%, figura 14a (Reação

9, 79% de *S-4b* e 21% de **4a**), percebe-se nesse ensaio que o NaBH_4 não foi suficiente para reduzir a cetona formada, ou seja, ao final do primeiro ciclo (gráfico 4), teria-se teoricamente 75% de *S-4b* e 25% de *R-4b*. Porém quando se utiliza 9 equivalentes do NaBH_4 , com mesmo tempo reacional, chega-se a uma proporção mais próxima da teórica, quase completando o segundo ciclo de desracemização, figura 14b (Reação **11**, 78% de *S-4b*, 18% de *R-4b* e 4% da cetona-**4a**).

Nota-se que os resultados em 48 horas (Reações **8** e **9**) são muito semelhantes aos resultados obtidos em 72 horas de tempo reacional (Reações **10** e **11**). O que fornece indícios que a enzima pode estar sendo desativada (desnaturada) pelo borohidreto de sódio devido ao longo tempo de contato.

Figura 14. a) Cromatograma obtido da reação de RCD utilizando 40 mL de tampão fosfato e 4 equivalentes de NaBH_4 ; b) Cromatograma obtido da reação de RCD utilizando 40 mL de tampão fosfato e 9 equivalentes de NaBH_4

Com quantidades maiores de biomassa (1,6 g) os resultados se mantêm praticamente inalterados (Reações **12** e **13**). Lembrando que, se a reação estiver seguindo um perfil semelhante à cinética de Michaelis-Menten, quantidades maiores do catalisador não alterariam os resultados.

5. Conclusão

Nas condições experimentais avaliadas, a bactéria *Sphingobacterium* sp apresentou excelente atividade catalítica para oxidação completa de alcoóis secundários aromáticos, enquanto que a bactéria *Arthrobacter atrocyaneus* apresentou excelentes resultados em resolução cinética desses alcoóis através de oxidação seletiva do enantiômero-*R*. Essas bactérias foram pela primeira vez estudadas como biocatalisadores em reações de oxidação de alcoóis secundários.

A bactéria *A. atrocyaneus* se mostrou uma excelente fonte de álcool desidrogenase com especificidade para oxidar alcoóis com configuração (*R*). Após 48 horas de reação oxidação, obteve-se apenas um dos enantiômeros dos derivados do (*RS*)-1-feniletanol com excessos enantioméricos >99%. Não foi observada oxidação com substratos diarílicos, mostrando que esse tipo de composto não é um bom substrato nas condições avaliadas. Por outro lado, foi possível oxidar substratos alifáticos com moderada seletividade.

O rendimento isolado para o (*S*)-1-feniletanol obtido foi em torno de 33% (considerando que é possível alcançar 50% de rendimento teórico em reações de resolução cinética), o que mostra uma alta recuperação, mesmo utilizando as células inteiras da bactéria. Neste ensaio foi utilizado 200 mg de substrato que também é um indicativo que essa bactéria permite aumento de escala reacional sem perda significativa da enantiosseletividade.

Foi possível alcançar maiores rendimentos do álcool enantiomericamente puro, adicionando somente mais um reagente no meio reacional (borohidreto de sódio), sem alterar significativamente as condições reacionais.

6. Parte Experimental

6.1 Materiais e Métodos

Os materiais e equipamentos que foram utilizados:

- i. Cromatógrafo gasoso 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);
- ii. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CL-10AD) da marca Shimadzu equipado com detector de UV-Vis e um autoinjeter. Colunas quirais utilizadas: Daicel Chiralcel OD-H (0,46 cm x 25 cm), Daicel Chiralpak AD-H (0,46 cm x 25 cm), Daicel Chiralcel OD (0,46 cm x 25 cm) e Daicel Chiralcel OJ-H (0,46 cm x 25 cm);
- iii. Os espectros de massa foram obtidos em um CG/EM da marca Shimadzu P5050A com coluna capilar de sílica fundida da marca J&W Scientific DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m);
- iv. 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) são dadas em Hertz;
- v. Para medida da rotação óptica foi utilizado o polarímetro da marca Jasco DIP-378 (cubeta de 1 dm);

- vi. Os espectros no infravermelho foram obtidos em um espectrômetro BOMEM MB 100 com pastilhas de KBr e as frequências de absorção estão expressas em cm^{-1} ;
- vii. Os solventes foram utilizados com grau de pureza P.A. ou destilados conforme a necessidade seguindo procedimentos descritos em literatura (PERRIN, 1996);
- viii. Placas de cromatografia em camada delgada (folhas de alumínio 60 F₂₅₄ Merck);
- ix. Sílica (230-400 mesh) para cromatografia em coluna;
- x. Autoclave Vertical Phoenix para esterilização de materiais e vidrarias;
- xi. Incubadora refrigerada com agitação Tecnal TE-421;
- xii. Capela de fluxo laminar Fisher Hamilton *Class II Biological Safety Cabinet*.

Método de análise CG/EM: (He, fluxo total: 42 mL/min, Coluna DB5-MS 30m x 0,25mm x 1 μ m) – Temperatura do injetor 270 °C; temperatura do detector 270 °C; programa do forno: 100 °C, 10 °C/minuto até 250 °C, total 55 minutos.

6.2 Obtenção dos substratos racêmicos

6.2.1 Preparo dos alcoóis secundários derivados do 1-feniletanol 1b-19b e 28b

Em um balão de 25 mL de 1 via adicionou-se 1 mmol da cetona, 1,1 mmol (42 mg) de borohidreto de sódio e 10 mL de etanol. A reação foi realizada sob agitação magnética 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 à

vácuo. Seguiu-se adicionando 10 mL de água destilada e o ajuste do pH para 6 foi realizado com ácido clorídrico 1M.

A extração foi realizada em funil de separação com diclorometano (3 vezes de 10 mL). A fase orgânica resultante foi seca com sulfato de magnésio anidro e o solvente removido à vácuo. O produto foi purificado, conforme a necessidade, em coluna contendo sílica gel. Os rendimentos obtidos para os alcoóis **1b-19b** e **28b** foram entre 70-90%.

1-feniletanol (1b)

IV (KBr) cm^{-1} : 3364, 3063, 2974, 1603, 1586, 1494, 1453, 1078.

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, $J = 6,3$ 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: enantiômero-*R* = 5,68 min; enantiômero-*S* = 6,07 min.

1-(2-metilfenil)-etanol (2b)

IV (KBr) cm^{-1} : 3357, 3025, 2973, 1488, 1459, 1369, 1077, 760.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7,49-7,46 (m, 1H); 7,24-7,09 (m, 4H); 5,08 (q, $J = 6,3$ Hz, 1H); 2,32 (s, 3H); 2,06 (s, 1H); 1,43 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ ppm: 143,8; 134,1; 130,3 127,1; 126,3; 124,4; 66,7; 23,8; 18,8.

