UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

LIDIANE DA SILVA ARAÚJO

***Estudo de oxidoredutase da *Arthrobacter* sp.
isolada de sedimento marinho antártico***

Tese de Doutorado

Versão corrigida

Orientador: Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade

São Paulo

Data de Depósito na SPG:

05/09/2014

LIDIANE DA SILVA ARAÚJO

***Estudo de oxidoredutase da *Arthrobacter* sp.
isolada de sedimento marinho antártico***

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

Orientador: Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade

São Paulo
2014

*Sonhos determinam o que você quer.
Ação determina o que você conquista.*

Aldo Novak

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**“Estudo de oxidorreductase da *Arthrobacter* sp. isolada de
sedimento marinho antártico”**

LIDIANE DA SILVA ARAÚJO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo
como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciências –
Programa: Química.

Aprovada por:

Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade
Orientador e Presidente

Prof. Dr. Cassius Vinicius Stevani
IQ - USP

Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno
IQ - USP

Prof. Dr. Márcio Santos da Silva
UFABC

Prof. Dr. Andre Luiz Meleiro Porto
IQSC -USP

SÃO PAULO
02 de outubro de 2014

Dedicatória

Aos meus pais Antônio Filho e Iraci que é a fonte inesgotável de carinho, amor e dedicação, que com muita honestidade guiaram meus passos até esta conquista tão desejada. Saibam que a valentia de vocês em não desistir de lutar pela vida e suas determinações em assistir a mais uma conquista de um Filho serviram de incentivo e exemplo para mim.

A vitória desta conquista dedico com todo meu AMOR a VOCÊS.

Agradecimentos

Ao Senhor Deus por sempre iluminar o meu caminho e por me dar força para vencer cada obstáculo dessa longa caminhada.

Um pensador já disse “a gratidão é a memória do coração”. Faz sentido, pois ao longo de nossas vidas sempre aparecem “anjos da guarda” que nos ajudam, e sem os quais nossos objetivos seriam muito difíceis de serem alcançados, ou seriam até inatingíveis. Quero expressar de coração os meus agradecimentos às essas pessoas e instituições:

Ao Prof. Dr. Leandro Helgueira pela orientação, pela colaboração, paciência e seus conhecimentos repassados durante todo o desenvolvimento do trabalho.

A Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química que me proporcionaram a oportunidade de cursar Pós-graduação em curso de excelência.

Aos professores, Massuo Kato, Cassius Stevani e Shaker Chuck por contribuição no desenvolvimento do trabalho.

Ao meu amor Daniel Augusto pelo carinho, apoio, incentivo, por tolerar meus humores e principalmente por me compreender nessa fase tão importante de minha vida.

Aos meus irmãos Antônio e Jeanes por tudo que vocês representam em minha vida. Agradeço a Deus por ter colocado ao meu lado os melhores irmãos do mundo e saibam, vocês são tudo para mim e não tenho dúvida que nosso amor e união serão eternos.

A minha cunhada Maria Rita por me suportar a cada dia, por cada palavra de incentivo, cada minuto de atenção, cada puxão de orelha e por todo apoio. Te agradeço de todo coração e espero que tenhamos muitos e muitos motivos para comemorar.

Ao meu sobrinho/afilhado Murilo Henrique que com certeza sua chegada foi um presente de Deus, um anjo colocado por Ele para sempre permanecer em minha vida.

A tia Luzia e Ana Cláudia pelo apoio em parte dessa caminhada, por serem pessoas tão maravilhosas, saibam que nossa amizade é eterna. Tia Luzia obrigada por ser um alguém inesquecível, que ganhou minha confiança por uma conversa, ganhou o meu respeito por uma palavra, e além de tia, ganhou a minha amizade. Vocês sempre estarão guardadas no meu coração.

A você, minha querida vó Rosa, que Deus lhe abençoe a cada dia e que nos dê a bênção de sempre tê-la conosco, nos dando muito amor, nos passando experiências, nos ouvindo com carinho, nos orientando e nos aconselhando.

Aos meus saudosos avôs Antônio Jabuti, Zeza e Mocinha que sempre acreditaram em mim. Sei que hoje vocês estão vibrando com mais essa conquista.

Aos meus padrinhos Lina e Patrício e tios Luiz Carlos e Eliete pelo apoio na realização desse sonho. Saibam que cada um de vocês cultivou a semente que hoje está brotando.

Aos meus amigos Dona Mariana, Vanderlei, Herondina (*in memoriam*), Antônio, Eroína, Acelino Filho, Idelsoite, Paloma e Xavier pelo apoio e carinho.

Aos amigos e colegas do LQFB: Alexandre, Ana Carolina, Camila Rodrigues, Camila Kisukuri, Catherina, Dayvson, Edna, Eliane, Felipe, Henrique, Joel, Juliana, Larissa, Lya, Márcio, Mônica, Natássia, Patrícia, Piovan, Priscila, Rodrigo, Thalita, Thiago, Thaís, Nathalie e Wagner.

Edna, Nathalie e Thalita não sei como agradecer o apoio de vocês nos experimentos, saibam que vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho e que jamais as esquecerei. Contém sempre comigo.

Dayvson, apesar desta despedida de trabalho sei que um dia ainda iremos nos encontrar por aí e relembrar todos os bons momentos que vivemos aqui. Lembraremos das alegrias, do sufoco e também do trabalho dividido. Que Deus o ilumine enchendo sua vida de muito sucesso. Obrigada meu amigo querido por todo apoio, carinho e risadas.

Aos amigos e colegas do laboratório de microbiologia da Universidade do Amazonas: Aldo, Alzira, Barcelar, Daniela, Fabrícia, Fernando, Flávia, Glaucia, Hiléia, Ieda, Jannaína, Jaqueline, Jéssica, Marcelo, Rodrigo, Soraia, Vanderlei e Wuina.

A Prof^a. Dra. Sandra Zanoto pelo convite e oportunidade de desenvolver parte desse trabalho em seu grupo de pesquisa.

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

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

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

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Araújo, L. S. **Estudo de oxidorreductase da *Arthrobacter* sp. isolada de sedimento marinho antártico.** 2014 (265p.) Tese (Doutorado)- Programa de Pós- Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Inspirados em reações catalisadas por enzimas a partir de micro-organismos encontrados em ambientes marinhos severos (psicrofílicos), em que a quantidade de oxigênio é restrita, observou-se que a *Arthrobacter* sp. CCT 7749 realizou diferentes transformações químicas mudando de condições reacionais anaeróbias para aeróbias. Dependendo da presença ou ausência de oxigênio, ambas desracemização de alcoóis ou redução de cetonas com seletividades enantiocomplementares foram realizadas pelo mesmo micro-organismo. Estes conceitos foram aplicados tanto para desracemização quanto para redução enantiosseletiva de compostos contendo heteroátomos (silício, fósforo, estanho e boro). Visando a identificação molecular das enzimas responsáveis pelas reações de oxido-redução, buscou-se desenvolver uma metodologia de purificação enzimática usando diferentes técnicas. Inicialmente a lise celular da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 empregando a litase na presença de β -mercaptoetanol e usando ondas ultrassônicas produziu 28 mg/mL de proteínas. A purificação da oxidorreductase ocorreu através de colunas cromatográficas de troca iônica DEAE FF, seguida por ANX FF. O extrato protéico contendo a enzima parcialmente pura apresentou atividade específica de 4,23 U/mg na oxidação do (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol à cetona correspondente. Através do uso das técnicas *native*-PAGE e zimografia detectou-se uma massa molecular da enzima de ≈ 240 kDa e que provavelmente se encontrava na forma hetero-hexamérica apresentando três subunidades em ~ 35 kDa e três em ~ 45 kDa. Observou-se que, surpreendentemente, a fração protéica parcialmente pura também foi capaz de reduzir a 4-metilacetofenona obtendo-se 17% do (*S*)-1-(4-metilfenil)etanol com excelente excesso enantiomérico $>99\%$.

Palavras-chave: oxidorreductase, desracemização, redução enantiosseletiva, purificação, psicrofílico, hetero-átomos.

ABSTRACT

Araújo, L. S. **Studies of oxidoreductase produced by *Arthrobacter* sp. isolated from Antarctic marine sediment.** 2014. (265p.) Master Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Inspired by enzyme-catalyzed reactions with microorganisms found in harsh marine environments (psychrophilic), in which the amount of oxygen is restrict, we have shown that *Arthrobacter* sp. CCT 7749 can perform different chemical transformations by switching from anaerobic to aerobic reaction conditions. Depending on the presence or absence of oxygen, either alcohol deracemization or ketone reduction with enantiocomplementary selectivities can be performed by the same microorganism. These concepts were applied for both deracemization and enantioselective reduction of heteroatom-containing molecules (silicon, phosphorus, tin and boron). Aiming Enzyme purification, different techniques were employed. Cell lysate of *Arthrobacter* sp. CCT 7749. Was prepared using lyticase and β -mercaptoethanol bu ultrasonication. Purification of this enzyme occurred through chromatographic columns of DEAE FF ion exchange, followed by ANX FF. The partially pure oxidoreductase presented specific activity of 4.23/mg in the oxidation (RS)-1-(4-methylphenyl)ethanol to the corresponding ketone. Native-PAGE and zymography have shown that the enzyme had $\approx$ 240 kDa molecular mass, probably in the form hetero-hexameric with 3 subunits $\sim$ 35 kDa and three $\sim$ 45 kDa. Surprisingly, the partially pure protein fraction was able to reduce the 4-methylacetophenone giving 17% of (S)-1-(4-methylphenyl)ethanol with excellent enantiomeric excess >99%.

Keywords: oxidoreductase, alcohol deracemization, enantioselective reduction, purification, psychrophilic, heteroatoms.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Tipos de enzimas usadas em biotransformações industriais.....	35
Figura 1.2. Mecanismo de oxidação do (<i>R,S</i>)-1-(fenil)etanol.....	39
Figura 2.1. Alcoóis selecionados para as reações de desracemização.....	84
Figura 2.2. Cetonas selecionadas para as reduções enantiosseletivas.....	84
Figura 3.1. Princípios de uma separação de troca aniônica.....	106
Figura 3.2. Princípios de uma separação de interação hidrofóbica.....	110
Figura 3.3. Princípios de uma separação por afinidade.....	112
Figura 3.4. Membrana de celulose regenerada.....	122
Figura 3.5. SDS-PAGE- linha 1: BenchMark™ Protein Ladder; linhas 2-14: Frações 25-36 da coluna Phenyl FF (high sub) respectivamente.....	124
Figura 3.6. SDS-PAGE- linhas 1-7 e 9: Frações 25-36 da coluna Phenyl FF (low sub), respectivamente; linha 8: BenchMark™ Protein Ladder.....	125
Figura 3.7. SDS-PAGE- linhas 1-8 e 10-25: Frações 2, 3, 8, 10, 11, 12, 16,17, 21-36 da coluna Butyl FF, respectivamente; linha 9: BenchMark™ Protein Ladder.....	127
Figura 3.8. SDS-PAGE- linha 1: BenchMark™ Protein Ladder; linhas 2-8: Frações 1-7 da coluna Butyl-S FF, respectivamente.....	128
Figura 3.9. SDS-PAGE- linha 1: BenchMark™ Protein Ladder; linhas 2-12: Frações protéicas 22-32 da coluna Octyl FF, respectivamente.....	130
Figura 3.10. SDS-PAGE- linha 1: BenchMark™ Protein Ladder; linhas 2, 4 e 5: Frações obtidas das soluções resultantes da filtração nas membranas de 10, 50 e 100 kDa; linha 3: Oxidorredutase obtida	

na parte superior da membrana de 10kDa, respectivamente.....	131
Figura 3.11. SDS-PAGE- linhas 1-12: Frações protéicas 10-21 da coluna ANX FF, respectivamente.....	138
Figura 3.12. SDS-PAGE- linha 1: BenchMark™ Protein Ladder; linhas 2-11: Frações 1-10 obtidas da coluna DEAE, respectivamente.....	139
Figura 3.13. SDS-PAGE- linha 2: BenchMark™ Protein Ladder; linhas 1 e 3: Frações protéicas parcialmente puras obtida da coluna Octyl.....	140
Figura 3.14. Purificação da oxidorreductase a partir da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 em coluna DEAE FF.....	148
Figura 3.15. Purificação da oxidorreductase a partir da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 em coluna DEAE.....	149
Figura 3.16. Purificação da oxidorreductase a partir da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 em coluna DEAE.....	150
Figura 3.17. Purificação da oxidorreductase a partir da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 em coluna Octyl FF.....	152
Figura 3.18. SDS-PAGE- linhas 3 e 20: BenchMark™ Protein Ladder; linhas 1,2, 4-19, 21-30: Frações 26, 27, 28-43 da coluna Octyl FF, respectivamente.....	154
Figura 3.19. SDS-PAGE- linha 1: BenchMark™ Protein Ladder; linha 2-7: frações 1-6 da coluna mimetic orange® 3 A6XL, respectivamente.....	157
Figura 3.20. SDS-PAGE- linhas 1, 3-5: Frações 1-4 da coluna Mimetic Blue® 1 P6XL, respectivamente; linha 2: BenchMark™ Protein Ladder.....	159
Figura 3.21. SDS-PAGE- linhas 1, 3-12: Frações, 1, 2-11 da coluna Mimetic Red® 2 A6XL, respectivamente; linha 2: BenchMark™ Protein Ladder.....	161
Figura 3.22. Purificação da oxidorreductase a partir da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 em coluna SP FF.....	162

Figura 3.23. SDS-PAGE- linhas 1-3, 5-15: Frações 6, 10, 11, 12, 14-21, 23, 27 da coluna SP XL FF, respectivamente; BenchMark™ Protein Ladder.....	163
Figura 3.24. Purificação da oxidoredutase a partir da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 em coluna CM FF.....	164
Figura 3.25. SDS-PAGE- linhas 1, 3-12 frações 1, 2-11 da coluna CM XL FF; linha 2: BenchMark™ Protein Ladder.....	165
Figura 3.26. Purificação da oxidoredutase a partir da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 em coluna ANX FF.....	167
Figura 3.27. SDS-PAGE- linhas 1-3; 5-10: Frações 20, 22, 24, 26, 28, 29, 32 da coluna ANX, respectivamente; linha 4: BenchMark™ Protein Ladder.....	168
Figura 3.28. Purificação da oxidoredutase a partir da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 em coluna ANX FF.....	169
Figura 3.29. SDS-PAGE- linhas 1-5, 7-15: Frações 28-32, 33-41 da coluna ANX FF, respectivamente; linha 6: BenchMark™ Protein Ladder.....	171
Figura 3.30. Purificação da oxidoredutase a partir da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 em coluna ANX FF.....	172
Figura 3.31. SDS-PAGE- linhas 1-2, 4-13: Frações 17, 18, 19-28 da coluna ANX FF, respectivamente; linha 3: BenchMark™ Protein Ladder.....	174
Figura 3.32. <i>native</i> -PAGE-Teste de atividade da oxidoredutase- linhas 1, 2, 4-7: Frações 11-14, 15-17, 18-19, 20-21, 22-24, 25-26, 27 da coluna ANX, respectivamente; linha 3: NativeMark™ Unstained Protein Standard.....	176
Figura 3.33. <i>native</i> -PAGE- linhas 1, 2, 4-7: Frações 11-14, 15-17, 18-19, 20-21, 22-24, 25-26, 27 da coluna ANX, respectivamente; linha 3: NativeMark™ Unstained Protein Standard.....	177
Figura 3.34. SDS-PAGE- linha 1: BenchMark™ Protein Ladder; linha 2: Proteína presente na fração 15-17 da coluna ANX FF.....	178

Figura 3.35: Alcoóis racêmicos selecionados para a oxidação enantiosseletiva.....	185
Figura 3.36. Prensa francesa.....	189
Figura 3.37. Ultra-Turrax.....	190
Figura 3.38. Ultrassom.....	191
Figura 3.39. Colunas realizadas manualmente cromatográficas com auxílio de uma seringa.....	194
Figura 3.40. Colunas cromatográficas de interação hirofóbica ou de troca iônica realizadas através de uma bomba de seringa.....	195
Figura 3.41. Equipamento FPLC AKTA Purifier (GE Healthcare).....	198
Figura 3.42. colunas cromatográficas de afinidades realizadas através de gravidade.....	201
Figura 3.43. Sistema de eletroforese. A) Sistema de eletroforese vertical, MiniVE; B) Fonte de alimentação do sistema de eletroforese	205
Figura 4.1. Resumo da etapa de avaliação da atividade enzimática enantiosseletiva dos micro-organismos, realizadas em duplicatas. (I) Micro-organismo 1. (II) Micro-organismo 2.....	232