EM, m/z (intensidade relativa %): 136 (20), 121 (96), 119 (22), 118 (86), 93 (100), 91 (99), 77 (63), 65 (36), 43 (46).

Método de análise CG/DIC: (H₂, 100 kPa, Coluna Chirasil-Dex CB) – Temperatura do injetor 220 °C; temperatura do detector 220 °C; isoterma: 123 °C-12 minutos, t_R (min) = tempo de retenção dos enantiômeros = 8,00 min e 10,00 min.

1-(3-metilfenil)-etanol (3b)

IV (KBr) cm^{-1} : 3361, 3026, 2973, 1451, 1488, 1370, 1076, 883, 787, 703.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7,24-7,05 (m, 4H); 4,80 (q, $J = 6,3$ Hz, 1H); 2,34 (s, 3H); 2,26 (s, 1H); 1,48 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ ppm: 145,8; 138,0; 128,3; 128,1; 126,0; 122,4; 70,3; 25,0; 21,4.

EM, m/z (intensidade relativa %): 136 (42), 121 (79), 93 (100), 91 (76), 77 (49), 65 (26), 43 (52).

Método de análise CG/DIC: (H₂, 100 kPa, Coluna Chirasil-Dex CB) – Temperatura do injetor 220 °C; temperatura do detector 220 °C; isoterma: 113 °C-14 minutos, t_R (min) = tempo de retenção: enantiômero-*R* = 10,73 min; enantiômero-*S* = 11,77 min.

1-(4-metilfenil)-etanol (4b)

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

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7,24 (d, $J = 8,1$ 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: (H₂, 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: enantiômero-*R* = 9,45 min; enantiômero-*S* = 10,84 min.

1-(2-metóxfenil)-etanol (5b)

IV (KBr) cm^{-1} : 3389, 3036, 2971, 1598, 1492, 1461, 1364, 1078, 755.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7,35-7,32 (m, 1H); 7,26-7,20 (m, 1H); 6,98-6,92 (m, 1H); 6,88-6,85 (m, 1H); 5,08 (m, 1H); 3,84 (s, 3H); 2,77 (s, 1H); 1,49 (d, J = 6,5 Hz, 3H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ ppm: 156,4; 133,4; 128,2; 126,0; 120,7; 110,3; 66,3; 60,3; 55,2; 22,8.

EM, m/z (intensidade relativa %): 152 (29), 137 (100), 109 (36), 107 (83), 91 (24), 77 (39), 65 (21), 43 (22).

Método de análise CG/DIC: (H₂, 100 kPa, Coluna Chirasil-Dex CB) – Temperatura do injetor 220 °C; temperatura do detector 220 °C; isoterma: 129 °C-12 minutos, t_R (min) = tempo de retenção dos enantiômeros = 8,85 min e 9,72 min.

1-(3-metóxfenil)-etanol (6b)

IV (KBr) cm^{-1} : 3393, 3053, 2972, 1602, 1488, 1464, 1370, 1106, 786, 700.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7,27-7,25 (m, 1H); 6,94-6,92 (m, 2H); 6,81-6,77 (m, 1H); 4,84 (q, J = 6,3 Hz, 1H); 3,80 (s, 3H); 2,16 (s, 1H); 1,46 (d, J = 6,6 Hz, 3H).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 159,8; 147,8; 129,6; 117,8; 112,9; 111,0; 70,3; 55,3; 25,3.

EM, m/z (intensidade relativa %): 152 (42), 137 (36), 109 (100), 94 (31), 91 (11), 77 (35), 65 (17), 43 (107).

Método de análise CG/DIC: (H_2 , 100 kPa, Coluna Chirasil-Dex CB) – Temperatura do injetor 220 °C; temperatura do detector 220 °C; isoterma: 119 °C-24 minutos, t_R (min) = tempo de retenção: enantiômero-*R* = 17,93 min; enantiômero-*S* = 20,06 min.

1-(4-metóxfenil)-etanol (7b)

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 = 8,4 Hz, 2H); 6,87 (d, J = 8,7 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: (H_2 , 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: enantiômero-*R* = 11,71 min; enantiômero-*S* = 12,45 min.

1-(2-flúorfenil)-etanol (8b)

IV (KBr) cm^{-1} : 3366, 3046, 2978, 1617, 1587, 1489, 1453, 1369, 1225, 1078, 759.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 7,50-7,44 (m, 1H); 7,26- 7,18 (m, 1H); 7,16-7,09 (m, 1H); 7,00-6,96 (m, 1H); 5,17 (q, J = 6,5 Hz, 1H); 2,31 (s, 1H); 1,49 (d, J = 6,5 Hz, 3H).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 161,3; 158,0; 132,7; 132,5; 128,7; 128,6; 126,6; 126,5; 124,3; 124,2; 115,3; 115,0; 64,4; 64,3; 23,9.

EM, m/z (intensidade relativa): 140 (24), 125 (100), 97 (77), 77 (52), 62 (27), 51 (20), 43 (27).

Método de análise CG/DIC: (H_2 , 100 kPa, Coluna Chirasil-Dex CB) – Temperatura do injetor 220 °C; temperatura do detector 220 °C; programa forno: 100 °C, 3 °C/minuto até 140, total 13,3 minutos, t_R (min) = tempo de retenção dos enantiômeros: = 6,39 min e 6,84 min.

1-(3-flúorfenil)-etanol (9b)

IV (KBr) cm^{-1} : 3354, 3073, 2977, 1615, 1591, 1487, 1451, 1372, 1144, 1073, 872, 788.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 7,31-7,24 (m, 1H); 7,10-7,04 (m, 2H);

6,97-6,90 (m, 1H); 4,84 (q, $J = 6,6$ Hz, 1H); 2,51 (s, 1H); 1,44 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 164,8; 161,5; 148,8; 148,7; 130,2; 130,1; 121,14; 121,10; 114,5; 114,2; 112,6; 112,3; 69,9; 25,3.

EM, m/z (intensidade relativa): 140 (27), 125 (86), 97 (100), 77 (38), 62 (22), 43 (45).

Método de análise CG/DIC: (H_2 , 100 kPa, Coluna Chirasil-Dex CB) – Temperatura do injetor 220 °C; temperatura do detector 220 °C; programa forno: 100 °C, 3 °C/minuto até 140, total 13,3 minutos, t_R (min) = tempo de retenção: enantiômero-*R* = 5,83 min; enantiômero-*S* = 6,26 min.

1-(4-fluorfenil)-etanol (10b)

IV (KBr) cm^{-1} : 3354, 3067, 2977, 1574, 1473, 1441, 1369, 1201, 1093, 900.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 7,31-7,26 (m, 2H); 7,04-6,97 (m, 2H); 4,84 (q, $J = 6,4$ Hz, 1H); 2,31 (s, 1H); 1,44 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 163,7; 160,4; 141,5; 141,4; 127,0; 126,9; 115,3; 115,0; 69,6; 25,2.