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Enzimas psicrofílicas cujas estruturas cristalinas são conhecidas.....	27
Tabela 1.2. Enzimas e suas aplicações.....	30
Tabela 2.1. Oxidação e/ou desracemização do (R,S)-1-(4-metilfenil)etanol mediada por enzimas presentes em células da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 em diferentes condições reacionais.....	66
Tabela 2.2. Redução enantiosseletiva da 4-metilacetofenona catalisada por oxidoredutase presentes em células da <i>Arthrobacter</i> sp.....	69
Tabela 2.3. Desracemização de alcoóis contendo heteroátomos catalisada por oxidoredutases presentes nas células da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 sob condições aeróbias.....	71
Tabela 2.4. Desracemização de alcoóis contendo silício, fósforo, estanho e boro em escala preparativa sob condições aeróbias.....	74
Tabela 2.5. Redução enantiosseletiva de cetonas contendo heteroátomos catalisadas por oxidoredutases presentes em células da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 sob condições anaeróbias.....	75
Tabela 2.6. Redução enzimática de cetonas contendo heteroátomos de silício, fósforo e boro em escala preparativa sob condições anaeróbias.....	77
Tabela 2.7. Relação dos reagentes e solventes utilizados nesse trabalho com as respectivas procedências e grau de pureza.....	80
Tabela 3.1. Oxidação enantiosseletiva do (R,S)-1-(4-metilfenil)etanol mediada por oxidoredutase da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 presentes nas frações da coluna Octyl FF.....	153
Tabela 3.2. Oxidação enantiosseletiva do (R,S)-1-(4-metilfenil)etanol mediada por oxidoredutase da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 presentes nas frações da coluna Mimetic Orange® 3 A6XL.....	156
Tabela 3.3. Oxidação enantiosseletiva do (R,S)-1-(4-metilfenil)etanol	

mediada por oxidorreductase da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 presentes nas frações da coluna Mimetic Blue® 1 P6XL.....	158
Tabela 3.4. Oxidação enantiosseletiva do (R,S)-1-(4-metilfenil)etanol mediada por oxidorreductase da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 presentes nas frações da coluna Mimetic Red® 2 A6X.....	160
Tabela 3.5. Oxidação enantiosseletiva do (R,S)-1-(4-metilfenil)etanol mediada por oxidorreductase da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 presentes nas frações protéicas da coluna ANX FF.....	170
Tabela 3.6. Oxidação enantiosseletiva do (R,S)-1-(4-metilfenil)etanol mediada por oxidorreductase da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 presentes nas frações protéicas da coluna ANX FF.....	173
Tabela 3.7. Oxidação enantiosseletiva do (R,S)-1-(4-metilfenil)etanol mediada por oxidorreductase da <i>Arthrobacter</i> sp. presentes nas frações protéicas da coluna ANX FF.....	175
Tabela 3.8. Purificação da oxidorreductase a partir da <i>Arthrobacter</i> sp...	179
Tabela 3.9. Oxidação enantiosseletiva de alcoóis mediada pela Oxidorreductase da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749.....	180
Tabela 3.10. Redução enantiosseletiva da 4-metilacetofenona mediada pela oxidorreductase da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749.....	181
Tabela 3.11. Atividade específica da oxidorreductase a partir da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 na redução da 4-metilacetofenona.....	182
Tabela 4.1. Avaliação da atividade enzimática de bactérias de esponjas de água-doce em biorredução de cetonas.....	221
Tabela 4.2. Avaliação da atividade enzimática de bactérias de esponjas de água-doce em oxidação enantiosseletiva de alcoóis.....	224
Tabela 4.3. Avaliação da atividade enzimática de fungos endofíticos em biorredução de cetonas.....	226
Tabela 4.4. Avaliação da atividade enzimática de fungos endofíticos em oxidação enantiosseletiva de alcoóis.....	227

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1.1. Produção contínua do ácido (<i>R</i>)-2-hidroxi-4-fenilbutírico através de um processo de regeneração de cofator empregando enzimas acopladas.....	34
Esquema 1.2. Exemplo de uma reação de desracemização.....	40
Esquema 1.3. Hidrogenação assimétrica de cetonas.....	45
Esquema 1.4: Hidrogenação assimétrica de cetonas usando catalisador de ferro.....	45
Esquema 1.5. Resolução cinética de alcoóis catalisada por complexo de rutênio.....	46
Esquema 1.6. Oxidação enantiosseletiva de alcoóis secundários racêmicos.....	48
Esquema 3.1. Oxidação enantiosseletiva de alcoóis.....	132
Esquema 4.1. a) Reação de oxidação enantiosseletiva do (<i>R,S</i>)-1-feniletanol e seus derivados na presença de micro-organismos. b) Reações de biorredução enantiosseletiva da acetofenona e seus derivados na presença de micro-organismos.....	230

SUMÁRIO

Capítulo 1

1. Introdução.....	26
1.1. Antártica.....	26
1.2. Oxidorredutases.....	31
1.3. Importância das oxidorredutases para o desenvolvimento da biotecnologia industrial.....	35
1.3.1. Aplicações de oxidorredutases.....	36
1.3.1.1. Aplicações em técnica industrial.....	36
1.3.1.2. Aplicações nas indústrias têxteis.....	37
1.3.1.3. Aplicações em indústrias de alimentos.....	37
1.3.1.4. Proteção do ambiente.....	37
1.3.1.5. Reações catalisadas por álcool desidrogenase (ADH).....	48
1.3.1.6. Novos meios catalíticos.....	40
1.4. Fontes de oxidorredutases.....	41
1.4.1. <i>Arthrobacter</i> sp.....	42
1.5. Compostos quirais.....	44
1.5.1. Hidrogenação assimétrica de cetonas.....	44
1.5.2. Resolução cinética de alcoóis secundários.....	45
1.5.3. Oxidação enantiosseletiva de alcoóis catalisada por complexo quiral.....	47
1.6. Objetivos.....	50
1.7. Referências Bibliográficas.....	51

Capítulo 2

2. Aplicação da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 em desracemização (R)-seletiva e redução (S)-seletiva: O papel do oxigênio molecular.....	58
2.1. Compostos de silício.....	60
2.2. Compostos de fósforos.....	61
2.3. Compostos de estanho.....	63
2.4. Compostos de boro.....	64
2.5. Resultados e discussão.....	66

2.5.1. Oxidação e/ou desracemização de alcoóis secundários e redução de cetonas catalisadas por oxidoredutases presentes na <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 em condições aeróbias e anaeróbias.....	66
2.5.2. Desracemizações de alcoóis contendo heteroátomos catalisadas por oxidoredutases presentes em células da <i>Arthrobacter</i> sp.....	70
2.5.3. Redução enantiosseletiva de cetonas contendo heteroátomos catalisadas por oxidoredutases presentes em células da <i>Arthrobacter</i> sp CCT 7749.....	74
2.6. Conclusões.....	78
2.7. Parte experimental.....	80
2.7.1. Solventes e reagentes.....	80
2.7.2. Materiais e métodos.....	82
2.7.2.1. Materiais e equipamentos que foram utilizados.....	82
2.7.3. Desracemização e redução enantiosseletivas de compostos de silício, estanho, fósforo e boro catalisada por oxidoredutase em células íntegras da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749	83
2.7.4. Isolamento induzido da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749.....	85
2.7.5. Caracterização taxonômica da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749...	85
2.7.6. Meios de cultura.....	85
2.7.6.1. Pré-inóculo: ativação da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749.....	86
2.7.6.2. Inóculo: crescimento da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 para obtenção de massa celular.....	86
2.7.6.3. Centrifugação: separação das células da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749.....	86
2.7.6.4. Reações de oxidação e redução enantiosseletivas em condições aeróbias.....	87
2.7.6.5. Reações de oxidação e redução enantiosseletivas em condições anaeróbias.....	87
2.7.6.6. Reações em escala preparativa.....	88
2.7.6.7. Reação de desracemização em condições aeróbias.....	88
2.7.6.8. Reação de redução enantiosseletiva em condições	

anaeróbias.....	88
2.7.6.9. Avaliação das reações biocatalíticas.....	89
2.7.6.10. Configuração absoluta.....	90
2.8. Referências bibliográficas.....	91
 Capítulo 3	
3. Purificação da Oxidorredutase da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749.....	94
3.1. Purificação de proteínas.....	94
3.1.1. Métodos empregados no rompimento celular.....	96
3.1.1.1. Agitação com abrasivos.....	96
3.1.1.2. Através de “mixers” e liquidificadores.....	98
3.1.1.3. Congelamento e descongelamento.....	98
3.1.1.4. Homogeneizador ultrassônico.....	98
3.1.1.5. Ultrassom.....	99
3.1.1.6. Choque osmótico.....	99
3.1.1.7. Tratamento alcalino.....	100
3.1.1.8. Uso de detergentes e solventes.....	100
3.1.1.9. Enzimas hidrolíticas de parede.....	101
3.1.1.10. Homogeneizador a alta pressão.....	102
3.1.1.11. Termólise.....	102
3.1.1.12. Ultra-turax.....	103
3.2. Técnicas de purificação de proteínas.....	103
3.2.1. Cromatografia de troca iônica.....	104
3.2.2. Cromatografia de interação hidrofóbica.....	107
3.2.3. Cromatografia por afinidade.....	110
3.3. Zimografia.....	113
3.4. Gel de eletroforese SDS-PAGE e native-PAGE.....	114
3.4.1. PAGE.....	114
3.4.1.1. SDS-PAGE.....	115
3.4.1.2 native-PAGE.....	116
3.5. Resultados e discussão.....	117
3.5.1. Isolamento induzido da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749.....	117
3.5.2. Preparação do extrato protéico.....	118

3.5.3. Suspensão das células em tampão fosfato 20 mmol/L.....	118
3.5.4. Ruptura da parede celular bacteriana/centrifugação das células.....	119
3.5.4.1. Ruptura da parede celular da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 em prensa francesa.....	119
3.5.5. Proteínas precipitadas com sulfato de amônio.....	119
3.5.6. Membranas de celulose.....	121
3.5.7. Cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) realizadas manualmente.....	123
3.5.7.1. Cromatografia de interação hidrofóbica através da coluna Phenyl FF (high e low sub)	123
3.5.7.2. Cromatografia de interação hidrofóbica através das colunas Butyl FF e Butyl-S FF.....	126
3.5.7.3. Cromatografia de interação hidrofóbica através da coluna Octyl FF.	129
3.5.7.4. Concentração e purificação de proteínas através de membranas de celulose.....	131
3.5.8. Purificação por membranas e colunas cromatográficas de interação hidrofóbicas com auxílio de bomba de seringa.....	132
3.5.9. Cromatografia de troca iônica.....	134
3.5.9.1. Cromatografia de troca catiônica através das colunas SP XL e SP FF.....	135
3.5.9.2. Cromatografia de troca catiônica através da coluna CM FF.....	136
3.5.9.3. Cromatografia de troca aniônica através da coluna Q FF..	136
3.5.9.4. Cromatografia de troca aniônica através da coluna ANX FF e DEAE FF.	137
3.5.10. Alteração no método de purificação da oxidoredutase.....	141
3.5.10.1. Ruptura da parede celular da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 através de ultra-turrax.....	141
3.5.10.2. Ruptura da parede celular da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 através de Ultrassom.....	142

3.5.10.2.1. Suspensão das células em tampão Tris-HCl 20 mmol/L com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e β -mercaptoetano.....	142
3.5.10.2.2. Suspensão das células em tampão Tris-HCl 20 mmol/L com Triton X-100.....	143
3.5.10.2.3. Suspensão das células em tampão Tris-HCl 20 mmol/L com liticase ou lisozima.....	144
3.5.10.3. Purificação da oxidoredutase por coluna cromatográfica de troca iônica DEAE FF através de FPLC-Akta Purifier.....	146
3.5.10.4. Purificação da oxidoredutase por coluna Cromatografia de interação hidrofóbica Octyl FF através de FPLC-Akta Purifier..	151
3.5.10.5. Purificação da oxidoredutase em colunas cromatográfica por afinidade realizada através de força gravitacional.	155
3.5.10.5.1. Purificação da oxidoredutase na coluna cromatográfica de afinidade Mimetic Orange® 3 A6XL.....	155
3.5.10.5.2. Purificação da oxidoredutase na coluna cromatográfica de afinidade Mimetic Blue® 1 P6XL.....	157
3.5.10.5.3. Purificação da oxidoredutase na coluna cromatográfica de afinidade Mimetic Red® 2 A6XL.....	159
3.5.10.6 Purificação da oxidoredutase por coluna cromatográfica de Troca catiônica (SP XL, SP FF, CM FF) através de FPLC-Akta Purifier.....	162
3.5.10.6.1 Purificação da oxidoredutase por coluna Cromatográfica de Troca aniônica ANX FF através de FPLC-Akta Purifier.....	166
3.5.10.7. Zimograma native-PAGE.....	176
3.5.10.8. Determinação da Atividade Específica da oxidoredutase da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 que catalisa a oxidação enantiosseletiva de alcoóis.....	178
3.5.10.9. Oxidação enantiosseletiva dos (<i>R,S</i>)-alcoóis 1-3 mediada pela oxidoredutase da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749.....	180
3.5.10.10. Redução enantiosseletiva da 4-metilacetofenona	

catalisada pela oxidoredutase sob atmosfera de N ₂ e Ar.....	181
3.6. Conclusões.....	184
3.7. Parte experimental.....	185
3.7.1. Obtenção dos alcoóis racêmicos.....	185
3.7.2. Preparação do extrato protéico.....	185
3.7.2.1. Pré-inóculo: Ativação da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749.....	186
3.7.2.2. Inóculo: Crescimento da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749 para obtenção de massa celular.....	186
3.7.2.3. Centrifugação/suspensão: Separação das células da <i>Arthrobacter</i> sp. CCT 7749. E suspensão em solução tampão ou dextrose.....	186
3.7.2.4. Suspensão das células em tampão fosfato ou Tris-HCL....	186
3.7.2.5. Suspensão das células em tampão Tris-HCL 20 mmol/L com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).....	187
3.7.2.6. Suspensão das células em tampão Tris- HCL 20 mmol/L com triton x-100.....	187
3.7.2.7. Suspensão das células em tampão TrisHCl 20 mmol/L com dextrose.....	188
3.7.3. Ruptura das células bacteriana /centrifugação das células...	189
3.7.3.1. Ruptura das células bacteriana em prensa francesa.....	189
3.7.3.2. Ruptura das células bacteriana em ultra-turrax.....	190
3.7.3.3. Ruptura das células utilizando ultrassom.....	190
3.7.4. Observação da lise celular.....	191
3.7.5. Purificação da proteína.....	192
3.7.5.1. Proteínas precipitadas com sulfato de amônio.....	192
3.7.5.2. Purificação por membranas e colunas cromatográficas de interação hidrofóbicas realizadas manualmente.....	192
3.7.5.3. Purificação por membranas e colunas cromatográficas de interação hidrofóbicas através de bomba de seringa.....	194
3.7.5.4. Purificação por membrana de celulose regenerada e colunas cromatográficas de troca iônica através de bomba de seringa.....	196
3.7.5.5. Purificação por coluna cromatográfica de troca iônica	

através de FPLC-AKTA purifier.....	197
3.7.5.6. Purificação por coluna cromatográfica de troca aniônica DEAE FF através de FPLC-AKTA purifier.....	198
3.7.5.7. Purificação por coluna cromatográfica de troca catiônica (SP XL, SP FF, CM FF) através de FPLC-AKTA purifier.....	199
3.7.5.8. Purificação por coluna cromatográfica de troca aniônica (ANX FF) através de FPLC- AKTA purifier.....	199
3.7.5.9. Purificação por coluna cromatográfica de interação hidrofóbica (OCTYL FF) através de FPLC-AKTA purifier.....	200
3.7.5.10. Purificação por coluna cromatográfica de troca aniônica através de FPLC- AKTA purifier.....	200
3.7.5.11. Purificação por coluna cromatográfica de afinidade através de gravidade.....	201
3.7.6. Avaliação da atividade enzimática.....	202
3.7.7. Determinação protéica.....	202
3.7.8. Gel de eletroforese sobre condições desnaturantes.....	202
3.7.8.1. Preparação das soluções estoque.....	202
3.7.8.2. Preparação da amostra para aplicar no gel de eletroforese.....	204
3.7.8.3. Preparação do gel de Poliacrilamida.....	204
3.7.8.4. Revelação das proteínas.....	206
3.7.9. Gel de eletroforese sobre condições não-desnaturantes (native)	208
3.7.9.1. Tampão de amostra.....	208
3.7.9.2. Tampão para eletroforese (5X)	208
3.7.9.3. Preparar amostra para aplicar no gel de eletroforese.....	208
3.7.10. Zimograma.....	209
3.7.11. Determinação da atividade específica da oxidoredutase...	209
3.7.12. Reação de oxidação enantiosseletiva de alcoóis.....	210
3.7.13. Reação de redução enantiosseletiva em condições anaeróbias.....	210
3.8. Referências bibliográficas.....	211

Capítulo 4

4. Bioprospecção de micro-organismos/enzimas amazônicos para a aplicação em reações de biorredução e oxidação.....	216
4.1. Esponjas de água doce.....	217
4.2. Fungos endofíticos.....	218
4.3. Resultados e discussão.....	220
4.3.1. Avaliação da atividade enzimática (oxidorredutase) dos micro-organismos.....	220
4.3.2. Avaliação da atividade enzimática de bactérias de esponjas de água-doce em biorredução de cetonas.....	220
4.3.3. Avaliação da atividade enzimática de bactérias de esponjas de água-doce em oxidação enantiosseletiva de alcoóis.	223
4.3.4. Avaliação da atividade enzimática de fungos endofíticos em oxidação enantiosseletiva de alcoóis.....	225
4.3.5. Avaliação da atividade enzimática de fungos endofíticos em oxidação enantiosseletiva de alcoóis.....	227
4.4. Conclusões.....	229
4.5. Parte experimental.....	230
4.5.1. Avaliação da atividade enzimática (oxidorredutase) dos micro-organismos.....	230
4.5.1.1. Pré-inóculo.....	231
4.5.1.2. Inóculo e reação de redução e oxidação.....	231
4.5.1.3. Avaliação das reações de biocatálise.....	232
4.5.2. Preparo das soluções dos alcoóis racêmicos e das cetonas	232
4.5.3. Meios de cultura.....	232
4.6. Referências bibliográficas.....	234
5. Curriculum Vitae.....	235

Capítulo 1

1. Introdução

1.1. ANTÁRTICA

O ambiente marinho antártico é caracterizado por temperatura média constante de cerca de 1 °C. Trata-se de uma condição difícil para a sobrevivência de micro-organismos. Baixas temperaturas apresentam dois principais efeitos físico-químicos. Primeiro, a velocidade das reações químicas diminui exponencialmente, segundo, a temperatura também apresenta forte efeito sobre a viscosidade do meio, contribuindo, assim, para diminuir as taxas de reações nos micro-organismos [GERDAY et al. 2000].

Portanto, os micro-organismos psicrófilos desenvolveram, com sucesso, adaptações que lhes permitiram crescer em temperaturas tão baixas [HERNDL et al. 2005]. Pode-se esperar que essas adaptações envolvam modificações na membrana plasmática, de modo a manter a permeabilidade adequada, uma vez que nessas temperaturas as células dos micro-organismos poderiam congelar o que faria com que eles não sobrevivessem nesse tipo de ambiente [CHINTALAPATI et al. 2004]. As velocidades das reações químicas tornam-se sensíveis às variações de temperatura, embora o grau de sensibilidade dependa do valor da energia de ativação da reação [MARX et al. 2007]. Sendo

assim, com essas propriedades, as enzimas adaptadas ao frio tornam-se alternativas valiosas para reações biocatalíticas.

As estruturas cristalinas de enzimas de micro-organismos psicrófilos são de importância primordial para investigar as propriedades destes catalisadores adaptados ao frio. A Tabela 1.1 fornece exemplos de enzimas, cujas estruturas cristalinas foram estudadas [COLLINS et al. 2010].

Tabela 1.1: Enzimas psicrófilas cujas estruturas cristalinas são conhecidas [FELLER 2013].

Proteína	Fonte
Alfa-amilase	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>
Xilanase	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>
Celulase	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>
Superóxido dismutase	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>
S-Formilglutamina hidrolase	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>
Ca ²⁺ Zn ²⁺ protease	<i>Pseudomonas</i> sp.
Beta-lactamase	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Citrato sintase	<i>Arthrobacter</i> sp.
Beta-galactosidase	<i>Arthrobacter</i> sp.
Subtilisina	<i>Bacillus</i> sp.
Amidase alifática	<i>Nesterenkonia</i> sp.
Fosfatase alcalina	<i>Antarctic bacterium</i>
Amino peptidase	<i>Colwellia psychrerythraea</i>
Fenilalanina hidroxilase	<i>Colwellia psychrerythraea</i>
Malato desidrogenase	<i>Aquaspirillum arcticum</i>
Serina proteinase	<i>Vibrio</i> sp.
Isocitrato desidrogenase	<i>Desulfotalea psychrophila</i>
Aspartato carbamoiltransferase	<i>Moritella profunda</i>
Adenilato cinase	<i>Bacillus globisporus</i> and <i>Marinibacillus marinus</i>
Triose-fosfatase isomerase	<i>Vibrio marinus</i>
Ca ²⁺ Zn ²⁺ protease	<i>Flavobacterium</i> sp.
Tirosine fosfatase	<i>Shewanella</i> sp.
Catalase	<i>Vibrio salmonicida</i>

Tabela 1.1 continuação

Proteína	Fonte
Endonuclease I	<i>Vibrio salmonicida</i>
Lipase	<i>Photobacterium lipolytica</i>
Superóxido dismutase	<i>Aliivibrio salmonicida</i>
Alcalino fosfatase	<i>Vibrio sp. and Shewanella sp.</i>
Alcalino fosfatase	<i>Pandalus borealis</i>
Lactato desidrogenase	<i>Champsoccephalus gunnari</i>
Tripsina	<i>Salmo salar</i>
Elastase	<i>Salmo salar</i>
Pepsina	<i>Gadus morhua</i>
Uracil-DNA glicosilase	<i>Gadus morhua</i>

Vale ressaltar que todas essas estruturas estão intimamente comparadas às proteínas de micro-organismos mesofílicos, em que as enzimas de micro-organismos psicofílicos apresentam mudanças na composição dos aminoácidos que são responsáveis por suas propriedades específicas.

Portanto, a atividade termolábil de enzimas de micro-organismos psicofílicos sugere que a dinâmica das cadeias laterais do sítio ativo seja melhorada, a fim de contribuir para a atividade no frio e parecem favorecer uma melhor acessibilidade ao substrato e liberação do produto [TSIGOS et al. 1998]. Com isso, essas enzimas podem aceitar vários substratos e terem uma especificidade mais ampla do que as suas homólogas mesofílicas, porque substratos com conformações ou estruturas variadas podem se encaixar e se ligar ao sítio ativo dessas enzimas [TSIGOS et al. 1998]. Por exemplo, a ampla especificidade de uma álcool desidrogenase psicofílica, que oxida alcoóis de tamanhos variados, foi atribuída ao seu sítio ativo altamente flexível [TSIGOS et al. 1998]. Estes sítios ativos com dinamismo local também foram bem

demonstrados por uma α -amilase psicrófila, em que o padrão de inibição dessa enzima indicou que ela poderia formar um complexo ternário (enzima, substrato e inibidor), enquanto que a homóloga mesófila, mais rígida, apenas poderia formar complexos binários (enzima e substrato ou inibidor) [D'AMICO et al. 2006].

Portanto busca de flexibilidade local ou global dessas enzimas estão em debate atualmente. Já que, enzimas que apresentam flexibilidade global, frequentemente processam substratos volumosos, envolvendo presumivelmente movimentos concertados das moléculas inteiras, enquanto a flexibilidade local geralmente é observada para as enzimas que agem em pequenos substratos [FELLER, GERDAY 2003]. Há, no entanto, muitas exceções para concluir definitivamente esses estudos.

Com isso, recentemente, as enzimas de micro-organismos psicrófilos tornaram-se interessantes para aplicação industrial, em parte por causa dos esforços para diminuir o consumo de energia. Por exemplo, há um desejo crescente em aplicar enzimas psicrófilas na produção de detergentes. Com tais enzimas, torna-se possível desenvolver aplicações de lavagem que podem ser realizadas às temperaturas mais baixas. Para tais processos, as proteases psicrófilas, amilases ou lipases têm um grande potencial comercial. As indústrias de celulose e papel também são interessadas em enzimas de degradação de polímeros que atuam em temperaturas mais baixas. Várias aplicações de processamento de alimentos também se beneficiariam com a disponibilidade de enzimas de baixa temperatura [SHIRALDI, ROSA 2002].

A Tabela 1.2 mostra enzimas e suas aplicações em diferentes reações biocatalíticas, as quais são classificadas de acordo as reações que catalisam [SHIRALDI, ROSA 2002].

Tabela 1.2: Enzimas e suas aplicações.

Enzima	Principal aplicação
Lipases	Interesterificação de triacilgliceróis, síntese quiral
Glutaminases	Enzimas que aumentam o aroma
Glicosintases	Síntese de oligossacarídeos
Epóxido hidrolases	Resolução de epóxidos aril e alicíclicos substituídos, catálise enantiosseletiva
Monooxigenases	Oxidação e oxidação de Baeyer-Villiger
Transferases	Transferem grupos químicos
Oxidoreductases	Reações de oxidação e redução
Lipoxigenases	Biossíntese de mediadores inflamatórios
Ligases	Junção de duas ou mais moléculas

Apesar do número de aplicações (Tabela 1.2) algumas enzimas não apresentam um desempenho satisfatório ou características em termos de atividade, estabilidade e acima de tudo seletividade. Pesquisas superam algumas destas deficiências, alterando substratos (engenharia de substrato), através da modificação do sistema de reação (engenharia média) ou pela engenharia de enzimas.

Engenharia enzimática baseia-se em modificações físicas da proteína ou em modificações ao nível genético (DNA). Triagem microbiana é um método simples e frequentemente usado para encontrar novos biocatalisadores com propriedades químicas necessárias para cada biotransformação desejada [KUMAR et al. 2004]. Porém, atualmente é realizada análise metagenômica de

micro-organismos não cultiváveis [SCHLOSS 2003], em que essas e outras abordagens permitem aos investigadores tirarem o máximo proveito da diversidade microbiana existente [TORSVIK, OVREAS 2002]. Além disso, extremoenzimas isoladas de extremófilos são muito atraentes para aplicações industriais [SHIRALDI, ROSA 2002].

Dentre as enzimas utilizadas como catalisadores nas reações químicas, as oxidoredutases são responsáveis por catalisar a redução de compostos carbonílicos a alcoóis ou aminas quirais, bem como a oxidação de alcoóis aos respectivos compostos carbonílicos, que desempenham um papel importante como bloco de construção em síntese orgânica [TEMBA et al. 2003].

1.2. OXIDORREDUTASES

Oxidoredutases são amplamente distribuídas entre micro-organismos, plantas e animais, as quais exibem uma variedade de substratos em reações envolvendo a transferência de hidreto, abstração de hidrogênio, inserção de oxigênio, ou outras transformações [MUNRO et al. 2000].

Oxidoredutases podem ser classificadas de acordo com sua seqüência ou estrutura tridimensional, sendo importante para estudo da relação estrutura-função, a evolução da enzima e a genômica funcional. As oxidoredutases também podem ser classificadas de acordo com suas características catalíticas e/ou dependência de coenzima [LEHNINGER et al. 2008].

As oxidoredutases podem ser subdivididas em três categorias principais:

(1) Desidrogenases dependentes de NADH ou NADPH. Essas enzimas podem, por sua vez, serem divididas no grupo I das álcool desidrogenases, de cadeias longas (cerca de 350 resíduos de aminoácidos), em que são

dependentes de zinco, como as álcool desidrogenases I, II e III da *Saccharomyces cerevisiae* [BRÄNDÉN et al. 1975; ANDERSSON et al. 1981; YKOYAMA et al. 1990].

Existem também as desidrogenases de cadeias curtas, do grupo II (aproximadamente 250 resíduos de aminoácidos), que são independentes de zinco, tais como ribitol desidrogenase da *Klebsiella aerogenes*; bem como as do grupo IE enzimas "ferro-ativadas", que geralmente contêm cerca de 390 resíduos de aminoácidos, tal como álcool-desidrogenase II de *Zymomonas mobilis* e álcool-desidrogenase IV de *S. cerevisiae*, mas podem conter cerca de 900 resíduos de aminoácidos, como ocorrem com as álcool desidrogenases multifuncionais da *Escherichia coli* e *Clostridium acetobutylicum* [BENNETZEN, HALL 1982; BAKSHI et al. 1989; JÖRNVALL et al. 1997].

A *Zymomonas mobilis* contém duas isoenzimas de álcool desidrogenase fermentativa, uma enzima contém zinco (ADH I) e a outra ferro (ADH II). Para observar o efeito de um ambiente aeróbio sobre a atividade dessas enzimas, uma cultura de células foi transferida de condições anaeróbias para aeróbias. Em que após 4 h de incubação a ADH II mostrou uma inativação de 80%, enquanto ADH I permaneceu totalmente ativa. Esses resultados foram explicados devido a ADH II conter ferro, um metal pró-oxidante, o qual, após a mudança para condições aeróbias conduziu à inativação oxidativa da enzima. Em contraste, a ADH I estava protegida da inativação por conter zinco no seu sítio ativo [TAMARIT et al. 1997].

Esta proposta foi confirmada por estudos *in vitro* com ambas as enzimas purificadas e expostas à oxidação catalisada por metal. Em que, após 2 min de tratamento com $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$, a ADH I reteve 70% da atividade inicial, em

contraste com ADH II, que foi completamente inativada. Quando o ferro não foi adicionado ao sistema reacional, a ADH I permaneceu completamente protegida, enquanto a ADH II estava 80% inativada (por causa da presença de ferro no seu sítio ativo). Esses resultados indicaram que o zinco ligado a essa proteína desempenhou um papel importante na proteção do seu sítio ativo contra danos oxidativos, que poderiam ter conseqüências bioquímicas e fisiológicas nestas espécies [TAMARIT et al. 1997].

(2) Desidrogenases dependentes de NAD(P)^+ e independentes da pirroloquinolina quinona, heme ou F420, como por exemplo, metanol desidrogenases de *Paracoccus denitrificans*, etanol desidrogenases de *Acetobacter* e *Gluconobacter* spp. e álcool desidrogenases de certas arqueobactérias [ARFMAN et al. 1991; BLEICHER, WINTER 1991].

(3) Oxidases que catalisam oxidações irreversíveis de alcoóis, tais como, metanol oxidase de *Hansenula polymorpha* e, provavelmente, a oxidase de álcool veratrílico de certos fungos envolvidos na degradação de lignina [KIRK, FARRELL 1987; HRISTOZOVA et al. 2002].

Oxidorrredutases presentes em células íntegras de micro-organismos podem ser empregadas em várias reações, por exemplo, em reduções de cetonas que geralmente se beneficiam da elevada estabilidade dessas enzimas, uma vez que, as mesmas estão localizadas no seu ambiente natural; além da eficiente regeneração de cofator no interior das células [GOLDBERG et al. 2007].

Por outro lado, a aplicação de oxidorrredutases isoladas em reações redox tem essencial importância em escalas industriais e muitas vezes laboratoriais, especialmente para a síntese de intermediários enantiomericamente puros em utilização farmacêutica. Essas enzimas necessitam de cofatores, que

apresentam valores elevados requerendo assim reciclagem do mesmo no meio reacional para que o processo se torne economicamente viável [FABER 1997]. Portanto, as indústrias empregam sistemas de regeneração de cofator bem estabelecidos através de reações de acoplamento de enzimas, como por exemplo, as formatos desidrogenases (FDHs) e glicoses desidrogenases (GDHs) que reciclam os cofatores, principalmente em escalas técnicas e industriais [SCHIMIDT et al. 1992].

A Ciba Spezialitatenchemie AG utiliza duas enzimas, a (*R*)-lactato-NAD⁺ oxidorreductase de *Staphylococcus epidermidis* (LDH, desidrogenase láctica) e formato desidrogenase de *Candida boidinii* (FDH), para a produção contínua do ácido (*2R*)-hidroxi-4-fenilbutírico em um reator de tanque com agitação atingindo um rendimento espaço-tempo de 410 gL⁻¹dia⁻¹ com excelente excesso enantiomérico (e.e. 99,9%, Esquema 1.1) [SCHIMIDT et al. 1992].

Esquema 1.1: Produção contínua do ácido (*R*)-2-hidroxi-4-fenilbutírico através de um processo de regeneração de cofator empregando enzimas acopladas.

Devido à eficiente oxidação do formato, catalisada por FDH, a concentração do NADH pôde ser mantida alta. Aditivos como o mercaptoetanol e EDTA aumentaram a estabilidade da enzima tornando este processo mais econômico [SCHIMIDT et al. 1992].

1.3. IMPORTÂNCIA DAS OXIDORREDUTASES PARA O DESENVOLVIMENTO DA BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

Enzimas como catalisadores biológicos em aplicações industriais têm uma longa história. No entanto, suas aplicações às vezes necessitam de condições moderadas, as quais são diferentes das condições de funcionamento dos processos de produção em indústrias farmacêuticas, de alimentos, produtos químicos e de defensivos agrícolas. Existem milhares de enzimas conhecidas, mas apenas 130 delas têm sido aplicadas em domínio industrial, das quais 44% são enzimas hidrolíticas e apenas 2% são oxidoreduções, Figura 1.1 [FABER 2000; STAATHOF 2002].

Figura 1.1: Tipos de enzimas usadas em biotransformações industriais (baseados em 134 processos) [STAATHOF 2002].

Os processos de conversões químicas e bioquímicas envolvem muitas reações redox. Além disso, em seis categorias de enzimas, o número de oxidoreduções representa a proporção mais elevada (33%). Portanto, um estudo completo e eficiente das oxidoreduções seria uma parte importante em

biotecnologia industrial [MAY, PADGETTE 1983].

Os especialistas preveem que, até 2050, a biocatálise e bio-conversão podem ser responsáveis por 30% da indústria química [SOGIN et al. 2006]. Uma vez que, um tipo de catalisador redox biológico adequado tenha sido desenvolvido, uma via de catálise biológica muito curta e simples pode substituir o percurso catalítico químico que tem algumas desvantagens, como preço, instabilidade do catalisador, difícil recuperação e tratamento do catalisador.

1.3.1. Aplicações de oxidorredutases

Atualmente algumas oxidorredutases estão disponíveis no mercado, principalmente nas indústrias têxteis e de alimentos, no entanto, outras oxidorredutases estão sendo ativamente desenvolvidas para comercialização. Em que sua aplicação pode ser dividida em uso técnico-industrial, bem como na síntese química e nas indústrias medicinal e de alimentos [XU 2005].

1.3.1.1. Aplicações em técnica industrial

A lacase, peroxidase e outras oxidorredutases participam da deslignificação natural por fungos ligninolíticos. Várias lacases têm demonstrado capacidade de degradar ambas as ligninas naturais e sintéticas. Elas oxidam diretamente os componentes fenólicos da lignina, ou indiretamente na presença de um mediador redox adequado. Como resultado, os radicais podem conduzir a clivagem das ligações C-C de alifáticos ou aromáticos e a despolimerização [SIGOILLOT et al. 2004].

1.3.1.2. Aplicações nas indústrias têxteis

As oxidorredutases são empregadas nas indústrias têxteis no branqueamento da fibra de algodão, bem como no tratamento de resíduos. Um estudo recente mostra a aplicação de uma lacase em combinação com H_2O_2 no branqueamento da fibra de algodão [TZANOV 2003].

A importância dessa técnica se deve à substituição de oxidantes químicos convencionais (por exemplo, hipoclorito) por um sistema enzimático, que é ambientalmente favorável [TZANOV 2003].