EM, m/z (intensidade relativa): 140 (3723), 125 (100), 123 (18), 97 (87), 77 (38), 62 (24), 43 (58).

Método de análise CG/DIC: (H_2 , 100 kPa, Coluna Chirasil-Dex CB) – Temperatura do injetor 220 °C; temperatura do detector 220 °C; programa forno: 100 °C, 3 °C/minuto até 140, total 13,3 minutos, t_R (min) = tempo de retenção: enantiômero-*R* = 5,67 min; enantiômero-*S* = 6,13 min.

1-(2-clorofenil)-etanol (11b)

IV (KBr) cm^{-1} : 3351, 3067, 2977, 1574, 1473, 1441, 1369, 1094, 755, 692.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 7,59-7,57 (m, 1H); 7,33-7,26 (m, 2H);

7,22-7,16 (m, 1H); 5,28 (q, $J = 6,6$ Hz, 1H); 2,18 (s, 1H); 1,48 (d, $J = 6,6$ Hz,

3H).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 143,1; 131,7; 129,4; 128,4; 127,2; 126,4; 125,4; 67,0;

23,5.

EM, m/z (intensidade relativa): 158 (7), 156 (22), 143 (30), 141 (86), 115 (9), 113 (30), 77 (100), 51 (25), 43 (28).

Método de análise CG/DIC: (H_2 , 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 dos enantiômeros = 7,09 min e 8,92 min.

1-(3-clorofenil)-etanol (12b)

IV (KBr) cm^{-1} : 3350, 3066, 2976, 1598, 1575, 1476, 1429, 1373, 1078, 909, 786, 697.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 7,37-7,36 (m, 1H); 7,29-7,20 (m, 3H);

4,85 (q, $J = 6,6$ Hz, 1H); 2,03 (s, 1H); 1,47 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ ppm: 148,1; 134,5; 129,9; 127,7; 125,8; 123,7; 69,9; 25,4.

EM, m/z (intensidade relativa): 158 (6), 156 (18), 143 (17), 141 (56), 115 (11), 113 (38), 77 (100), 51 (22), 43 (54).

Método de análise CG/DIC: (H_2 , 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: enantiômero-*R* = 7,66 min; enantiômero-*S* = 8,34 min.

1-(4-clorofenil)-etanol (13b)

IV (KBr) cm^{-1} : 3360, 3027, 2975, 1579, 1493, 1370, 1089, 829, 778.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7,32-7,26 (m, 4H); 4,84 (q, J = 6,6 Hz, 1H); 2,17 (s, 1H); 1,45 (d, J = 6,3 Hz, 3H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) 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: (H_2 , 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: enantiômero-*R* = 6,78 min; enantiômero-*S* = 7,47 min.

1-(2-bromofenil)-etanol (14b)

IV (KBr) cm^{-1} : 3349, 3064, 2975, 1591, 1568, 1469, 1440, 1092, 753, 668.

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7,59-7,56 (m, 1H); 7,51-7,48 (m, 1H); 7,35-7,30 (m, 1H); 7,25-7,08 (m, 1H); 5,22 (d, J = 6,6 Hz, 1H); 2,25 (s, 1H);

1,47 (d, J = 6,3 Hz, 3H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ ppm: 144,6; 132,7; 128,8; 127,9; 126,7; 121,7; 69,2; 23,8.

EM, m/z (intensidade relativa): 202 (18), 200 (19), 187 (74), 185 (82), 159 (21), 157 (26), 77 (100), 51 (32), 43 (38).

Método de análise CG/DIC: (H_2 , 100 kPa, Coluna Chirasil-Dex CB) – Temperatura do injetor 220 °C; temperatura do detector 220 °C; isoterma: 145°C-11 minutos, t_R (min) = tempo de retenção dos enantiômeros = 7,09 min e 9,12 min.

1-(3-bromofenil)-etanol (15b)

IV (KBr) cm^{-1} : 3350, 3063, 2975, 1595, 1570, 1474, 1450, 1371, 1072, 905, 786, 696, 668.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 7,51-7,50 (m, 1H); 7,40-7,36 (m, 1H); 7,27-7,24 (m, 1H); 7,21-7,16 (m, 1H); 4,82 (q, $J = 6,4$ Hz, 1H); 2,30 (s, 1H); 1,44 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 148,3; 130,6; 130,2; 128,7; 124,2; 122,7; 69,8; 25,3.

EM, m/z (intensidade relativa): 202 (16), 200 (16), 187(39), 185 (44), 159 (25), 157 (29), 77 (100), 51 (24), 43 (59).

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-15 minutos, t_R (min) = tempo de retenção: enantiômero-*R* = 11,90 min; enantiômero-*S* = 13,08 min.

1-(4-bromofenil)-etanol (16b)

IV (KBr) cm^{-1} : 3364, 2974, 2874, 1593, 1490, 1449, 1370, 1087, 825, 537.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) 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: enantiômero-*R* = 8,83 min; enantiômero-*S* = 9,64 min.

1-(2-nitrofenil)-etanol (17b)

IV (KBr) cm^{-1} : 3380, 2981, 2870, 1526, 1349, 1106, 747.

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 7,87 (d, J = 8,2 Hz, 1H); 7,82 (d, J = 7,9 Hz, 1H); 7,63 (t, J = 7,6 Hz, 1H); 7,40 (t, J = 7,7 Hz, 1H); 5,38 (q, J = 6,4 Hz, 1H); 2,96 (s, 1H); 1,54 (d, J = 6,4 Hz, 3H).

RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 147,8; 141,2; 133,7; 128,2; 127,7; 124,4; 65,6; 24,4.

EM, m/z (intensidade relativa): 152 (24), 134 (21), 121 (13), 104 (82), 91 (100), 77 (99), 65 (25), 43 (64).

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-15 minutos, t_R (min) = tempo de retenção dos enantiômeros 9,61 min e 11,43 min.

1-(3-nitrofenil)-etanol (18b)

IV (KBr) cm^{-1} : 3377, 2978, 2876, 1530, 1351, 1101, 917, 810, 784.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 8,23 (t, J = 2,1 Hz, 1H); 8,11-8,08 (m, 1H); 7,70 (d, J = 7,5 Hz, 1H); 7,51 (t, J = 7,8 Hz, 1H); 5,01 (q, J = 6,3 Hz, 1H); 2,59 (s, 1H); 1,52 (d, J = 6,3 Hz, 2H).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 148,5; 148,1; 131,8; 129,6; 122,4; 120,5; 69,5; 25,6.