Também se empregou outra oxidorredutase, a catalase, nessa técnica de branqueamento de tecidos, com a finalidade de degradar o peróxido restante após o branqueamento da fibra de algodão [TZANOV 2003].

Há emprego de oxidorredutases para eliminar o odor de tecidos, incluindo tecido de superfície de sofá e cortina, ou em detergente para eliminar o odor de tecidos gerado durante a lavagem do pano [HIRAMOTO, ABE 2004].

1.3.1.3. Aplicações em indústrias de alimentos

Muitos substratos, tais como açúcares, ácidos graxos insaturados e compostos fenólicos são importantes componentes de vários alimentos e bebidas. A sua modificação por oxidoreductase pode levar a nova funcionalidade, melhoria da qualidade, ou redução do custo [MINUSSI et al. 2002].

1.3.1.4. Proteção do ambiente

As oxidorredutases apresentam elevado potencial na proteção do meio

ambiente como ocorre com aplicações de hidrolases, liases, e transferases [AHUJA et al. 2004]. Vários micro-organismos podem usar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, compostos clorados e outros poluentes como fonte de carbono, nitrogênio ou energia. Uma parte do seu metabolismo é realizada por oxidoredutases. As reações de degradação catalisada por estas enzimas incluem a transferência de elétrons, a extração de H, e inserção de O, o que pode induzir a abertura do anel, despolimerização, mineralização e outras transformações [LEHNINGER et al. 2008].

1.3.1.5. Reações catalisadas por álcool desidrogenase (ADH)

Desidrogenases dependentes de NAD(P)H são muito úteis para síntese assimétrica por transformar aldeídos/cetonas pró-quirais em alcoóis quirais, ácidos carboxílicos e aminoácidos com elevada regio ou enantiosseletividade [STEWART 2001], como por exemplo, a D-aminoácido desidrogenase que catalisa a oxidação de D-aminoácidos nos correspondentes oxiácidos [ISIEWSKI et al. 1980].

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

O papel da ADH é proporcionar uma interação do substrato com o cofator de forma termodinamicamente favorável para que a reação ocorra. Na reação de oxidação de álcool o NAD(P)^+ não é capaz de receber o hidreto do álcool sem a presença da enzima (Figura 1.2) [BRUICE, 1998].

Figura 1.2: Mecanismo de oxidação do (R,S)-1-(fenil)etanol.

Álcool desidrogenase atua coordenando o (R,S)-1-(fenil)etanol e o NAD(P)⁺ ao seu sítio ativo, em que a enantiosseletividade vai depender da interação dos enantiômeros *R* e *S* do feniletanol com a álcool desidrogenase, onde B é um resíduo de aminoácido básico dessa enzima (Figura 1.2).

Como essas reações necessitam de cofatores em quantidades estequiométricas esses processos têm sido realizados com sistemas de reciclagem de cofatores [ROZZELL, 1999; NAKAMURA *et al.* 2003].

Os álcoois secundários na forma racêmica podem ser convertidos em sua forma enantiomericamente pura via estereoinversão. No Esquema 1.2, encontra-se um exemplo desse processo catalisado por ADH. Na etapa 1, um enantiômero de uma mistura racêmica de um álcool secundário é seletivamente oxidado à cetona correspondente, enquanto o outro se mantém inalterado. Na etapa 2, a cetona intermediária é reduzida por outra ADH levando a formação do álcool com a mesma configuração daquele enantiômero que se manteve inalterado na etapa 1. Este processo todo pode levar a

formação de um único enantiômero a partir de uma mistura racêmica, podendo chegar a rendimento igual a 100 %.

R = Alquila, arila.

Esquema 1.2: Exemplo de uma reação de desracemização.

Em geral, a síntese quiral catalisada por desidrogenases tem maior rendimento do que a de hidrolases, mas é mais difícil ou dispendiosa devida sua dependência de $NAD(P)^+$ [LEHNINGER et al. 2008].

1.3.1.6. Novos meios catalíticos

As oxidorredutases podem ser aplicadas em soluções não aquosas ou sistemas multifásicos. Para solventes orgânicos imiscíveis em água, uma oxidorredutase pode ser encapsulada em micelas reversas ou imobilizada sobre um transportador [BOROLE et al. 2004; LAI, LIN 2005]. Meios mais recentes para biocatálise incluem líquidos iônicos e CO_2 supercrítico [PARK, KAZLAUSKAS 2003].

1.4. FONTES DE OXIDORREDUTASES

Existem vários estudos com enzimas de micro-organismos mesófilos, porém poucos com enzimas obtidas de micro-organismos extremófilos (psicrofílicos, psicrotróficos, termofílicos e termotróficos). No entanto, nos últimos anos tem havido um interesse em micro-organismos psicrofílicos e psicrotróficos e suas enzimas adaptadas ao frio, por exemplo, uma álcool desidrogenase (ADH) dependente de NAD^+ obtida de uma bactéria psicrofílica (*Moraxella* TAE123) foi purificada com um rendimento global de 16,7%. Essa enzima nativa apresentou massa molecular aparente de 240 kDa, consistindo de quatro subunidades idênticas de 52 kDa e um átomo de zinco em uma de suas subunidades [TSIGOS et al. 1998].

Essa enzima exibiu uma especificidade de substrato, oxidando principalmente alcoóis alifáticos primários e secundários. A elevada velocidade de reação foi observada quando o etanol foi utilizado como substrato e uma diminuição gradual nessa velocidade com a extensão e ramificação da cadeia carbônica do álcool. Essa enzima também oxidou, eficazmente, alcoóis substituídos com impedimentos estéricos, como o difenilmetanol, e reduziu aldeídos e cetonas [TSIGOS et al. 1998].

Uma ADH dependente de NADP^+ e uma glicerol desidrogenase (GDH) dependente de NAD^+ foram identificadas em psicrotolerantes *Micrococcus* sp. e *Arthrobacter* sp., respectivamente, ambas isoladas de solo antártico [STIBOR et al. 2003].

A ADH dependente de NADP^+ apresentou atividade em oxidação de uma ampla gama de alcoóis de cadeias carbônicas médias, tendo preferência pelo

(*R*)-estereoisômero. Tanto a ADH quanto a GDH mostraram afinidade maior para a redução de cetonas, além disso a GDH foi ativa com glicerol e diois secundários [STIBOR et al. 2003].

Yamamoto et al. 2005 purificaram uma malato desidrogenase a partir de uma psicrotrófica e termolábel *Flavobacterium frigidimaris* KUC-1, isolada de água marinha antártica. A enzima é homotetrâmera com um peso molecular de 123 kDa, dependente de NADP⁺, que catalisou a oxidação do L-malato e a redução do oxalacetato. Sendo altamente susceptível a um tratamento térmico em que sua meia-vida à 40 °C foi 3,0 min [YAMAMOTO et al. 2005].

As álcool desidrogenases (oxidorreduases) que estão disponíveis comercialmente são originadas de fígado de cavalo (HLADH) e de micro-organismos como: *candida boidii*, *candida parapsilosis*, *Rodococcus erythropolis*, *Lactobacillus brevis*, entre outros [KROUTIL et al. 2004].

Outra fonte de oxidorreduases que tem sido recentemente estudada é da bactéria *Arthrobacter* sp.

1.4.1. *Arthrobacter* sp.

Recentemente, em nosso grupo, isolou-se uma *Arthrobacter artrocyaneus* (BAC 57) de amostra de solo da Amazônia sendo capaz de produzir oxidorreduases que foram usadas na resolução cinética oxidativa de alcoóis secundários racêmicos. Essa resolução cinética mostrou-se bastante eficiente na obtenção do enantiômero-(*R*) de derivados do (*R,S*)-1-feniletanol [SILVA et al. 2012].

Existem trabalhos que mostram estudo com *Arthrobacter* sp. psicrófilas capazes de degradar compostos orgânicos tóxicos, como compostos alifáticos

naturais, hidrocarbonetos aromáticos e poluentes xenobióticos resultantes da atividade humana [PLOTNIKOVA et al. 2004].

Também são relatados diversos estudos sobre enzimas provenientes de *Arthrobacter* sp. com diferentes aplicações, como por exemplo, na degradação de compostos orgânicos heterocíclicos como piridina e seus derivados [KHASAEVA et al. 2011]. Existem estudos que mostram a sua eficiência na degradação da atrazina, um herbicida bastante utilizado em plantações de cana de açúcar, que pode causar contaminação do solo, da superfície das águas e dos lençóis subterrâneos [WANG et al. 2011]. Além disso, o uso de compostos nitroaromáticos para a síntese de intermediários de produtos farmacêuticos, pigmentos, explosivos, entre outros, resulta no acúmulo de nitrofenol, dentre eles o *p*-nitrofenol, que é o mais importante e pode provocar a contaminação do ambiente.

Em vista disso, estudos foram realizados com a *Arthrobacter* sp. CCT 7749 que foi isolada com o objetivo de degradar compostos orgânicos, obtendo assim, resultados satisfatórios [ARAÚJO et al. 2011].

Nesse trabalho selecionou-se a *Arthrobacter* sp. CCT 7749 como produtora de oxidoredutases para obter compostos quirais enantiomericamente puros ou enriquecidos, uma vez que estudos anteriores mostraram o seu potencial biocatalítico em reações de oxidação enantiosseletiva de alcoóis secundários [ARAÚJO et al. 2011]. Esse tipo de bactéria é geralmente encontrada no solo. No entanto, essa bactéria foi isolada de sedimento marinho antártico. Trata-se de uma bactéria psicrófila.

1.5. COMPOSTOS QUIRAIS

Os compostos quirais são atualmente os mais importantes blocos de construção nas indústrias químicas e farmacêuticas para a produção de, por exemplo, catalisadores químicos, cristais líquidos, produtos agroquímicos, ou drogas [DAUßMANN et al. 2006]. Dentre os compostos quirais, uma atenção especial tem sido dada aos alcoóis quirais enantiomericamente enriquecidos, uma vez que estes alcoóis são amplamente empregados como intermediários para a introdução de informações quirais ao produto desejado [BLASER et al 2003]. Para obter esses compostos, a indústria geralmente emprega métodos químicos bem estabelecidos, como por exemplo, a hidrogenação assimétrica de cetonas pró-quirais catalisadas por complexos metálicos [ROTHENBERG 2008], resolução cinética não enzimática [SOMFA 1997] e oxidação enantiosseletiva de alcoóis catalisada por complexos quirais [NOYORI 1994].

1.5.1. Hidrogenação assimétrica de cetonas

Hidrogenação assimétrica de cetonas está entre as transformações químicas mais simples para obtenção de alcoóis secundários opticamente ativos (Esquema 1.3). Na presença de um catalisador quiral apropriado, hidrogênio molecular (H_2) é ativado e adicionado seletivamente a uma porção carbonílica em uma das duas faces. Uma eficiência atômica de 100% contribui para fornecer um processo sintético ambientalmente seguro. Essas propriedades indicam que a hidrogenação assimétrica de cetonas é um processo químico adequado para a síntese em larga escala de compostos quirais [OHKUMA, NOYORI 2007].

Esquema 1.3: Hidrogenação assimétrica de cetonas.

O complexo (Esquema 1.4) foi capaz de hidrogenar assimetricamente cetonas. Em que a acetofenona foi reduzida com conversão de 40% e obtendo 27% de excesso enantiomérico, depois de 18 h a 50 °C (25 atm de H₂). Embora a enantiosseletividade tenha sido moderada, isto representou um avanço significativo na catálise assimétrica baseada em ferro [DARWISH, WILLS 2007].

Esquema 1.4: Hidrogenação assimétrica de cetonas usando catalisador de ferro.

1.5.2. Resolução cinética de alcoóis secundários

Uma abordagem atraente para a síntese de alcoóis quirais é a resolução cinética através da oxidação seletiva de um enantiômero a partir de uma mistura racêmica usando um catalisador. Embora este método (mesmo quando a seletividade é perfeita) gera cetona "indesejada", esta pode ser reduzida e

reciclada. No entanto, alternativamente, a oxidação seletiva de um dos enantiômeros do álcool em um substrato *meso* pode, em princípio, dar um produto com 100% de conversão e excesso enantiomérico [HASHIGUCHI et al. 1997].

A resolução cinética oxidativa de alcoóis requer um aceptor de átomos de hidrogênio gerado na reação. Vários grupos relataram a utilização de uma cetona "sacrifício", que tinha de ser utilizada em excesso. A propanona é frequentemente usada uma vez que o seu produto de redução é facilmente removido. Um das mais recentes e significativas contribuições para esta área ocorreu em 1997 quando Noyori e Ikariya relataram a utilização do complexo de rutênio para a resolução cinética de alcoóis arílicos (Esquema 1.5) [HASHIGUCHI et al. 1997].

Esquema 1.5: Resolução cinética de alcoóis catalisada por complexo de rutênio.

Com este catalisador, em solução de propanona, foram formados alcoóis com até 99% de excesso enantiomérico. O catalisador **1** removeu dois átomos de hidrogênio a partir de um substrato, por meio de um estado de transição cíclico com seis membros, para dar um complexo de hidreto metálico. Estes

dois átomos de hidrogênio foram, então, transferidos para uma molécula de propanona, regenerando assim o catalisador para um novo ciclo. Outros catalisadores têm sido utilizados de uma maneira semelhante [IURA et al. 1999; CARO et al. 2003].

Este processo foi utilizado com bons resultados em alguns complexos sintéticos Masaguer et al., por exemplo, utilizaram o sistema original de Noyori para a resolução cinética de benzocicloalcanos [CARO et al. 2003]. Já Ogasawara et al. realizaram resoluções cinéticas de 2-ciclopentenois derivadas de precursores cíclicos e foram capazes de isolar os produtos com excesso enantiomérico >99% e conversão de até 49% [IURA et al. 1999].

1.5.3. Oxidação enantiosseletiva de alcoóis catalisada por complexo quiral

Chungu Xia et al. mostraram que complexo quiral de Mn(III)-Salen pode catalisar a oxidação de derivados racêmicos de alcoóis do tipo R_1R_2CHOH , com conversão parcial para uma mistura da cetona correspondente e do R_1R_2CHOH quiral com excelente enantiosseletividade [SUN et al. 2003; CHENG et al. 2008]. Foi relatado que a adição de quantidades subestequiométricas de um sal de bromo a uma mistura do catalisador de manganês, $PhI(OAc)_2$, e um meio bifásico CH_2Cl_2/H_2O foi importante para a elevada enantiosseletividade (Esquema 1.6) [SUN et al. 2003].

Esquema 1.6: Oxidação enantiosseletiva de alcoóis secundários racêmicos [SUN et al. 2003].

Kita et al. observaram anteriormente que KBr acelerava a oxidação dos alcoóis secundários por PhIO. O grupo de Xia propôs que os oxidantes ativos para a oxidação de alcoóis secundários foram uma composição de espécies possuindo Salen-Mn(V)-OIPh, mas não forneceram qualquer explicação para o efeito do brometo na enantiosseletividade da reação [LI et al. 2006].

Porém nas últimas décadas, o interesse para a criação de centros estereogênicos por aplicação de métodos biocatalíticos aumentou consideravelmente [HONDA et al. 2006], uma vez que estes métodos importantes empregam catalisadores verdes, além das diferentes vantagens que oferecem, em comparação com outros métodos, tais como alta seletividade, elevado grau de pureza do produto, condições reacionais brandas, os custos de produção e excelente disponibilidade do catalisador [ADAMCZAK, KRISHNA 2004].

Sendo assim, atualmente existem cerca de cinco grupos de enzimas aplicadas para a síntese de alcoóis quirais. A primeira reduz os grupos funcionais carbonílicos (cetonas) para alcoóis secundários enantioenriquecidos (desidrogenases ou redutases) [BUCHHOLZ, GRÖGER 2006; HUANG et al. 2010]. O segundo grupo produz alcoóis através da introdução de oxigênio

molecular com a concomitante redução de um ou dois elétrons (mono e dioxigenases) [URLACHER et al. 2004]. O terceiro grupo produz alcoóis pela adição de água à ligação dupla carbono-carbono (hidratases) [BUCHHOLZ, GRÖGER 2006], enquanto que o quarto grupo forma alcoóis pela adição nucleofílica de moléculas pequenas, tais como HCN, em grupos carbonílicos, que geralmente resulta na formação de nova ligação C-C (hidroxinitrila liases e aldolases) [DEAN et al. 2007]. O último grande grupo de enzimas resolve alcoóis quirais racêmicos por reação com um único enantiômero do álcool (hidrolases) [THEIL et al. 1995].

1.6. OBJETIVOS

Devido à grande importância de oxidoredutases e alcoóis quirais em síntese orgânica, nesse trabalho buscou-se caracterizar oxidoredutases microbianas para aplicação em reações de biorredução enantiosseletiva de cetonas e oxidação enantiosseletiva de alcoóis secundários.

Além disso, contribuir para o estudo da biodiversidade microbiana antártica e de macromoléculas de origem natural, nesse caso, enzimas para aplicação em reações químicas.