EM, m/z (intensidade relativa %): 167 (9), 152 (47), 103 (36), 91 (15), 77 (53), 43 (100).

Método de análise CG/DIC: (H_2 , 100 kPa, Coluna Chirasil-Dex CB) – Temperatura do injetor 220 °C; temperatura do detector 220 °C; isoterma: 140°C-30 minutos, t_R (min) = tempo de retenção: enantiômero-*R* = 25,28 min; enantiômero-*S* = 27,25 min.

1-(4-nitrofenil)-etanol (19b)

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 = 8,9 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: enantiômero-*R* = 16,07 min; enantiômero-*S* = 18,01 min.

2-octanol (28b)

IV (KBr) cm^{-1} : 3353, 2961, 2929, 2857, 1464, 1375, 1115, 724.

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 3,82-3,76 (m, 1H); 1,77 (s, 1H); 1,50-1,55 (m, 3H); 1,31-1,23 (m, 7H); 1,22-1,18 (m, 3H); 0,70-0,30 (m, 3H).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 68,1; 39,3; 31,8; 29,3; 25,7; 23,4; 22,6; 14,0.

EM, m/z (intensidade relativa): 115 (7); 112 (7); 97 (24); 84 (19); 70 (19); 69 (20); 55 (74); 45 (100); 43 (50); 41 (50).

Método de análise CG/DIC: (H_2 , 150 kPa, Coluna Chirasil-Dex CB) – Temperatura do injetor 220 °C; temperatura do detector 220 °C; rampa de aquecimento: 60°C taxa

1,5°C/minuto até 85°C por 2,3 minutos, total: 19 minutos, t_R (min) = tempo de retenção dos enantiômeros (acetilado) = 13,20 min e 16,94 min.

Para avaliação da conversão e excesso enantiomérico o extrato da reação biocatalisada foi evaporado até aproximadamente 1 mL e o álcool foi acetilado pela adição de 250 μ L de anidrido acético e 50 μ L de piridina, deixou-se 1 h à 100°C.

6.2.2 Caracterização de outros compostos

1-(bifenil-3-il)-etanol (20b)

IV (KBr) cm^{-1} : 3320, 3031, 2971, 1565, 1486, 1451, 1087, 895, 761, 689.

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7,27-7,60 (m, 9H); 4,89 (q, J = 6,4 Hz, 1H); 2,29 (s, 1H); 1,49 (d, J = 6,4 Hz, 3H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ ppm: 146,5; 141,6; 141,3; 129,1; 128,9; 127,5; 127,3; 126,4; 124,4; 112,2; 70,6; 25,4.

EM, m/z (intensidade relativa): 198 (50), 183 (42), 155 (100), 152 (22), 91 (16), 77 (22).

Método de análise HPLC: Coluna Daicel Chiralcel OD, eluente: n-hexano/iso-propanol = 95:5, fluxo: 1 ml/min; UV 254 nm, t_R (min) = tempo de retenção: enantiômero-*R* = 30,95 min; enantiômero-*S* = 14,68 min.

1-(bifenil-4-il)-etanol (21b)

IV (KBr) cm^{-1} : 3362, 3032, 2972, 1599, 1479, 1453, 1370, 1075, 802.

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7,33-7,62 (m, 9H); 4,93 (q, J = 6,4 Hz, 1H); 1,97 (s, 1H); 1,52 (d, J = 6,6 Hz, 3H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ ppm: 145,0; 141,1; 140,7; 137,7; 129,0; 127,5; 127,3; 126,0; 70,4; 25,4.

EM, m/z (intensidade relativa): 198 (47), 183 (79), 180 (48), 155 (100), 152 (36), 91 (18), 77 (39).

Método de análise HPLC: Coluna Daicel Chiralcel OD, eluente: n-hexano/iso-propanol = 95:5, fluxo: 1 ml/min; UV 254 nm, t_R (min) = tempo de retenção: enantiômero-*R* = 13,95 min; enantiômero-*S* = 12,52 min.

(4-metilfenil)(fenil)metanol (22b)

IV (KBr) cm^{-1} : 3352, 3029, 2921, 1510, 1453, 1081, 860, 697.

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7,37-7,27 (m, 4H); 7,26-7,21 (m, 3H); 7,13-7,11 (m, 2H); 5,76 (s, 1H); 2,31 (s, 3H); 2,28 (s, 1H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ ppm: 143,9; 140,9; 137,2; 130,1; 129,6; 128,9; 128,6; 127,9; 127,0; 126,9; 126,0; 125,7; 75,8; 21,5.

EM, m/z (intensidade relativa): 198 (44); 183 (25); 165 (16); 119 (80); 105 (100); 92 (67); 91 (50); 77 (65); 65 (21); 51 (23).

Método de análise HPLC: Coluna Daicel Chiralcel ODH, eluente: n-hexano/iso-propanol = 95:5, fluxo: 1 ml/min; UV 230 nm, t_R (min) = tempo de retenção dos enantiômeros: 12,03 min e 13,50 min.

(4-isopropilfenil)(fenil)metanol (23b)

IV (KBr) cm^{-1} : 3328, 3026, 2957, 1601, 1510, 1492, 1451, 1361, 1382, 1110, 809, 722, 697.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7,38-7,17 (m, 9H); 5,78 (s, 1H); 2,87 (sept, $J = 7,0$ Hz, 1H); 2,29 (s, 1H); 1,21 (d, $J = 5,0$ Hz, 6H).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 148,2; 143,9; 141,3; 128,4; 127,4; 126,6; 126,5; 126,4; 76,1; 33,8; 23,9.

EM, m/z (intensidade relativa): 226 (13); 183 (24); 147 (31); 120 (19); 105 (100); 79 (29); 77 (42); 43 (37).

Método de análise HPLC: Coluna Daicel Chiralcel ODH, eluente: n-hexano/iso-propanol = 95:5, fluxo: 1 ml/min; UV 230 nm, t_R (min) = tempo de retenção dos enantiômeros: 10,15 e 11,14 min.

(4-bromofenil)(fenil)metanol (24b)

IV (KBr) cm^{-1} : 3363, 3060, 3027, 1587, 1482, 1451, 1107, 845, 714, 697, 551.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7,45-7,42 (m, 2H); 7,33- 7,32 (m, 4H); 7,29-7,25 (m, 1H); 7,24- 7,20 (m, 2H); 5,75 (s, 1H); 2,36 (s, 1H).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 143,3; 142,7; 131,5; 128,6; 128,2; 127,8; 126,5; 121,4; 75,6.

EM, m/z (intensidade relativa): 264 (5), 262 (5); 185 (16); 183 (18); 105 (100); 77 (42).

Método de análise HPLC: Coluna Daicel Chiralpak ADH, eluente: n-hexano/iso-propanol = 95:5, fluxo: 1 ml/min; UV 230 nm, t_R (min) = tempo de retenção dos enantiômeros: 12,90 e 14,53 min.