1.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMCZAK, M.; KRISHNAM, S. H. Strategies for Improving Enzymes for Efficient Biocatalysis. *Food Technology Biotechnology* **2004**, 42(4), 251-264.
- AHUJA, S. K.; FERREIRA, G. M.; MOREIRA, A. R. Utilization of enzymes for environmental applications. *Critical Reviews in Biotechnology* **2004**, 24(2-3), 125-154.
- ANDERSSON, P.; KVASSMAN, J.; LINDSTRÖM, A.; OLDÉN, B.; PETTERSSON, G. Effect of NADH on the pK_a of zinc-bound water in liver alcohol dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry* **1981**, 133, 425–433.
- ARAÚJO, L. S.; KAGOHARA, E.; GARCIA, T. P.; PELLIZARI, V. H.; ANDRADE, L. H. Screening of Microorganisms Producing Cold-Active Oxidoreductases to Be Applied in Enantioselective Alcohol Oxidation. An Antarctic Survey. *Marine Drugs* **2011**, 9, 889-905.
- ARORA, P. K.; JAIN, R. K. Pathway for degradation of 2-Chloro-4-Nitrophenol in *Arthrobacter* sp. *Current Microbiology* **2011**, 63(6), 568-573.
- ARFMAN, N.; BEEUMEN, J. V.; DE VRIES, G. E.; HARDER, W.; DIJKHUIZEN, L. Purification and characterisation of an active protein for methanol dehydrogenase from thermotolerant *Bacillus* spp. *Journal of Biological Chemistry* **1991**, 266, 3955–3960.
- BAKSHI, E. N.; TSE, P.; MURRAY, K. S.; HANSON, G. R.; SCOPES, R. K.; WEDD, A. G. Iron-activated alcohol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*: spectroscopic and magnetic properties. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, 111, 8707–8713.
- BENNETZEN, J. L.; HALL, B. D. The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase I. *The Journal of Biological Chemistry* **1982**, 257, 3018–3025.
- BOROLE, A.; DAI, S.; CHENG, C. L.; RODRIGUEZ, M.; DAVISON, B. H. Performance of chloroperoxidase stabilization in mesoporous sol-gel glass using *In situ* glucose oxidase peroxide generation *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2004**, 113, 273-285.
- BLÄSER, S.; JERSCH, K.; HAINMANN, I.; ZIEGER, W.; WUNDERLE, D.; BUSSE, A.; ZIEGER, B. Isolation of new splice isoforms, characterization and expression analysis of the human septin *SEPT8* (KIAA0202). *Gene* **2003**, 312, 313-320.
- BLEICHER, K.; WINTER, J. Purification and properties of F_{420} and $NADP^+$ -dependent alcohol dehydrogenases of *Methanogenium liminitans* and *Methanobacterium palustre* specific for secondary alcohols. *European Journal of Biochemistry* **1991**, 200, 43–51.

BRÄNDÉN, C.; JÖRNVALL, H.; EKLUND, H.; FURUGREN, B.; Alcohol dehydrogenases. BOYER P. D. (Ed.) In: *The Enzymes*, 3rd edn., Academic Press, New York **1975**, 11, 103–190.

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

S.; GRÖGER, H. Enantioselective biocatalytic reduction of ketones for the synthesis of optically active alcohols. New York **2006**, 757–790.

CARO, Y.; TORRADO, M.; MASAGUER, C. F.; RAVINA, E. Kinetic resolution of 3-hydroxymethylbenzocycloalkanols by selective asymmetric hydrogen-transfer oxidation *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, 14, 3689–3696.

CHENG, Q.; DENG, F.; XIA, C.; SUN, W. The Mn(Salen)-catalyzed oxidative kinetic resolution of secondary alcohols: reaction development and scope *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, 19(20), 2359–2362.

CHINTALAPATI, S.; KIRAN, M. D.; SHIVAJI, S. Role of membrane lipid fatty acids in cold adaptation. *Cellular and Molecular Biology* **2004**, 50, 631–642.

COLLINS, T.; MATZAPETAKIS, M.; SANTOS, H. Backbone and side chain ¹H, ¹⁵N and ¹³C assignments for a thiol-disulphide oxidoreductase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis*TAC125. *Biomolecular NMR Assignments* **2010**, 4(2), 151–154.

DARWISH, M.; WILLS, M. Asymmetric catalysis using iron complexes—‘Ruthenium Lite’? *Catalysis Science & Technology* **2012**, 2, 243–255.

D'AMICO, S.; SOHIER, J. S.; FELLER, G. Kinetics and energetics of ligand binding determined by microcalorimetry: insights into active site mobility in a psychrophilic α -amylase. *Journal of Molecular Biology* **2006**, 358(5), 1296–1304.

DAUßMANN, T.; HENNEMANN, H. G.; ROSEN, T. C. Enzymatische technologien zur synthese chiraler alkohol-derivate. *Chemie Ingenieur Technik* **2006**, 78, 249–255.

FABER, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, 4th Edition, Springer-Verlag, Berlin, Germany **2000**.

FELLER, G.; GERDAY, C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nature Reviews Microbiology* **2003**, 1(3), 200–208.

FELLER, G. Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology. *Scientifica* **2013**, 2013, 1–28.

FOURNEL, C.A.; SIGOILLOT, A.; ASTHER, J.C.; M., Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2004**, 64, 346–352.

GERDAY, C.; AITTALEB, M.; ARPIGNY, J. L.; BAISE, E.; CHESSA, J. P.; GARSOUX, G.; PETRESCU, I.; FELLER, G. Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochimica et Biophysica Acta* **2000**, 1342, 119-131.

GOLDBERG, K., SCHROER, K., L€UTZ, S., AND LIESE, A. Biocatalytic ketone reduction – a powerful tool for the production of chiral alcohols – part II: whole-cell reductions. *Applied and Environmental Microbiology* **2007**, 76, 249–255.

HASAEVA, F. M.; VASILYUK, N. V.; LEBEDEV, A.T. Study of the initial Stages of 2-Methylpyridine Catabolism By *Arthrobacter* sp. Strain KM-2MP. *Microbiology* **2011**, 80(3), 341-349.

HASHIGUCHI, S.; FUJII, A.; HAACK, K. J.; MATSUMURA, K.; IKARIYA, T.; NOYORI, R. Kinetische Racematspaltung sekundärer Alkohole durch Ruthenium(II)-katalysierte Transferhydrierung. *Angewandte Chemie International Edition* **1997**, 109, 300-303.

HERNDL, G. J.; REINTHALER, T.; TEIRA, E.; VAN AKEN, H.; VETH, C.; PERNTHALER, A.; PERNTHALER, J. Contribution of Archaea to total prokaryotic production in the deep Atlantic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* **2005**, 71, 2303–2309.

HIRAMOTO, T.; ABE, K. PCT patent WO2004103329-A1 **2004**.

HONDA, K.; ISHIGE, T.; KATAOKA, M.; SHIMIZU, S. Microbial and enzymatic processes for the production of chiral compounds. New York **2006**, 529–546.

HRISTOZOVA, T.; MICHAILOVA, L.; TUNEVA, D.; GOTCHEVA, V.; ANGELOV, A.; ROSHKOVA, Z. Mutant *Hansenula polymorpha* strain with constitutive alcohol oxidase and peroxisome biosynthesis. *Zeitschrift für Naturforschung C*. **2002**, 57(9–10), 858–862.

HUANG, Y.; LIU, N.; WU, X.; CHEN, Y. Dehydrogenases/reductases for the synthesis of chiral pharmaceutical intermediates. *Current Organic Chemistry* **2010**, 14, 1447-1460.

IURA, Y.; SUGAHARA, T.; OGASAWARA, K. Oxidative Resolution of 2-Cyclopentenols By the Asymmetric Hydrogenation Transfer Protocol. *Tetrahedron Letters* **1999**, 40, 5735–5738.

JÖRNVALL, H.; PERSSON, B.; JEFFERY J. Alcohol and polyol dehydrogenases are both divided into two protein types, and structural properties cross-relate the different enzyme activities within each type. *Proceeding of the National Academy Sciences* **1981**, 78(7), 4226–4230.

KIRK, T. K.; FARRELL, R. L. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of

lignin. *Annual Review of Microbiology*. **1987**, *41*, 465–505.

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

KUMAR, S.; WITTMANN, C.; HEINZLE, E. Minibioreactors. *Biotechnology Letters* **2004**, *26*, 1–10.

LAI, Y. C.; LIN, S. C. Application of immobilized horseradish peroxidase for the removal of p-Chlorophenol from aqueous solution. *Process Biochem* **2005**, *40*, 1167-1174.

LI, Y. Y.; ZHANG, X. Q.; DONG, Z. R.; SHEN, W. Y.; CHEN, G.; GAO, J. X. Kinetic resolution of racemic secondary alcohols catalyzed by chiral diaminodiphosphine-Ir(III) complexes. *Organic Letters* **2006**, *8*(24), 5565 – 5567.

LSIEWSKI, P. J.; KACZOROWSKI, G. J.; WALSH, C. Purification and properties of D-amino acid dehydrogenase, an inducible membrane-bound iron-sulfur flavoenzyme from *Escherichia coli* B. *Journal of Biological Chemistry* **1980**, *255*(10), 4487–4494.

MARX, J.C; COLLINS, T.; D'AMICO, S.; FELLER, G.; GERDAY, C. Cold-Adapted Enzymes from Marine Antarctic Microorganisms. *Mar Biotechnol (NY)* **2007**, *9*, 293–304.

MAY, S. W.; PADGETTE, S. R. Oxidoreductase Enzymes in Biotechnology: Current Status and Future Potential. *Nature Biotechnology* **1983**, *1*, 677–686.

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

OHKUMA, T.; NOYORI, R. Enantioselective ketone and β -keto ester hydrogenations (including mechanisms). Wiley-VCH, *Weinheim* **2007**, *3*, 1105-1163.

MINUSSI, R. C.; PASTORE, G. M.; DURÁN, N. Potential applications of laccase in the food industry *Trends in Food Science and Technology* **2002**, *13*, 205-216.

SOGIN, M. L.; MORRISON, H. G.; HUBER, J. A.; WELCH, D. M.; HUSE, S. M.; NEAL, P. R.; ARRIETA, J. M.; HERNDL, G. J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere” *PNAS* **2006**, *103* (32), 12115 –12120.

MUNRO, A. W.; TAYLOR, P.; WALKINSHAW, M. D. Structures of redox enzymes. *Current Opinion Microbiology* **2000**, *11*, 369-376.

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

NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. Principles of Biochemistry. New York: W.H. Freeman, **2008**.

OIKAWA, T.; YAMAMOTO, N.; SHIMOKE, K.; UESATO, S.; IKEUCHI T.; FUJIOKA, T. Purification, Characterization, and Overexpression of Psychrophilic and Thermolabile Malate Dehydrogenase of a Novel Antarctic Psychrotolerant, *Flavobacterium frigidimaris* KUC-1 Bioscience, *Biotechnology, and Biochemistry* **2005**, 69(11), 2146-2154.

PARK, S.; KAZLAUSKAS, R. J. Biocatalysis in ionic liquids—advantages beyond green Technology. *Current Opinion in Biotechnology* **2003**, 14, 432–437.

PLOTNIKOVA, E. G.; YASTREBOVA, O. V.; ANAN'INA, L. N.; DOROFEEVA, L. V.; LYSANSKAYAAND, V. Y.; DEMAKOV, V. A. Halotolerant Bacteria of the Genus *Arthrobacter* Degrading Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Russian Journal of Ecology* **2011**, 42(6), 502-509.

ROTHENBERG, G. Catalysis Concepts and Green Applications, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.

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

SCHMIDT, S.; WITFRICH, R.; ERDMANN, M. D.; WILKES, H.; FRANCKE, W.; FORTNAGEL, P. Biodegradation of Diphenyl Ether and its Monohalogenated Derivatives by *Sphingomonas* sp. Strain SS3 *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, 58, 2744-2750.

SCHIRALDI, C.; ROSA, M. The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles, *Trends Biotechnol* **2002**, 20, 515–521.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics, *Current Opinion Biotechnology*. **2003**, 14, 303–310.

SILVA, C. R.; SOUZA, J. C.; ARAUJO, L. S.; KAGOHARA, E.; GARCIA, T. P.; PELIZZARI, V. H.; ANDRADE, L. H. Exploiting the enzymatic machinery of *Arthrobacter artrocyaneus* for oxidative kinetic resolution of secondary alcohols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2012**, 83, 23–28.

SIGOILLOT, C.; RECORD, E.; BELLE, V.; ROBERT, J. L.; LEVASSEUR, A.; PUNT, P. J.; HONDEL, V. D. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2004**, 64, 346-352.

SOMFAI, P. Nonenzymatic Kinetic Resolution of Secondary Alcohols. *Angewandte Chemie International Edition* **1997**, 36(24), 2731-2733.

STEPHEN, M. D.; GREENBERG, W. A.; WONGA, C. H. Recent Advances in Aldolase-Catalyzed Asymmetric Synthesis. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2007**, *349*, 1308–1320.

STAATHOF A. J. J. The production of fine chemicals by biotransformations. *Current Opinion in Biotechnology* **2002**, *13*, 548-556.

STEWART, J. D. Dehydrogenases and Transaminases in Asymmetric Synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology* **2001**, *5*, 120-129.

STIBOR, M.; POTOCKÝA, M.; PÍCKOVÁA, A.; KARASOVÁA, P.; RUSSELL, B. N. J.; KRÁLOVÁA, B. Characterization of cold-active dehydrogenases for secondary alcohols and glycerol in psychrotolerant bacteria isolated from Antarctic soil. *Enzyme and Microbial Technology* **2003**, *32*, 532–538.

SUN, W.; WANG, H.; XIA, C.; LI, J.; ZHAO, P. Chiral-Mn(Salen)-Complex-Catalyzed Kinetic Resolution of Secondary Alcohols in Water. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42*, 1042–1044.

TAMARIT, J.; CABISCOL, E.; AGUILAR, J.; ROS, J. Differential Inactivation of Alcohol Dehydrogenase Isoenzymes in *Zymomonas mobilis* by Oxygen. *Journal of Bacteriology* **1997**, *179*(4), 1102–1104.

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

THEIL, F. Lipase-Supported Synthesis of Biologically Active Compounds. *Chemical Reviews* **1995**, *95*(6), 2203-2227.

TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion Microbiology* **2002**, *5*, 240–245.

TSIGOS, I.; VELONIA, K.; SMONOU, I.; BOURIOTIS, V. Purification and characterization of an alcohol dehydrogenase from the Antarctic psychrophile *Moraxella* sp. TAE123. *European Journal of Biochemistry* **1998**, *254*, 356-362.

URLACHER, V. B.; WAHL, L. S.; SCHIMID, R. D. Microbial P450 enzymes in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2004**, *64*(3), 317-325.

XU, F. Applications of oxidoreductases: recent progress *Industrial Biotechnol.* **2005**, *1*, 38–50.

WANG, J.; ZHU, L.; LIU, A.; MA, T.; WANG, Q.; WANG, H. J.; JIANG, T.; ZHAO, R. Isolation and Characterization of an *Arthrobacter* sp. Strain HB-5 that transform atrazine. *Environmental Geochemistry and Health* **2011**, 33(3), 259-266.

WISEMAN, A. Handbook of enzyme biotechnology. 2. Ed. Nova York, John Wiley & Sons, **1985**.

YOKOYAMA, S.; YOKOYAMA, R.; KINLAW, C. S.; HARRY, D. E. Molecular evolution of the zinc-containing long-chain alcohol dehydrogenase genes. *Molecular Biology and Evolution* **1990**, 7, 143–154.

TZANOV, T.; BASTO, C.; GÜBITZ, G. M.; CAVACO, P. A. Laccases to improve the whiteness in a conventional bleaching of cotton. *Macromolecular Materials and Engineering* **2003**, 288, 807-810.

Capítulo 2

2. Aplicação da *Arthrobacter* sp. em desracemização (*R*)-seletiva e redução (*S*)-seletiva: O papel do oxigênio molecular.

Arte: Daysson Palmeira

Várias enzimas adaptadas ao frio isoladas de micro-organismos da Antártica têm sido estudadas [RUSSELL 2000; CAVICCHIOLI et al. 2002]. Motivado pelas características interessantes desses micro-organismos adaptados ao frio decidiu-se juntar a uma expedição à Península Antártica em busca de micro-organismos produtores de oxidorreduções. Nesse estudo foram isolados 232 micro-organismos, dos quais um em especial, a *Arthrobacter* sp. CCT 7749 demonstrou uma fonte enzimática eficiente para a oxidação enantiosseletiva de vários alcoóis derivados do (*R,S*)-1-(fenil)etanol [ARAÚJO et al. 2011].

Comparando os sistemas catalisados por enzimas presentes em células do tipo selvagem e enzimas que passaram por processos de engenharia, essas últimas apresentam algumas vantagens, como a possibilidade de alterar tanta quimiosseletividade quanto enantiosseletividade do substrato para obter o produto desejado [NAIR et al. 2010].

Geralmente em sistemas com células íntegras, uma vez escolhida uma transformação específica, a triagem de enzimas pode ser realizada. No entanto, se um composto bifuncional é escolhido como substrato em reações

catalisadas por enzimas presentes em células, transformações adicionais podem ser observadas devido à presença de enzimas diferentes.

O uso do mesmo micro-organismo para executar diferentes reações em síntese orgânica é mais explorado com micro-organismos recombinantes do que com células do tipo selvagem [ISHIGE et al. 2005]. Em vários casos, a quantidade de enzima para a reação desejada em células do tipo selvagem é inferior ao de uma célula recombinante.

Entretanto, a busca por novas enzimas a partir de espécies do tipo selvagem é motivada pela conhecida diversidade em biossíntese química de metabólitos, o que certamente está relacionadas com enzimas interessantes e desconhecidas [BERTRAND et al. 2014]. A utilização de células do tipo selvagem na biotransformação de compostos não naturais é um meio importante para detectar a enzima responsável pela reação química desejada.

Decidiu-se explorar a aeróbia *Arthrobacter* sp. CCT 7749 isolada de sedimento marinho antártico devido as condições restritas em que ela cresce, por exemplo, a quantidade de oxigênio pode ser restrita. Com isso, optou-se por explorar o potencial enzimático da *Arthrobacter* sp., visando uma transformação celular promíscua, na presença ou ausência de oxigênio.