(bifenil-4-il)(fenil)metanol (25b)

IV (KBr) cm^{-1} : 3268, 3028, 1599, 1487, 1451, 1077, 809, 762, 728, 695, 564.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7,59-7,50 (m, 4H); 7,46-7,35 (m, 6H); 7,34- 7,29 (m, 3H); 7,27-7,20 (m, 1H); 5,83 (s, 1H); 2,40 (s, 1H).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 143,7; 142,8; 140,7; 140,4; 128,7; 128,5; 127,6; 127,2; 127,0; 126,9; 126,5; 76,0.

EM, m/z (intensidade relativa): 260 (50), 207 (28), 181 (44), 155 (94), 154 (68), 153 (25), 152 (32), 105 (100), 91 (18), 77 (52), 44 (22).

Método de análise HPLC: Coluna Daicel Chiralpak ADH, eluente: n-hexano/iso-propanol = 95:5, fluxo: 1 ml/min; UV 230 nm, t_R (min) = tempo de retenção dos enantiômeros: 19,36 e 20,80 min.

1-fenilpropanol (26b)

IV (KBr) cm^{-1} : 3363, 3031, 2975, 2879, 1451, 1369, 1075, 761, 700.

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7,35-7,22 (m, 5H); 4,84 (q, $J = 6,5$ Hz, 1H); 2,31 (s, 1H); 1,46 (d, $J = 6,5$ Hz, 2H); 1,23 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ ppm: 146,0; 128,6; 127,5; 125,5; 60,6; 25,2; 14,3.

EM, m/z (intensidade relativa): 136 (20), 107 (100), 79 (92), 77 (51), 51 (15).

Método de análise CG/DIC: (H_2 , 100 kPa, Coluna Chirasil-Dex CB) – Temperatura do injetor 220 °C; temperatura do detector 220 °C; coluna: 117°C – 7,0 minutos, t_R (min) = tempo de retenção dos enantiômeros: 5,20 min e 5,73 min.

1-fenilpropano-2-ol (27b)

IV (KBr) cm^{-1} : 3374, 3028, 2970, 2929, 1495, 1454, 1373, 1081, 743, 701.

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7,33-7,18 (m, 5H); 3,99 (sex, $J = 6,3$ Hz, 1H); 2,72 (m, 2H); 1,76 (s, 1H); 1,22 (d, $J = 6,0$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ ppm: 138,3; 129,1; 126,2; 68,6; 45,5; 22,5.

EM, m/z (intensidade relativa): 136 (4), 121 (4), 91 (100), 77 (5), 65 (22), 51 (10), 45 (40).

Método de análise CG/DIC: (H_2 , 100 kPa, Coluna Chirasil-Dex CB) – Temperatura do injetor 220 °C; temperatura do detector 220 °C; coluna: 97°C - 20 minutos, t_R (min) = tempo de retenção dos enantiômeros: 17,34 min e 18,50 min.

6.3 Determinação da configuração absoluta

Para os alcoóis *para*-substituídos a determinação da configuração absoluta foi realizada da seguinte forma:

- Reação de transesterificação enantiosseletiva do álcool racêmico utilizando a CAL-B e determinado o $[\alpha]_D$ do álcool não-esterificado e os dados comparados com aqueles descritos em literatura (NAEMURA, 1996; YADAV, 2002; WARSHEL, 1989);
- Por análise em CG, comparou-se o tempo de retenção do álcool obtido pela transesterificação com a CAL-B e o tempo de retenção obtido do produto das reações com a bactéria R1AF57.

Para os alcoóis *meta*-substituídos a configuração absoluta foi determinada a partir do produto obtido das reações biocatalisadas com a bactéria R1AF57 após purificação do produto em coluna com sílica gel, e comparado com resultados da literatura (NAEMURA, 1996; YADAV, 2002; WARSHEL, 1989).

6.3.1 Reação de transesterificação de feniletanóis catalisada por CAL-B

Esquema 26. Reação de transesterificação para determinação da configuração absoluta dos alcoóis *para*-substituídos

Em tubos de ensaio de 10 mL com tampa, adicionaram-se os alcoóis (0,25 mmol), o hexano (1 mL) e a lipase CAL-B (20 mg). Em seguida, adicionou-se o acetato de vinila (1 mmol, 0,1 mL). A mistura permaneceu sob agitação por 24 horas a 32°C e então foi realizada uma filtração e a enzima foi lavada com CH₂Cl₂ (3 x 3 mL). Na sequência, evaporou-se o

solvente e realizou-se a purificação via cromatografia em sílica gel utilizando como eluente a mistura hexano/acetato de etila (8:2).

6.4 Reações biocatalisadas

6.4.1 Preparo da solução tampão fosfato utilizada nas reações biocatalisadas

Para obtenção da solução tampão de fosfato duas soluções foram preparadas:

- Solução **1**: pesou-se 11,867 g de Na_2HPO_4 e dilui-se em 1 L de água destilada.
- Solução **2**: pesou-se 9,078 g de KH_2PO_4 e dilui-se em 1L de água destilada.

A solução final de tampão fosfato pH 7 foi obtida misturando-se 60% da solução **1** e 40% da solução **2**.

6.4.2 Preparo da solução de indutor

Preparou-se uma solução estoque de 100 mM, para isto foi pesado 1 mmol do composto indutor [0,156 g do (*RS*)-1-(4-clorofenil)etanol ou 0,136 g do (*RS*)-1-(4-metilfenil)etanol] e dissolvidos em 10 mL de acetona P.A. A solução foi então filtrada em membrana estéril de porosidade 0,2 μm . Todo o material utilizado para o preparo da solução foi previamente autoclavado por 20 minutos a 120°C. O indutor (*RS*)-1-(4-clorofenil)etanol foi utilizado com a bactéria R1AC23 e o (*RS*)-1-(4-metilfenil)etanol com a bactéria R1AF57.

6.4.3 Preparo do meio de cultura *NB* sem indutor

Para o preparo de 1 L de meio de cultura *NB* “Nutrient Broth” pesou-se 3 g de extrato de carne e 5 g de peptona bacteriológica e dissolveu-se em 1 L de água destilada.

6.4.4 Crescimento das bactérias em meio de cultura

Para o cultivo das bactérias duas etapas foram necessárias: a *pré-incubação* para reativar a bactéria e a *incubação* para crescimento da biomassa.

Pré-inóculo: Preparo de 50 mL de pré-inóculo em NB

Em um erlenmeyer de 250 mL foi adicionado 50 mL de meio *NB*. O meio foi autoclavado por 20 minutos a 120°C. Sob condições assépticas e em capela de fluxo laminar o meio foi inoculado (células da bactéria foram transferidas do meio de cultura sólido para o meio de cultura líquido com auxílio de uma alça de platina) e adicionou-se 250 µL da solução do composto indutor [1-(4-clorofenil)etanol para a bactéria R1AC23 e 1-(4-metilfenil)etanol para a bactérias R1AF57]. As culturas foram incubadas em um agitador orbital a 32°C e 160 rpm durante 48 horas.

Inóculo: Para preparo de 1 litro de meio de cultura NB

Em um erlenmeyer de 3 L foi adicionado 1 L de meio de cultura *NB*. O meio foi autoclavado por 20 minutos a 120°C. Sob condições assépticas e em capela de fluxo laminar o meio foi inoculado pela adição de 5 mL do pré-inóculo e adicionou-se 5 mL da solução do composto indutor [1-(4-clorofenil)etanol para a bactéria R1AC23 e 1-(4-metilfenil)etanol para a bactérias R1AF57]. As culturas foram incubadas em um agitador orbital a 32°C e 160 rpm durante 48 horas.

6.4.5 Reação com células das bactérias em crescimento

Em um erlenmeyer de 50 mL foi adicionado o volume de meio de cultura com células em crescimento (volumes de acordo com as tabelas 1 a 10). 20 mg do substrato apropriado

foram adicionados ao meio reacional (substratos de acordo com as tabelas 1 a 10). O erlenmeyer foi colocado em agitador orbital a 32°C e 160 rpm.

Após o fim da reação todo o conteúdo do erlenmeyer foi transferido para tubos de plástico para centrífuga e adicionou-se o solvente para extração, 3 vezes de 3 mL (acetato de etila quando utilizado CG para análise e hexano quando utilizado CLAE para análise do produto). Após agitação da mistura e centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos, o extrato foi seco com sulfato de magnésio, filtrado e evaporado à vácuo. O extrato orgânico foi então analisado por cromatografia à gás ou líquida.

6.4.6 Reação com células da bactéria ressuspensas

As condições de cultura (pré-inóculo e inóculo) foram as mesmas do item anterior. Depois de ambas as etapas, diferentes volumes do meio de cultura com células em crescimento foram centrifugados durante 5 minutos a 5000 rpm para a bactéria R1AF57 e 20 min a 5000 rpm para a bactéria R1AC23 (volumes centrifugados de acordo com tabelas 1 a 10). Durante a centrifugação houve formação de um “*pellet*”, o sobrenadante foi então retirado e as células (na forma de *pellet*) foram transferidas para uma solução tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$). 20mg do substrato apropriado foi adicionado ao meio reacional (substratos de acordo com tabelas 1 a 10). A reação foi mantida a 32°C e 160 rpm em agitador orbital. Ambos os microrganismos produziram aproximadamente 2 g de células (úmidas) para cada 100 mL de meio de cultura centrifugado.

A extração do produto da reação foi realizada conforme item 6.4.5.

6.5 Manutenção das bactérias

As bactérias foram armazenadas em meio de cultura sólido (tubos de ensaio com meio nutriente e agar bacteriológico contendo a bactéria em sua superfície). A manutenção das

bactérias foi realizada utilizando-se o meio de cultura *NB* com agar bacteriológico na proporção de 3 g de extrato de carne, 5 g de peptona de bacteriológica e 20 g de agar bacteriológico para cada litro de água destilada. O meio preparado foi então solubilizado por aquecimento e autoclavado. Após a esterilização o composto indutor foi adicionado e o meio de cultura transferido para os tubos de ensaios em capela de fluxo laminar e inclinados, deixando-se resfriar para endurecimento.

Após esse preparo, as bactérias foram transferidas para os tubos de ensaio com auxílio de uma alça de platina (em ambiente estéril) e mantidas a 32°C para crescimento em incubadora. Após 3 dias de incubação os tubos de ensaio são armazenados sob refrigeração a 4°C. Além disso, foram mantidas por segurança, cepas das bactérias em glicerol (85% v/v) a -15°C.

7. Referências Bibliográficas

BÜCHNER, E. Alkoholische Gährung ohne Hefezellen. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **1897**, 30, 117-124.

BROWN, A. J. Enzyme Action. *Journal of the Chemical Society (Trans)*, **1902**, 81, 373-388.

HENRI, V. General Theory of Action of Certain Hydrolases. *Compt. Rend. Hebd. Acad. Sci.*, Paris, **1902**, 135, 916-919.

HALDANE, J. B. S. Enzymes. Longmans, *Green and Co.* London, **1930**.

LERESCHE, J. E.; MEYER, H. Chemocatalysis and Biocatalysis (Biotransformation): Some Thoughts of a Chemist and of a Biotechnologist. *Org. Proc. Res. Dev.* **2006**, 10, 572-580.

STRAATHOF, A. Quantitative Analysis of Industrial Biotransformations. *Industrial Biotransformations* (2nd Edition). **2006**, 515-520.

BORMAN, S. Beta-peptides: nature improved? *Chem. Eng. News*, **1997**, 75, 32-35.

FDA - Food and Drug Administration. Development of New Stereoisomeric Drugs. <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm122883.htm> (acessado em 02/2009).

STINSON, S. ACS Award for Creative Research in Homogeneous or Heterogeneous Catalysis. *Chem. Eng. News*. **2001**, 79, 34-35.

ROUHI, A. M. Chiral Chemistry. *Chem. Eng. News*. **2002**, 80, 43-50.

MAY, O.; VERSECK, S.; BOMMARIUS, A.; DRAUZ, K. Development of Dynamic Kinetic Resolution Processes for Biocatalytic Production of Natural and Nonnatural L-Amino Acids. *Org. Proc. Res. Dev.* **2002**, 6, 452-457.

STRAUSS, U. T.; FELFER, U.; FABER, K. Biocatalytic transformation of racemates into chiral building blocks in 100% chemical yield and 100% enantiomeric excess. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, *10*, 107-117.

GRUBER, C. C.; LAVANDERA, I.; FABER, K.; KROUTIL, W. From a racemate to a single enantiomer: Deracemization by stereoinversion. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1789-1805.

KROUTIL, W.; FABER, K. Deracemization of compounds possessing a *sec*-alcohol or -amino group through a cyclic oxidation-reduction sequence: a kinetic treatment. *Tetrahedron: Asymmetry*. **1998**, *9*, 2901-2913.

HUERTA, F. F.; MINIDIS, A. B. E.; BÄCKVALL, J. E. Racemisation in asymmetric synthesis. Dynamic kinetic resolution and related processes in enzyme and metal catalysis. *Chem. Soc. Rev.*, **2001**, *30*, 321-331.

FABER, K. Non-sequential Processes for the transformation of a racemate into a single stereoisomeric product: Proposal for Stereochemical Classification. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 5004-5010.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. Organic Chemistry. *Oxford University Press*. New York, **2001**.