Além disso, compostos não naturais foram selecionados como substratos para estas enzimas, contendo diferentes heteroátomos de silício, fósforo, estanho e boro. Esses compostos foram selecionados para avaliar o espectro de substratos para essas enzimas e sua estabilidade frente a esses diferentes heteroátomos.

2.1. Compostos de silício

Os compostos orgânicos de silício têm atraído à atenção da comunidade científica, devido algumas classes de organo-silanos, sendo empregados em síntese orgânica na formação de ligações C-C e na utilização como grupos protetores [WEBER 1983]. Esses compostos apresentam boa estabilidade, baixa toxicidade, além de abundância natural.

O silício apesar de não ser um elemento que ocorre naturalmente em compostos bioativos, semelhanças físicas e eletrônicas comparáveis com o seu homólogo, carbono, faz com que aquele seja uma opção viável para a substituição de um centro de carbono de um intermediário farmacológico [MEANWELL e SYNOPSIS 2011].

Apesar dessa semelhança o silício possui um caráter inerente que é ligeiramente alterado comparado ao carbono. Ele possui um raio atômico cerca de 70% maior do que o do átomo de carbono, cujo ângulo de ligação fica alterado e o comprimento das ligações torna-se mais longo [MEANWELL e SYNOPSIS 2011]. O silício é mais lipofílico e eletropositivo, permitindo ligações mais fortes com oxigênio e flúor (Si-OH e Si-F) do que as ligações C-OH e C-F [ENGLEBIENNE 2005]. Essas pequenas diferenças em comparação ao composto de carbono fazem com que os compostos contendo o silício possam ser uma estratégia atraente para melhorar propriedades farmacocinéticas de alguns substratos [ENGLEBIENNE 2005].

Uma das principais aplicações emergentes para o silício é a sua capacidade em mimetizar o estado de transição ativo da hidrólise de péptidos mediada por protease [LEUNG et al. 2000].

Alilsilanos são amplamente utilizados em síntese orgânica [BROOK 2000; LANGKOPT e SCHINZER 1995]. A fraca polarização da ligação C-Si permite um fácil manuseio desses reagentes e, portanto, ocupam um lugar único no arsenal da química orgânica. Embora as reações de alilação catalisada por metais ainda constituam uma das principais aplicações na química orgânica, adições de espécies eletrofílicas e radicais livres, bem como precursores neutros nos processos de cicloadição, para o duplo vínculo de alilsilanos, também têm sido intensamente estudados [FLEMING 1989].

2.2. Compostos de fósforos

Compostos organofosforados são de grande importância em síntese orgânica, catálise, bioquímica, indústrias farmacêuticas e ciência de materiais.

A adição assimétrica catalisada por metais e nucleófilos de fósforo é uma das abordagens mais eficientes e confiáveis para a construção de novas ligações carbono-fósforo. Nos últimos anos, grandes conquistas foram obtidas nesta área, e muitos métodos têm sido desenvolvidos para essas transformações, com alta eficiência, baixa carga ligante e excelente seletividade [BORNER 2008].

Para alcançar os mais elevados níveis de reatividade e seletividade em reações catalíticas enantiosseletivas vários parâmetros reacionais devem ser otimizados, o mais importante é o estudo de ligantes quirais [BORNER 2008]. Neste contexto, no início de 1990 surgiram ligantes contendo fósforo, os fosfitos, adequados para a hidroformilação assimétrica catalisada por Rh [DIÉGUEZ et al. 2004] e Cu [ALEXAKISET et al. 2008]. Nos últimos anos o seu uso tem sido estendido com sucesso para outras reações catalíticas com

destaque para os avanços alcançados usando esses ligantes na hidrogenação assimétrica de olefinas funcionalizadas e não funcionalizadas, substituição alílica assimétrica e a reação de Heck, entre outras [FIROUZABAD et al. 2014].

Ligantes fosfitos são extremamente atraentes para a catálise, pois são fáceis de preparar a partir de alcoóis prontamente disponíveis, o que permite sintetizar uma série de ligantes quirais, na busca por reações com elevada atividade e seletividade [PEREIRA et al. 2013].

Outra vantagem dos ligantes de fosfito é que eles são menos sensíveis a atmosfera de oxigênio e outros agentes oxidantes de fosfinas. Além disso, eles são passíveis de síntese em paralelo, mesmo em síntese em fase sólida. Por outro lado, os fosfitos são propensos a reações de decomposição, tais como a hidrólise, alcoólise e a reação de Arbuzov. Em muitos casos, estas reações secundárias podem ser suprimidas quando os fosfitos de arila volumosos são utilizados [ARBUZOV 1981].

Atualmente, vários compostos de fósforo usados comercialmente são inorgânicos, mas compostos de fósforo orgânicos estão tornando-se bastante importantes. Eles são usados como antioxidantes e estabilizantes para plásticos e óleos industriais, e em diversas áreas de aplicação, como resistência à corrosão, extração, complexação, como agroquímicos (inseticidas, fungicidas, herbicidas) [RAJSKI e WILLIAMS 1998] e agentes antitumorais [ARBUZOV e KAEHNE 1998]. As aplicações industriais, junto com o aumento do uso de compostos de fósforo em síntese orgânica e na química de compostos organometálicos, têm adquirido um rápido aumento na literatura da química de organofosforados.

2.3. Compostos de estanho

Compostos orgânicos de estanho compreendem um grupo de organometálicos caracterizado por um átomo de Sn ligado covalentemente a um ou mais substituintes orgânicos (por exemplo, metil, etil, butil, propil e fenil). Esses compostos são representados quimicamente pelas fórmulas $R\text{SnX}_3$, $R_2\text{SnX}_2$, $R_3\text{SnX}$, $R_4\text{Sn}$, em que R pode ser um grupo alquila ou arila e X uma espécie aniônica, por exemplo, um halogeneto, óxido ou hidróxido [BLUNDEN, EVANS 1990].

As ligações Sn-C são estáveis na presença de água, calor, O_2 atmosférico e temperaturas de até 200 °C [BRINCKMAN e BELLAMA 1978]. O comprimento dessas ligações tem um efeito significativo sobre as propriedades químicas e físicas dos compostos orgânicos de estanho [GODOI et al. 2003].

Organoestanhos são empregados em vários campos e apresentam potenciais aplicações biológicas, tais como atividades bactericidas, inseticidas, fungicidas e antitumorais [GIELEN e TIEKINK 2005], além de serem componentes ativos em uma série de formulações, como de tintas anti-incrustantes, desinfetantes e conservantes de madeira [SARAFIAN et al. 1999].

A preparação e a aplicação de intermediários de organoestanho tornaram-se um aspecto muito importante em química orgânica e de heterocíclicos. Várias reações de acoplamento cruzado, como a de Stille, para a formação de ligações carbono-carbono vêm sendo exploradas industrialmente, especialmente para a produção de fármacos [SCHUBERT et al. 1999].

2.4. Compostos de boro

Os compostos orgânicos que contêm boro são conhecidos há mais de um século e muitos aspectos de suas propriedades químicas e reatividade são conhecidos há algum tempo. Desde a descoberta e desenvolvimento de hidroboração, as organoboranas estão entre os reagentes e intermediários mais utilizados em síntese orgânica, incluindo reações assimétricas. Além disso, as primeiras investigações sobre a química de hidretos de boro e carboranos revelaram novas classes de compostos com reatividade e estrutura única, que continuam a atrair a atenção dos pesquisadores. Apesar destas primeiras descobertas, no entanto, o verdadeiro potencial de alguns dos compostos orgânicos de boro mais versáteis e quimicamente estáveis foi descoberto na última década [MOLANDER e ELLIS 2007; STEFANI 2007].

Naturalmente, a crescente lista de compostos orgânicos de boro vão desde valiosas organoboranas, incluindo ácidos organoborônicos, boronatos e, mais recentemente, organotrifluoroboratos. Muitas dessas moléculas têm sido cada vez mais usadas em uma variedade de novos processos químicos e como componentes funcionais importantes em outras áreas, incluindo os receptores e sensores moleculares, novos materiais, assim como as sondas biológicas e farmacêuticas [MOLANDER e ELLIS 2007; DARSEES e STEFANI 2007].

Os compostos organoboros têm sido empregados em síntese orgânica, nos últimos anos, em que o alcance de tais processos tem sido expandido de forma significativa, particularmente na síntese assimétrica e catálise. Embora hidroboração assimétrica, alilboração assimétrica e a redução assimétrica de boro-hidreto estavam entre os primeiros processos assimétricos a serem desenvolvidos [BROWN 1992; COREY e HELAL 1998]. Essas reações

evoluíram para transformações muito valiosas, como a síntese enantiosseletiva e diastereosseletiva de várias moléculas, em especial alcoóis e aminas.

A reação de acoplamento de Suzuki-Miyaura representa uma das mais importantes transformações sintéticas desenvolvidas no século 20 [SUZUKI e BROWN 2005]. Seu uso é tão difundido que chega ser difícil encontrar um tema de qualquer revista em química orgânica sintética que não seja uma característica deste processo na construção de moléculas orgânicas. Como era de se imaginar, inúmeras melhorias no protocolo original foram registradas. Contribuições importantes incluem melhorias nos sistemas catalisador-ligante, solventes e as condições experimentais, por exemplo, o uso de micro-ondas, além do uso de compostos orgânicos de boro [LEADBEATER et al. 2006].

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2.1, percebeu-se que em condições aeróbias (ar), a concentração do álcool aumentou com o aumento do tempo reacional, levando a um processo de desracemização quase quantitativo com concentração do (*R*)-1-(4-metilfenil)etanol e excesso enantiomérico de 94% (entrada 4).

Observou-se que com 3 h de reação ocorreu uma elevada oxidação enantiosseletiva com concentração do (*R*)-1-(4-metilfenil)etanol de 56% e seletividade de 94% (entrada 1). Já as reações em 12 e 48 h conduziram resultados semelhantes (entradas 2 e 3), com a formação do (*R*)-álcool com 80% e 86% de conversões, respectivamente, e 94% de excesso enantiomérico para ambos os casos.

Teve-se uma surpresa ao realizar essa mesma reação sob condições anaeróbias (sistema saturado com N₂), pois quase nenhuma oxidação foi evidenciada, uma vez que se observaram baixas concentrações de cetona (4%) e excesso enantiomérico para o (*R*)-1-(4-metilfenil)etanol (2%, entrada 5).

Com isso, percebeu-se que a presença de O₂ é essencial para a oxidação enantiosseletiva do (*R*)-1-(4-metilfenil)etanol, pois se observou 44% de concentração da 4-metilacetofenona e um excesso enantiomérico de 96% para o *R*-álcool, com apenas 3 h de reação, sob condição aeróbia (sistema saturado O₂), (entrada 6).

No entanto, não se observou uma diferença significativa entre as duas condições aeróbias (sistemas saturados com O₂ ou sistemas de ar) (entradas 1 e 6). Ambas as reações apresentaram concentrações de cetonas semelhantes (46 e 44%, respectivamente), bem como os excessos enantioméricos do (*R*)-1-(4-metilfenil)etanol (96 e 94%, respectivamente).

Sendo assim, percebeu-se que apenas a presença de O₂ atmosférico na solução tampão foi suficiente para garantir a oxidação do álcool na reação desejada.

Baseado nesses resultados, pôde-se afirmar que a oxidorreductase produzida pela *Arthrobacter* sp., que foi responsável pela oxidação enantiosseletiva do (R,S)-1-(4-metilfenil)etanol, é dependente de O₂.

Percebeu-se que para todas as reações os excessos enantioméricos foram inferiores a 99%, o que poderia indicar a presença de outras oxidorreductases ativas para essas reações. De acordo com esses resultados, houve o questionamento se a reação de desracemização era catalisada por uma ou mais oxidorreductases, o que poderia levar a outros tipos de transformações mediadas por outras enzimas da *Arthrobacter* sp. CCT 7749

Com isso, decidiu-se testar a redução da 4-metilacetofenona catalisada por enzimas presentes nas células da *Arthrobacter* sp., uma vez que, uma das etapas no processo de desracemização é a redução da cetona produzida durante a reação. Para este estudo empregou-se o sistema em condições aeróbias e anaeróbias (Tabela 2.2).

Tabela 2.2: Redução enantiosseletiva da 4-metilacetofenona catalisada por oxidorreductase presentes em células da *Arthrobacter* sp. CCT 7749

Reação	Tempo (h)	Atmosfera	Cetona/Álcool (%) ^b	Álcool e.e. (%) ^c
1	3	Ar	97/3	>99 (S)
2	12	Ar	98/2	63 (S)
3	48	Ar	93/7	70 (S)
4	120	Ar	90/10	22 (S)
5	3	O ₂ concentrado	97/3	>99 (S)
6	3	N ₂	42/58	>99 (S)

^aCondições gerais: substrato (0,01 mmol, 40 µL de uma solução 0,25 mol/L em DMF), Células *Arthrobacter* sp. (164 mg), tampão fosfato pH 7,5 (2 ml), 20 °C, 400 rpm. ^bRazão foi determinada por cromatografia em fase gasosa (GC) ^cExcesso enantiomérico foi determinado por CG quiral.

De acordo com a Tabela 2 constatou-se resultados diferentes nas bio-reduções sob condições de N₂ e O₂ (entradas 6 e 5), em que a redução enantiosseletiva da 4-metilacetofenona, sob atmosfera de N₂, produziu 58% do (S)-1-(4-metilfenil)etanol com excesso enantiomérico >99%. Por outro lado, a reação saturada com O₂ mostrou baixa conversão, apesar do excesso enantiomérico do (S)-4-(metilfenil)etanol ter sido >99% (entrada 5). No entanto, não foi observada uma diferença significativa entre as reações com O₂ puro e atmosférico.

Observando as Tabelas 2.1 e 2.2 pôde-se perceber um aspecto notável, pois a biotransformação do (R,S)-1-(4-metilfenil)etanol favoreceu a formação do (R)-

1-(4-metilfenil)etanol (Tabela 2.1), enquanto a redução da 4-acetofenona, com o mesmo sistema enzimático, favoreceu a formação do (S)-1-(4-metilfenil)etanol (Tabela 2.2). Apesar das conversões terem sido baixas nas bio-reduções sob condições aeróbias (≤ 10 % em todos os casos), a formação do enantiômero oposto poderia explicar o excesso enantiomérico do (R)-1-(4-metilfenil)etanol ter sido 94% sob as mesmas condições de reação.

De acordo com esses resultados observou-se que a presença ou ausência de oxigênio desempenha um papel fundamental no tipo de reação que a *Arthrobacter* sp. CCT 7749 pode realizar. Com isso, percebeu-se que a oxidorreductase que catalisa a oxidação enantiosseletiva foi dependente de O₂, enquanto a outra oxidorreductase responsável por catalisar a redução enantiosseletiva não foi dependente de oxigênio molecular.

Com isso, vale ressaltar que a simples mudança na composição gasosa do sistema de reação pode levar a biotransformações enantiocomplementares.

De acordo com essas características das oxidorreductases presentes na *Arthrobacter* sp., decidiu-se realizar diferentes desracemizações de alcoóis contendo silício, fósforo, estanho e boro na presença de oxigênio (Figura 2.3, seção 2.5.2) ou redução enantiosseletiva de cetonas contendo esses heteroátomos, porém na ausência de oxigênio (Figura. 2.5, seção 2.5.3).

2.5.2. Desracemizações de alcoóis contendo heteroátomos catalisadas por oxidorreductases presentes em células da *Arthrobacter* sp. CCT 7749

Nesse estudo foram empregadas células da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 como fonte de oxidorreductase, sob condições aeróbias (ar), para catalisar as

desracemizações dos alcoóis **1b-g** (Figura 2.4, seção 2.7.3), conforme Tabela 2.3.

Tabela 2.3: Desracemização de alcoóis contendo heteroátomos catalisada por oxidoredutases presentes nas células da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 sob condições aeróbias^a

Reação	Álcool	Substituinte-Y	Substituinte-R ²	Tempo reacional (h)	Cetona/Álcool (%) ^b	e.e. (%) ^c
1	1b	<i>p</i> -SiMe ₃	Me	48	8/92	>99 (<i>R</i>)
2	1c	<i>m</i> -SiMe ₃	Me	48	8/92	96 (<i>R</i>)
3	1d	<i>o</i> -SiMe ₃	Me	48	0/100	0
4	1e	<i>p</i> -SiMe ₃	Et	48	4/96	41 (<i>R</i>)
5	1f	<i>m</i> -SiMe ₃	Et	48	3/97	26 (<i>R</i>)
6	1g	<i>o</i> -SiMe ₃	Et	48	0/100	0
7	1b	<i>p</i> -SiMe ₃	Me	120	3/97	96 (<i>R</i>)
8	1c	<i>m</i> -SiMe ₃	Me	120	6/94	96 (<i>R</i>)
9	1d	<i>o</i> -SiMe ₃	Me	120	0/100	0
10	1e	<i>p</i> -SiMe ₃	Et	120	4/96	38 (<i>R</i>)
11	1f	<i>m</i> -SiMe ₃	Et	120	2/98	14 (<i>R</i>)
12	1g	<i>o</i> -SiMe ₃	Et	120	0/100	0
13	4a	<i>p</i> -P(O)(OEt) ₂	Me	48	36/64	34 (<i>R</i>)
14	4b	<i>p</i> -SnBu ₃	Me	48	13/87	22 (+) ^d
15	4c	<i>p</i> -Bpin	Me	48	58/44	78 (<i>R</i>)
16	4a	<i>p</i> -P(O)(OEt) ₂	Me	120	32/68	28 (<i>R</i>)
17	4b	<i>p</i> -SnBu ₃	Me	120	6/94	6 (+) ^d
18	4c	<i>p</i> -Bpin	Me	120	44/56	83 (<i>R</i>)

^aCondições gerais: substrato (0,01 mmol, 40 µL de uma solução 0,25 mol/L em DMF), Células *Arthrobacter* sp. (184 mg), tampão fosfato pH 7,5 (2 mL), 20 °C, 400 rpm. ^bRazão foi determinada por cromatografia em fase gasosa (GC) ^cExcesso enantiomérico foi determinado por CG quiral. ^dSinal da rotação óptica ([α]_D²⁰) do enantiômero favorecido.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2.3 observou-se que nenhum dos alcoóis de silício *orto*-substituídos foi oxidado nessas condições reacionais (entradas 3, 6, 9 e 12). No entanto, percebeu-se resultados semelhantes para todas às reações contendo os alcoóis de silício nas posições *meta* e *para*, com concentrações de cetona de 2-8% e seletividade dos (*R*)-alcoóis de 14 até >99%. Observou-se que os melhores excessos enantioméricos foram para os alcoóis de silício *para*-substituídos (entradas 1, 4, 7 e 10), comparados aos análogos *meta*-substituídos (entradas 2, 5, 8 e 11).

Também foi comprovado que o aumento do tamanho da cadeia lateral ligada ao átomo de carbono quiral desempenhou um papel importante para os excessos enantioméricos dos demais (*R*)-alcoóis de silício substituídos. Por exemplo, enquanto que os alcoóis de silício *meta*-substituído contendo um grupo metila ligado ao átomo de carbono quiral (**1c**) foi desracemizado para produzir o (*R*)-álcool com 96% de excesso enantiomérico (entrada 2), o seu análogo (**1f**) contendo um grupo etila no átomo de carbono quiral foi desracemizado para o (*R*)-álcool com apenas 26% de seletividade (entrada 5) no mesmo tempo reacional.

Percebeu-se que o aumento no tempo reacional foi favorável somente para os alcoóis com o grupo etila ligado ao átomo de carbono quiral e que se observou um decréscimo nos excessos enantioméricos ao alterar o tempo reacional de 48 h (entradas 4 e 5) para 120 h (entradas 10 e 11). Este resultado poderia estar relacionado com outra reação favorecendo a formação do (*S*)-álcool ao mesmo tempo.

Os alcoóis contendo fósforo e estanho (**4a** e **4b**, respectivamente) apresentaram boas conversões (64 e 87%, respectivamente, entradas 13 e 14),

porém moderados excessos enantioméricos (34 e 22%). Como observado com os compostos de silício **1e** e **1f**, com 120 h de reação, houve pequena diminuição no excesso enantiomérico do (*R*)-álcool de fósforo, **4a** (28%, entrada 16) e uma significativa diminuição no excesso enantiomérico do (*R*)-álcool de estanho, **4b** (6%, entrada 17).

Por outro lado, o álcool de boro *para*-substituído (**4c**) mostrou melhores resultados quando comparado com os alcoóis de fósforo e estanho, em que foi alcançada, após 48 h, uma conversão de 44% e um excesso enantiomérico do (*R*)-álcool de 78% (entrada 15). Com 120 h de reação houve um aumento tanto da conversão quanto do excesso enantiomérico (56%, 83%, respectivamente; entrada 18).

Vale ressaltar que os alcoóis contendo silício e boro foram os mais apropriados para o processo de desracemização, catalisado por oxidorreduções da *Arthrobacter* sp., do que os alcoóis contendo estanho e fósforo. É evidente que diferentes fatores poderiam justificar esses resultados, mas do ponto de vista biocatalítico pôde-se apontar que a natureza do heteroátomo certamente teve um impacto na ação da oxidorredução em determinados grupos funcionais.

Também se realizou a desracemização desses alcoóis em escala preparativa, Tabela 2.4.

Tabela 2.4: Desracemização de alcoóis contendo silício, fósforo, estanho e boro em escala preparativa sob condições aeróbias^a.

Reação	Álcool	Rendimento Isolado % (e.e.%) ^b	
1	(<i>R,S</i>)- 1b	(<i>R</i>)- 1b , 59% (82)	2b , 36%
2	(<i>R,S</i>)- 4a	(<i>R</i>)- 4a , 59% (>99)	3a , 31%
3	(<i>R,S</i>)- 4b	(+)- 4b , 71% (42) ^c	3b , 26%
4	(<i>R,S</i>)- 4c	(<i>R</i>)- 4c , 59% (97) ^c	3c , 39%

^aCondições gerais: substrato (0,5 mmol, 40 μ L de uma solução 0,25 mol/L em DMF), Células *Arthrobacter* sp. (8,2 g), tampão fosfato pH 7,5 (100 ml), 20 °C, 400 rpm. ^bExcesso enantiomérico foi determinado por CG quiral. ^cExcesso enantiomérico foi determinado por CG quiral do correspondente acetato derivatizado.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2.4 observou-se que todas as reações foram mais lentas do que as realizadas em escala analítica. No entanto, foram obtidos bons rendimentos do alcoóis (59 e 71%) e elevados excessos enantioméricos, até >99% (entrada 2).

2.5.3. Redução enantiosseletiva de cetonas contendo heteroátomos catalisadas por oxidorredutases presentes em células da *Arthrobacter* sp. CCT 7749

Decidiu-se avaliar a atividade da oxidorredutase presente nas células da *Arthrobacter* sp., em condições anaeróbias, em reduções enantiosseletivas de

cetonas contendo heteroátomos de silício, fósforo, estanho e boro (cetonas **2b** e **3a-c**, Tabela 2.5), uma vez que essa enzima mostrou-se eficiente nos estudos iniciais de redução da 4-metilacetofenona, em condições anaeróbias 2.5.1.

Tabela 2.5: Redução enantiosseletiva de cetonas contendo heteroátomos catalisadas por oxidorreduções presentes em células da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 sob condições anaeróbias^a.

Reação	Cetona	Substituinte-Y	Tempo reacional (h)	Cetona/Álcool (%) ^b	e.e. álcool (%) ^c
1	2b	SiMe ₃	3	19/81	>99 (S)
2	3a	P(O)(OEt) ₂	3	11/89	>99 (S)
3	3b	SnBu ₃	3	100/0	-
4	3c	Bpin	3	77/23	>99 (S)
5	2a	SiMe ₃	24	4/96	>99 (S)
6	3a	P(O)(OEt) ₂	24	2/98	>99 (S)
7	3b	SnBu ₃	24	100/0	-
8	3c	Bpin	24	47/53	>99 (S)

^aCondições gerais: substrato (0,01 mmol, 40 µL de uma solução 0,25 mol/L em DMF), Células *Arthrobacter* sp. (328 mg), tampão fosfato pH 7,5 (2 mL), 20 °C, 400 rpm. ^bRazão foi determinada por cromatografia em fase gasosa (GC) ^c Excesso enantiomérico foi determinado por CG quiral. Configuração absoluta foram apresentadas entre parênteses.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2.5 obteve-se elevados excessos enantioméricos dos (S)-alcoóis (>99%) em todas as reduções contendo heteroátomos, em condições anaeróbias, exceto a 4-(tributilestanho)acetofenona (**3b**), em que não ocorreu a redução em 3 ou 24 h de reação (entradas 3 e 7). Isto poderia estar relacionado com a presença de

um grupo substituinte volumoso na cetona que possivelmente não se ajustou, de uma forma eficiente, no sítio ativo dessa oxidorredutase.

Observou-se que as cetonas contendo silício e fósforo foram eficientemente convertidas em seus correspondentes (S)-alcoóis com apenas 3 h de reação (entradas 1 e 2), sendo obtidas conversões de 81% para o (S)-álcool **1b** e 89% para o (S)-álcool **4a** e excessos enantioméricos >99% em ambos os casos. Percebeu-se que ao aumentar o tempo reacional para 24 h, as concentrações dos (S)-alcoóis também aumentaram (96 e 98%, respectivamente, entradas 5 e 6), com excessos >99% para ambos os alcoóis.

Por outro lado, a redução da cetona contendo o composto de boro foi moderadamente convertida ao seu correspondente (S)-álcool **4c** com 23% de conversão e excesso enantiomérico >99%, com apenas 3 h de reação (entrada 4). Com o aumento do tempo reacional para 24 h, houve um aumento na conversão do (S)-álcool para 53%, mantendo o excesso enantiomérico >99% (entrada 8).

De acordo com esses resultados, decidiu-se realizar a redução dessas cetonas catalisadas pela oxidorredutase presente nas células da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 em uma escala preparativa (Tabela 2.6).

Tabela 2.6: Redução enzimática de cetonas contendo heteroátomos de silício, fósforo e boro em escala preparativa, sob condições anaeróbias^a.

Reação	Cetona	Rendimento Isolado % (e.e.) ^b	
1	2b	(S)-1b, 82% (>99)	2b, 7%
2	3a	(S)-4a, 97% (>99)	3a, — ^d
3	3c	(S)-4c, 81% (>99) ^c	3c, 13%

^aCondições gerais: substrato (0,5 mmol), 40 µL de uma solução 0,25 mol/L em DMF), Células *Arthrobacter* sp. (16,4 g), tampão fosfato pH 7,5 (100 ml), 20 °C, 400 rpm, 120 h. ^bExcesso enantiomérico foi determinado por CG quiral. ^cExcesso enantiomérico foi determinado por CG quiral do correspondente acetato derivatizado. ^d Não foi detectado no GC nem após a purificação.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2.6 percebeu-se bons a elevados rendimentos dos (S)-alcoóis com significativos excessos enantioméricos (>99% em todos os casos).

2.6. Conclusões

Uma *Arthrobacter* sp. CCT 7749 isolada de sedimento marinho da Antártica foi utilizada com sucesso como biocatalisador promíscuo para várias desracemizações ou reduções enantiosseletivas de compostos contendo heteroátomos de silício, estanho, fósforo e boro. Nesse estudo foi-se capaz de realizar desracemização (*R*)-seletiva dos alcoóis ou redução (*S*)-seletiva das cetonas apenas alternando a composição gasosa do sistema de reação de aeróbia para anaeróbia, respectivamente.

O processo de desracemização foi realizado usando uma série de alcoóis racêmicos contendo silício. Os melhores resultados foram obtidos para os alcoóis contendo silício na posição *para* (**1b**), em que (*R*)-álcool foi obtido com 92% de conversão e e.e. >99%.

Também foi observado o processo de desracemização dos alcoóis racêmicos contendo fósforo, estanho e boro aos correspondentes (*R*)-alcoóis, em que foram conseguidas boas conversões (até 94%) e bons excessos enantioméricos (até 83%). Além da redução enantiosseletiva de cetonas contendo silício, fósforo e boro aos correspondentes (*S*)-alcoóis com boas a excelentes conversões (até 98%) e excelentes excessos enantioméricos (>99% em todos os casos).

As reações de desracemização realizadas em escala preparativa mostraram ser um protocolo eficiente para alcançar (*R*)-alcoóis de silício, fósforo, estanho e boro, com bons rendimentos e excessos enantioméricos (até >99%).

A redução enantiosseletiva de cetonas contendo silício, fósforo e boro foi ainda melhor do que o processo de desracemização, em que foram alcançados

bons a excelentes rendimentos (81-97%) e excelentes excessos enantioméricos (> 99% em todos os casos) para o (S) -álcool.

2.7. PARTE EXPERIMENTAL

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Química Fina e Biocatálise (LQFB) do Instituto de Química- Universidade de São Paulo (IQ-USP)- São Paulo.

2.7.1. SOLVENTES E REAGENTES

Os reagentes e solventes utilizados no desenvolvimento dos trabalhos dos capítulos 2 e 3 estão representados na Tabela 2.7.

Tabela 2.7: Relação dos reagentes e solventes utilizados nesse trabalho com as respectivas procedências e grau de pureza.

Reagentes	Procedência	Pureza (%)
Ácido acético	Vetec	P.A
Ágar	Oxoid	-
Acetofenona	Aldrich	98
Ácido dietileno-triamina-pentacético	Aldrich	99
Acrilamida	Aldrich	>99
Azul de nitro-tetrazólio	Aldrich	-
Bisacrilamida	Aldrich	>98,5
Borohidreto de sódio	Aldrich	P.A
Carbonato de sódio	Synth	99,5
Cloreto de amônio	Synth	P.A
Clorofórmio	Fmgold	99,8
Éter metil <i>terc</i> -butilico	Aldrich	>98
Diclorometano	Synth	99,5
Dextrose	Oxoid	-
Dodecilsulfato de sódio	Aldrich	98,5

Tabela 2.7 continuação

Reagentes	Procedência	Pureza (%)
Extrato de carne	Oxoid	-
Fosfato de sódio dibásico	Synth	99
Fosfato de Potássio monobásico	Merck	99,5
Fosfato de potássio dibásico	Merck	98
Fenil-metano(sulfonil)fluoreto	Aldrich	-
Glicina	Aldrich	>99
Metanol	Qhemis	P.A
<i>N,N,N,N'</i> -tetrametiletilenediamina	Aldrich	99
Nitrato de prata	Acros	-
Peptona	Oxoid	-
Propanona	Qhemis	P.A
Sulfato de amônio	Aldrich	≥99
Sulfato de magnésio	Merck	99,5
Reagente de Bradford	Aldrich	-
Trizma	Aldrich	>99,9

2.7.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.7.2.1. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS QUE FORAM UTILIZADOS

Os materiais e equipamentos que estão listados abaixo foram empregados na metodologia desenvolvida nos capítulos 2 e/ou 3.

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

(ARMAREGO, 1996);

- Capela de fluxo laminar Fisher Hamilton *Class II Biological Safety Cabinet*.
- Placas de cromatografia em camada delgada (folhas de alumínio 60 F₂₅₄ Merck);
- Autoclave Vertical Phoenix para esterilização de matérias e vidrarias;
- Incubadora refrigerada com agitação Tecnal TE-421;
- Sílica (230-400 mesh) para cromatografia em coluna;
- Espectrofotômetro BIOSPECTRO - modelo SP-220.
- Microscópio TECNAL – modelo Bell photonics.
- Centrífuga HERMLE- modelo Z200A.
- Centrífuga EPPENDORF- modelo 5810 R
- Agitador de tubos PHOENIX- modelo AP 56
- Agitador de tubos EPPENDORF- modelo Thermomixer comfort
- French Press Cell Press – modelo Sim Aminco
- Ultra-turrax- modelo T 25 basic IKA-Werke)
- Ultrassom- modelo Branson Digital Sonifier, modelo 250
- AKTA Purifier- GE Healthcare- UPC 900
- Infors HT Ecotron Shaking Incubator

2.7.3. DESRACEMIZAÇÃO E REDUÇÃO ENANTIOSSELETIVAS DE COMPOSTOS DE SILÍCIO, ESTANHO, FÓSFORO E BORO CATALISADA POR OXIDORREDUTASE EM CÉLULAS ÍNTEGRAS DA ARTHROBACTER SP. CCT 7749

Este trabalho foi realizado em colaboração com o aluno de doutorado

Dayvson José Palmeira de Sousa (IQ-USP), em que o mesmo sintetizou e caracterizou os alcoóis e cetonas empregados nos ensaios enzimáticos [PALMEIRA et al. 2011], além de participar ativamente desses ensaios.

A Figura 2.1 mostra os alcoóis empregados nas reações de desracemização e a Figura 2.2 mostra as cetonas usadas nas reduções enantiosseletivas.

Figura 2.1: Alcoóis selecionados para as reações de desracemização

Figura 2.2: Cetonas selecionadas para as reduções enantiosseletivas.

2.7.4. ISOLAMENTO INDUZIDO DA *ARTHROBACTER* SP

A *Arthrobacter* sp., contendo uma oxidoredutase ativa, utilizada no presente estudo foi isolada a partir de amostras de sedimento marinho coletadas na Península Antártica (Baía do Almirantado, Ilha Rei Jorge, Antártica em 2008). Amostras de diferentes ambientes foram colocadas no meio de cultura MCBE7 contendo um composto orgânico (*R,S*)-1-feniletanol como fonte de carbono [ARAÚJO 2010].

2.7.5. CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DA *ARTHROBACTER* SP.

Para este propósito contou-se com o apoio do grupo de pesquisa da Professora Dr^a. Vivian Pellizari do Instituto de Oceanografia da Universidade de São Paulo (IO-USP).

A identificação taxonômica da bactéria foi realizada através de sequenciamento do gene 16S do DNA ribossomal [ARAÚJO et al. 2011].

2.7.6. MEIOS DE CULTURA

- *MCBE7* (pH = 7,0) = (*R,S*)-1-(fenil)-etanol (1 mmol, 0,122 g, 122 mL), K₂HPO₄ (0,2%, 2,0 g), KH₂PO₄ (0,1%, 1,0 g) , MgSO₄.7H₂O (0,04%, 0,4 g), NH₄Cl (0,04%, 0,4 g), extrato de carne (Oxoid) (0,025%, 0,25 g), peptona (Oxoid) (0,025%, 0,25 g), agar (Oxoid) (2,0%, 20,0 g, quando necessário).
- *Caldo Nutriente (NB)* = 3,0 g Extrato de carne (Oxoid) e 5,0 g de peptona bacteriológica (Oxoid) suplementado com (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol (100 mmol / L).

As quantidades dos reagentes são indicadas por litro de água destilada.

2.7.6.1. PRÉ-INÓCULO: ATIVAÇÃO DA *ARTHROBACTER* SP.

Transferiu-se a *Arthrobacter* sp. CCT 7749 do meio de cultura sólido ao meio de cultura líquido (MCBE7), com o auxílio de uma alça de platina, e adicionou-se a solução do indutor [(*R,S*)-1-(fenil)etanol- 100 mmol/L]. Incubou-se por 48 h a 20°C sob agitação orbital, 160 rpm.