ITSUNO, S.; HIRAO, A.; NAKAMURA, S.; YAMAZAKI, N. J. Asymmetric Synthesis Using Chirally Modified Borohydrides. Part I. Enantioselective Reduction of Aromatic Ketones with the Reagent Prepared from Borane and (*S*)-Valinol. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*. **1983**, *8*, 1673-1676.

COREY, E. J.; BAKSHI, R. K.; SHIBATA, S. Highly enantioselective borane reduction of ketones catalyzed by chiral oxazaborolidines. Mechanism and synthetic implications. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5551-5553.

COREY, E. J.; HELAL, C. J. Reduction of Carbonyl Compounds with Chiral Oxazaborolidine Catalysts: A New Paradigm for Enantioselective Catalysis and a Powerful New Synthetic Method. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1986-2012.

MOORE, J. C.; POLLARD, D. J.; KOSJEK, B. DEVINE, P. N. Advances in the Enzymatic Reduction of Ketones. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 1412-1419.

MATSUDA, T.; NAKAJIMA, Y.; HARADA, T.; NAKAMURA, K. Asymmetric reduction of simple aliphatic ketones with dried cells of *Geotrichum candidum*. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2002**, *13*, 971-974.

YADAV, J. S.; NANDA, S.; REDDY, P. T.; RAO, A. B. Efficient Enantioselective Reduction of Ketones with *Daucus carota* Root. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3900-3903.

COMASSETO, J. V.; OMORI, A. T.; ANDRADE, L. H.; PORTO, A. L. M. Bioreduction of fluoroacetophenones by the fungi *Aspergillus terreus* and *Rhizopus oryzae*. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2003**, *14*, 711-715.

STAMPFER, W.; KOSJEK, B.; FABER, K.; KROUTIL, W. Biocatalytic oxidative kinetic resolution of *sec*-alcohols: stereocontrol through substrate-modification. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2003**, *14*, 275-280.

MUELLER, J. A.; JENSEN, D. R.; SIGMAN, M. S. Dual Role of (-)-Sparteine in the Palladium-Catalyzed Aerobic Oxidative Kinetic Resolution of Secondary Alcohols. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8202-8203.

GHANEM, A.; SCHURIG, V. Lipase-Catalyzed Irreversible Transesterification of 1-(2-Furyl)ethanol Using Isopropenyl Acetate. *Chirality*, **2001**, *13*, 118-123

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.

VOSS, C. V.; GRUBER, C. C.; KROUTIL, W. Deracemization of Secondary Alcohols through a Concurrent Tandem Biocatalytic Oxidation and Reduction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 741-745.

MARTIN-MATUTE, B.; EDIN, M.; BOGAR, K.; KAYNAK, B.; BÄCKVALL, J. Combined Ruthenium(II) and Lipase Catalysis for Efficient Dynamic Kinetic Resolution of Secondary Alcohols. Insight into the Racemization Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8817-8825.

FABER, K. Biotransformations in Organic Chemistry. 5^o ed. *Springer-Verlag*. New York, **2004**.

SAKAI, K.; HAMADA, N.; WATANABE, Y. Degradation Mechanism of Poly(vinyl alcohol) by Successive Reactions of Secondary Alcohol Oxidase and β -Diketone Hydrolase from *Pseudomonas* sp. *Agric. Biol. Chem.* **1986**, *50*, 989-996.

SILVERMAN, R. B. The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions. *Academic Press*. London, **2000**.

KROUTIL, W.; MANG, H.; EDEGGER, K.; FABER, K. Biocatalytic Oxidation of Primary and Secondary Alcohols. *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 125-142.

RIBAS, P. L.; ATRIAN, S.; GONZALEZ-DUARTE, R.; FORTHERGILL-GILMORE, L. A.; KELLY, S. M.; PRICE, N. C. Structural properties of long- and short-chain alcohol dehydrogenases. Contribution of NAD^+ to stability. *Biochemical Journal*. **1991**, *276*, 433-438.

NIE, Y.; XU, Y.; MU, X. Q.; WANG, H. Y.; YANG, M.; XIAO, R. Purification, Characterization, Gene Cloning, and Expression of a Novel Alcohol Dehydrogenase with Anti-Prelog Stereospecificity from *Candida parapsilosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 3759-3764.

- KALLBERG, Y.; PERSSON, B. Prediction of coenzyme specificity in dehydrogenases/reductases. A hidden Markov model-based method and its application on complete genomes. *Febs J.* **2006**, 273, 1177-1184.
- ISMAIEL, A. A.; ZHU, C. X.; COLBY, G. D.; CHEN, J. S. Purification and characterization of a primary-secondary alcohol dehydrogenase from two strains of *Clostridium beijerinckii*. *J Bacteriol.* **1993**, 175, 5097-5105.9
- KROUTIL, W.; MANG, H.; EDEGGER, K.; FABER, K. Recent advances in the biocatalytic reduction of ketones and oxidation of *sec*-alcohols. *Cur. Op. Chem. Biol.* **2004**, 8, 120-126.
- GEUEKE, B.; RIEBEL, B.; HUMMEL, W. NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*: a new catalyst for the regeneration of NAD. *Enzyme and Microbial Technol.* **2003**, 32, 205-211.
- NAKAMURA, K.; KAWAI, Y.; OHNO, A. Stereochemical Control of Microbial Reduction. Method for controlling the enantioselectivity of reduction with baker s yeast. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 4778-4783.
- ALMARSSON, O.; KARAMAN, R.; BRUICE, T. C. Kinetic Importance of Conformations of Nicotinamide Adenine Dinucleotide in the Reactions of Dehydrogenases Enzymes *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8702-8704.
- 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.
- COLE, J. R.; CHAI, B.; MARSH, T. L.; FARRIS, R. J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, 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 autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Research.* **2003**, 31, 442-443.

COLE, J. R.; CHAI, B.; FARRIS, R. J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, 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.

PORTO, A. L. M.; COMASSETO, J. V.; OMORI, A. T.; ANDRADE, L. H.; ASSIS, L. F. Deracemization of Aryl Ethanol and Reduction of Acetophenones by Whole Fungal Cells of *Aspergillus terreus* CCT 4083, *Aspergillus terreus* CCT 3320 and *Rhizopus oryzae* CCT 4964. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2004**, 29, 55-61.

ANDRADE, L. H.; BARCELLOS, T. Lipase-Catalyzed Highly Enantioselective Kinetic Resolution of Boron-Containing Chiral Alcohols. *Organic Letters*. **2009**, 11, 3052-3055.

MANUAL DIFCO. Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology. 10th Edition. *Difco Laboratories*. Detroit Michigan, **1984**.

WELLS, A. What is in a Biocatalyst? *Org. Proc. Res. Dev.* **2006**, 10, 678-681.

DUETZ, W. A.; WITHOLT, B. Effectiveness of orbital shaking for the aeration of suspended bacterial cultures in square-deepwell microtiter plates. *Biochemical Engineering Journal*. **2001**, 7, 113-115.

DUETZ, W. A.; RÜEDI, L.; HERMANN, R.; O'CONNOR, K.; BÜCHS, J.; WITHOLT, B. Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates. *Applied and Environmental Microbiology*, **2000**, 66, 2641-2646.

MINAS, W.; BAILEY, J. E.; DUETZ, W. Streptomycetes in micro-cultures: Growth, production of secondary metabolites, and storage and retrieval in the 96-well format. *Antonie van Leeuwenhoek*, **2000**, 78, 297-305.

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

BENDER, M. L. Mechanisms of Homogeneous Catalysis from Protons to Proteins. *Wiley-Interscience*. New York, **1971**.

PÉREZ, H. I.; LUNA, H.; MANJARREZ, N.; SOLÍS, A.; NUÑEZ, M. A. Enantioselective oxidation of diaryl carbinols by *Nocardia coralina* B-276. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2000**, *11*, 4263-4268.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. Purification of Laboratory Chemicals. 4th Edition. *Butterworth-Heinemann*. Oxford, **1996**.

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.

WARSHEL, A.; AAQVIST, J.; CREIGHTON, S. Enzymes work by solvation substitution rather than by desolvation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1989**, *86*, 5820-5824.

8. Anexos

Figura 15. Espectro de Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) referente a (17b)

Figura 16. Espectro de ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) referente a (17b)

Figura 17. Espectro de CG/EM referente a (17b)

Figura 18. Espectro de IV referente a (17b)

Figura 19. Espectro de Espectro de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) referente a (18b)

Figura 20. Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) referente a (18b)

Figura 21. Espectro de CG/EM referente a (18b)

Figura 22. Espectro de IV referente a (18b)

Figura 23. Espectro de Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) referente a (19b)

Figura 24. Espectro de ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) referente a (19b)

Figura 25. Espectro de CG/EM referente a (19b)

Figura 26. Espectro de IV referente a (19b)

Figura 27. Espectro de Espectro de ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) referente a (20b)

Figura 28. Espectro de ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) referente a (20b)

Figura 29. Espectro de CG/EM referente a (20b)

Figura 30. Espectro de IV referente a (20b)

Figura 31. Espectro de Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) referente a (23b)

Figura 32. Espectro de ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) referente a (23b)

Figura 33. Espectro de CG/EM referente a (23b)

Figura 34. Espectro de IV referente a (23b)

Figura 35. Espectro de Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) referente a (28b).

Figura 36. Espectro de ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) referente a (28b)

Figura 37. Espectro de CG/EM referente a (28b)

Figura 38. Espectro de IV referente a (28b)

9. Curriculum vitae

Camila Rodrigues da Silva

Data de Nascimento: 12/02/1982

e-mail: camilars@iq.usp.br; camilar@cetesbnet.sp.gov.br

Formação acadêmica

2007-2009 Mestrado em Química Orgânica pela Universidade de São Paulo (USP). Título da Dissertação: Estudo de resolução cinética de álcoois secundários utilizando reação de oxidação enantiosseletiva mediada por bactérias. Orientador: Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade

2002-2005 Bacharelado e Licenciatura em Química com Atribuições Tecnológicas pela Universidade Presbiteriana Mackenzie.

2004-2005 Iniciação Científica: Desenvolvimento de método para determinação espectrofotométrica de S(IV) em alimentos utilizando sistema em fluxo - *FIA*. 2005. Trabalho de Conclusão de Curso. Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guekezian

2003-2004 Iniciação Científica: Tratamento de resíduos químicos gerados nos laboratórios da Universidade Presbiteriana Mackenzie. Orientadora: Profa. Dra. Ivanise Gaubeur. Financiador: Fundo Mackenzie de Pesquisa.

2002-2003 Iniciação Científica: Recuperação de prata de rejeitos laboratoriais. Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guekezian.

Outras atividades acadêmicas

2003-2005 Representante de Alunos da F.C.B.E.E. Faculdade de Ciências Biológicas Exatas e Experimentais – *Universidade Presbiteriana Mackenzie* (Cursos: Química, Física, Biologia e Matemática)

2005 Organização de Eventos: XXII Semana da Ciência – *Universidade Presbiteriana Mackenzie*

Experiência Profissional

2008-*atual* CETESB – Agência Ambiental do Estado de São Paulo

Cargo: Química

2007-2008 Nova Ambi Laboratório Ambiental Ltda.

Cargo: Gerente Técnica

2005-2007 Ambiental Laboratórios Ltda.

Cargo Inicial: Estagiária Química

Cargo Final: Analista Ambiental

2004-2005 CETESB – Agência Ambiental do Estado de São Paulo

Cargo: Estagiária Química

Idiomas

Inglês fluente

Italiano intermediário

Trabalhos em eventos

RODRIGUES, Camila; ANDRADE, Leandro, H. Kinetic resolution of secondary alcohols via oxidation mediated by *Arthrobacter atrocyaneus*. In: 13th Brazilian Meeting on Organic Synthesis. São Pedro, 2009.

SANTOS JUNIOR, A.; MOREIRA, Andrea de Souza; RODRIGUES, Camila; ALVES, Flávia B.; INTIMA, Danielle P.; PALHARES, Elaine; GUEKEZIAN, Marcia; GAUBEUR, Ivanise. Gerenciamento e tratamento de resíduos gerados nas aulas práticas de química da Universidade Presbiteriana Mackenzie. In: XXVI Congresso Latinoamericano de química/27ª Reunião anual da sociedade brasileira de química. Salvador, 2004.

RODRIGUES, Camila; ALVES, Flávia B.; GAUBEUR, Ivanise; GUEKEZIAN, Marcia. Métodos de recuperação de prata de rejeitos laboratoriais e sua utilização em aulas práticas. In: V Encontro de Iniciação Científica e VIII Mostra de Pós-Graduação da Universidade Presbiteriana Mackenzie. São Paulo, 2004.

SANTOS JUNIOR, A.; MOREIRA, Andrea de Souza; RODRIGUES, Camila; PALHARES, Elaine; INTIMA, Danielle P.; ALVES, Flávia B.; GUEKEZIAN, Marcia; GAUBEUR, Ivanise. Relato dos resultados alcançados após um ano de implementação de um programa de gerenciamento e tratamento de resíduos gerados nas aulas práticas de química da Universidade Presbiteriana Mackenzie. In: V Encontro de Iniciação Científica e VIII Mostra de Pós-Graduação da Universidade Presbiteriana Mackenzie. São Paulo, 2004.