2.7.6.2. INÓCULO: CRESCIMENTO DA *ARTHROBACTER* SP. CCT 7749 PARA OBTENÇÃO DE MASSA CELULAR

Transferiu-se 100 mL do pré-inóculo a um frasco Erlenmeyer de 2 L contendo 1 L de meio de cultura NB e adicionou-se 10 mL da solução do indutor [(*R,S*)-1-(fenil)etanol, 100 mmol/L]. Incubou-se por 48 h a 20 °C sob agitação orbital, 160 rpm.

2.7.6.3. CENTRIFUGAÇÃO: SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS DA *ARTHROBACTER* SP. CCT 7749

O meio de cultura contendo as células (1000 mL) foi centrifugado a 5000 rpm (10 °C por 20 minutos). Durante a centrifugação houve a formação de uma massa celular que ficou depositada no fundo do tubo da centrífuga, o sobrenadante foi descartado e as células foram usadas nos ensaios subsequentes.

2.7.6.4. REAÇÕES DE OXIDAÇÃO E REDUÇÃO ENANTIOSSELETIVAS EM CONDIÇÕES AERÓBIAS

Os substratos (40 μ L de uma solução 0,25 mol/L em DMF) foram adicionados, sob condições estéreis, em microplaca de polipropileno (24 poços, volume individual de 10 mL) contendo 164 mg de células úmidas suspensas em 2 mL de solução tampão fosfato (pH 7,0; 100 mmol/L) à 20 °C e 400 rpm (agitador orbital), sob ar ou O₂ concentrado em diferentes tempos reacionais.

Após o término da reação, adicionou-se éter metil *tert*-butilíco (2 mL) a cada poço da microplaca e a mistura de reação foi extraída por agitação (tubo falcon 15 mL), seguida por centrifugação (6000 rpm, 1 min). Transferiu-se 1 mL da fase orgânica a um frasco de vidro (2 mL) para análise em cromatografia gasosa (ver Seção 2.7.6.9).

2.7.6.5. REAÇÕES DE OXIDAÇÃO E REDUÇÃO ENANTIOSSELETIVAS EM CONDIÇÕES ANAERÓBIAS

Adicionaram-se 328 mg de células úmidas, suspensas em 2 mL de solução tampão fosfato (pH 7,0; 100 mmol/L), em um tubo de vidro esterilizado e selado, em que a atmosfera de gás do recipiente foi saturada com N₂ durante 1 h antes da reação. Em seguida, o substrato (40 μ L de uma solução 0,25 mol/L em DMF) foi adicionado e a reação foi realizada à temperatura ambiente, 700 rpm (agitador orbital), atmosfera de N₂ em diferentes tempos reacionais. A mistura de reação foi extraída por agitação com éter metil *tert*-butilíco (2 mL), seguido por centrifugação (6000 rpm, 1 min). Transferiu-se 1 mL da fase orgânica a um frasco de vidro (2 mL) para análise em cromatografia gasosa

(ver Seção 2.7.6.9).

2.7.6.6. REAÇÕES EM ESCALA PREPARATIVA

As células bacterianas foram obtidas da mesma maneira como descrito na Seção 2.7.6.

2.7.6.7. REAÇÃO DE DESRACEMIZAÇÃO EM CONDIÇÕES AERÓBIAS

O álcool racêmico apropriado (0,5 mmol) diluído em dimetilformamida (2 mL) foi adicionado, sob condições estéreis, em um frasco Erlenmeyer (500 mL) contendo 8,2 g de células microbianas suspensas em 100 mL de solução tampão fosfato (pH 7,0; 100 mmol/L) à 20 ° C e 400 rpm (shaker), durante 120 h. A mistura da reação foi extraída usando um aparelho de extração contínua líquido-líquido com diclorometano como solvente (300 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO_4 e o solvente evaporado sob pressão reduzida. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna, utilizando *n*-hexano/acetato de etila como eluente.

2.7.6.8. REAÇÃO DE REDUÇÃO ENANTIOSSELETIVA EM CONDIÇÕES ANAERÓBIAS

Adicionaram-se 16,4 g de células microbianas, suspensas em 2 mL de solução tampão fosfato (pH 7,0; 100 mmol/L), em um balão de fundo redondo (500 mL) esterilizado e selado, em que a atmosfera de gás do recipiente foi saturada com N_2 durante 1 h antes da reação. Em seguida, a cetona apropriada (0,5 mmol) diluída em dimetilformamida (2 mL) foi adicionada em

condições estéreis e a reação foi realizada à temperatura ambiente, a 700 rpm (agitador orbital), atmosfera de N₂, durante 120 h. A mistura da reação foi extraída usando um aparelho de extração contínua líquido-líquido com diclorometano como solvente (300 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄ e o solvente evaporado sob pressão reduzida. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna, utilizando *n*-hexano/acetato de etila como eluente.

2.7.6.9. AVALIAÇÃO DAS REAÇÕES BIOCATALÍTICAS

Os excessos enantioméricos (e.e.) dos alcoóis quirais e seus derivados (forma acetilada) foram medidos por análise em GC quiral. A análise foi realizada em uma coluna de β -ciclodextrina (25 m x 0,32 mm x 0,25 μ m, Varian CP-Chirasil-DEX CB).

Condições GC (gás de arraste H₂, 167 kPa): injetor de 220 ° C; detector 220 ° C.

Isotérmicas e tempo de retenção (*t_R*) dos compostos:

- 4-metil-acetofenona (**2a**): 115 °C, *t_R* = 1,65 min
- 4-acetilfeniltrimetilsilano (**2b**): 128 °C, *t_R* = 4,50 min
- Dietil-(4-metilfenil)fosfonato (**3a**): 160 °C, *t_R* = 10,34 min
- 4-acetilfeniltributilestanana (**3b**): 180 °C, *t_R* = 16,51 min
- 1-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)etanona (**3c**): 160 °C, *t_R* = 5,92 min
- (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol (**1a**): 115 °C, *t_R* = 2,44 min para (*R*) e 2,69 min para (*S*)

- (*R,S*)-1-(4-trimetilsilil-fenil)etanol (**1b**): 128 °C, t_R = 7,01 min para (*R*) e 7,47 min para (*S*)
- (*R,S*)-Dietil 4-(1-hidroxietil)-fenil-fosfonato (**4a**): 160 °C, t_R = 22,24 min para (*R*) e 23,12 min para (*S*)
- (*R,S*)-1-[4-(tributilestanil)fenil]etanol (**4b**) (forma acetilada): 180 °C, t_R = 18,36 min para (–) e 19,25 min para (+)
- 1-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]etanol (**4c**) (forma acetilada): 160 °C, t_R = 9,12 min para (*R*) e 8,69 min para (*S*).

O excesso enantiomérico foi definido como a proporção de $\{(|[R] - [S]|) / ([R] + [S])\} \times 100\%$, onde $[R]$ e $[S]$ são as concentrações dos enantiômeros (*R*) e (*S*), respectivamente.

2.7.6.10. CONFIGURAÇÃO ABSOLUTA

A configuração absoluta dos (*R*)- ou (*S*)-alcoóis contendo silício e boro foram determinadas por comparação entre os sinais das rotações específicas medidas como descritos na literatura [ANDRADE, BARCELLOS 2009; BARCELLOS et al. 2011; PALMEIRA et al. 2011].

A configuração absoluta dos (*R*)- ou (*S*)-alcoóis contendo fósforo foram determinadas por derivatização dos (1-(4-bromofenil)etoxi)trimetilsilano enantiopuro apropriada usando a mesma metodologia como descrito na seção 2.7.6.9 e na literatura [PALMEIRA et al. 2011].

2.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXAKIS, A.; BÄCKVALL, J. E.; KRAUSE, N.; PÀMIES, O. DIÉGUEZ, M. Enantioselective Copper-Catalyzed Conjugate Addition and Allylic Substitution Reactions. *Chemical Review* **2008**, *108*, 2796-2823.
- ANDRADE, L. H.; BARCELLOS, T. *Organic Letters* **2009**, *11*, 3052–3055.
- ARAÚJO, L. S.; KAGOHARA, E.; GARCIA, T. P.; PELLIZARI, V. H; ANDRADE, L. H. Screening of Microorganisms Producing Cold-Active Oxidoreductases to Be Applied in Enantioselective Alcohol Oxidation. An Antarctic Survey *Marine Drugs* **2011**, *9*, 889-905.
- ARAÚJO, L. S. Busca de álcool desidrogenases para aplicação em oxidação enantiosseletiva de alcoóis. Dissertação de Mestrado em Química, Instituto de Química, Universidade de São Paulo. São Paulo, **2010**.
- BARCELLOS, T.; TAUBER, K.; KROUTIL, W.; ANDRADE, L. H. Stereocomplementary asymmetric bioreduction of boron-containing ketones mediated by alcohol dehydrogenases. *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 1772-1777.
- BERTRAND, S.; BOHNI, N.; SCHNEE, S.; SCHUMPP O.; GINDRO, K.; WOLFENDER, J. L. Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnology Advances* **2014**, *Article in press*
- BHATTACHARYA, A. K.; THYAGARAJAN, G.; Michaelis-Arbuzov rearrangement. *Chemical Review* **1981**, *81*(4), 415–430.
- BLUNDEN, S. J.; EVANS, C. J. The Handbook of Environmental Chemistry; Hutzinger, O., ed.; Springer-Verlag: Berlim, **1990**, vol. 3.
- BORNER, A. Phosphorus Ligands in Asymmetric Catalysis: Wiley- VCH: Weinheim, **2008**.
- BRINCKMAN, F. E.; BELLAMA, J. M. Organometals and Organometalloids Occurrence and Fate in the Environment, *Journal of the American Chemical Society* **1978**, *82*, 388–422.
- BROOK, M. A. Silicon in Organic, Organometallic and Polymer Chemistry, Wiley Interscience, New York, **2000**.
- BROWN, H. C.; RAMACHANDRAN, P. V. Asymmetric reduction with chiral organoboranes based on alpha-pinene *Accounts of Chemical Research* **1992**, *25*, 16-24.
- BROWN H. C., Organic Synthesis via Boranes 1975 (Wiley: New York, NY). Hall D. G., Boronic Acids: Preparation, Applications in Organic Synthesis and Medicine **2005**, p. 549 (Wiley-VCH: Weinheim).
- CAVICCHIOLI, R.; SIDDIQUI, K.S.; ANDREWS, D.; SOWERS, K.R. Low-temperature extremophiles and their applications. *Current Opinion in Biotechnology* **2002**, *13*, 253–261.

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 *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37*, 1986-2012.

DIÉGUEZ, M.; PÀMIES O.; CLAVER, C. Recent advances in Rh-catalyzed asymmetric hydroformylation using phosphite ligands. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2113-2122.

ENGLEBIENNE, P. The Place of the Bioisosteric Sila-Substitution in Drug Design *Drug Design Reviews-Online* **2005**, *2*, 467-483.

FLEMING, I.; DUNOGUÈS, J.; SMITHERS, R. Organic Reactions (Ed.: A. S. Kende), Wiley, New York, **1989**, 37.

FIROUZABAD, H.; IRANPOOR, N.; GHADERI, A.; GHOLINEJAD, M.; RAHIMI, S.; JOKAR S. Design and synthesis of a new phosphinitefunctionalized clay composite for the stabilization of palladium nanoparticles. Application as a recoverable catalyst for C-C bond formation reactions. *RSC Advances* **2014**, *4*, 27674-27682.

GIELEN, M.; TIEKINK, E. R. T. Metallotherapeutic Drugs and Metal-based Diagnostic Agents: the Use of Metals in Medicine, John Wiley & Sons, Ltd. **2005**, p. 421.

GODOI A. F. L.; FAVORETO, R.; SANTIAGO-SILVA, M. Contaminação ambiental por compostos organoestânicos. *Química Nova* **2003**, *26*(5), 708-716.

ISHIGE, T.; HONDA, K.; SHIMIZU, S. Whole organism biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology* **2005**, *9*, 174-180.

LANGKOPF, E.; SCHINZER, D. Uses of Silicon-Containing Compounds in the Synthesis of Natural Products. *Chemical Reviews* **1995**, *95*, 1375-1408.

LEADBEATER, N. E.; ARVELA, R. K.; MACK, T. L.; KORMOS, C. M. Microwave-Promoted Suzuki Coupling Reactions with Organotrifluoroborates in Water Using Ultra-Low Catalyst Loadings. *Tetrahedron Letters* **2006**, *2*, 217-220.

LEUNG, D.; ABBENANTE, G.; FAIRLIE, D. P. Protease Inhibitors: Current Status and Future Prospects *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *43*, 305-341.

MEANWELL, N. A. Synopsis of Some Recent Tactical Application of Bioisosteres in Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54*, 2529- 2591.

MOLANDER, G. A.; ELLIS, N. Expanding the Versatility of the Suzuki Coupling Reaction *Accounts of Chemical Research* **2007**, *40*, 275-286. RUSSELL, N. J. Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophiles* **2000**, *4*, 83-90.

NAIR, N. U.; ZHAO, H. "Selective Reduction of Xylose to Xylitol from a Mixture of Hemicellulosic Sugars." *Metabolic Engineering* **2010**, *12*, 462-468.

- PALMEIRA, D. J.; ABREU, J. C. ANDRADE, L. H. Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution of Aryltrimethylsilyl Chiral Alcohols. *Molecules* **2011**, *16*, 9697-9713.
- PEREIRA, M. M.; CALVETE, M. J.; CARRILHO, R. M.; ABREU, A. R. Synthesis of binaphthyl based phosphine and phosphite ligands. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*(16), 6990-7027.
- RAJSKI, R. S.; WILLIAMS, R. M.; DNA Cross-Linking Agents as Antitumor Drugs. *Chemical Review* **1998**, *98*(8), 2733-2796.
- SARAFIAN, T.A.; SIGEL, A.; SIGEL, H. Metal Ions in Biological Systems, Marcel Dekker, New York **1999**, *36*, 415–444.
- SCHUBERT, U. S.; WEIDL, C. H.; LEHN, J. M. Synthesis of doubly functionalized bis-tridentate ligands as building blocks for extended metallo-supramolecular assemblies and polymers. *Designed Monomers and Polymers* **1999**, *2*(1), 1-17.
- STEFANI, H. A.; CELLA, R.; VIEIRA, A. S. Recent advances in organotrifluoroborates chemistry. *Tetrahedron* **2007**, *63*(18), 3623-3658.
- SUZUKI, A.; BROWN, H. C. Organic Synthesis via Boranes; Aldrich Chemical Co.: Milwaukee, WI, **2002**; Vol. 3.
- WEBER, W. P. Silicon Reagents for Organic Synthesis; Springer-Verlag: New York, **1983**.

Capítulo 3

3. Purificação da Oxidorredutase da *Arthrobacter* sp.

Decidiu-se purificar uma oxidorredutase presente na *Arthrobacter* sp. CCT 7749 baseado no seu potencial biocatalítico, como mostrado no capítulo 2. Outro fator determinante para este estudo foi o número pequeno de relatos de purificação de oxidorredutases obtidas de bactérias psicrófilas, em que o seu isolamento ocorreu diretamente do micro-organismo sem passar por processos de engenharia bioquímica, uma vez que esse estudo necessitaria de condições especiais.

3.1. PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

O nível de purificação de uma proteína depende primariamente do uso a que se destina. Sendo assim, purificação destinada a estudos acadêmicos são geralmente extensivas e somente pequenas quantidades de proteínas ativas são necessárias; nestes casos custo e tempo têm importância secundária. Já proteínas utilizadas em aplicações industriais, como na indústria de alimentos e detergentes, são obtidas em grandes quantidades e a pureza é considerada secundária quando comparada aos custos. Por outro lado, para aplicações terapêuticas, alta pureza é fundamental, obtendo-se quantidades relativamente pequenas [LIMA 2001; KARP 2005].

A purificação de proteína é dependente do número de etapas empregadas no processo e do uso do produto final. Perde-se atividade em cada etapa de purificação, por isso, para aumentar o rendimento, um número mínimo de etapas deve ser efetuado [LIMA 2001; KARP 2005].

A escolha das técnicas a serem empregadas está vinculada às propriedades moleculares inerentes a cada proteína; sendo assim, a combinação correta de várias etapas que exploram estas propriedades permitirá a purificação a partir de uma mistura. Inicialmente, quase sempre, é desejável reduzir o volume, e para isto é frequentemente utilizada a precipitação fracionada com sais ou solventes orgânicos. Posteriormente são utilizadas técnicas que exploram interações eletrostáticas, como por exemplo cromatografia de troca iônica e para as etapas finais o objetivo, quase sempre, é um aumento de resolução, e para isso se utiliza técnica de cromatografia em gel e cromatografia por afinidade. Frequentemente são necessários vários testes do tipo tentativa e erro para se estabelecer as condições ideais e o método mais efetivo para o rendimento e o número de etapas para a purificação almejada [LIMA 2001; KARP 2005].

A primeira etapa da purificação é a obtenção de um extrato (extrato bruto) contendo a enzima na forma solúvel. Sua preparação dependerá se a proteína de interesse é extra ou intracelular. Para uma proteína extracelular as células devem ser removidas para as etapas subsequentes, no entanto, deve-se ter o cuidado para não lisar as células, o que poderia causar uma contaminação desnecessária. Já para as proteínas intracelulares existe necessidade do rompimento celular e para isso, algumas vezes, faz-se necessário um pré-

tratamento, como remoção de gorduras ou homogenizar o tecido [LIMA 2001; NEVES 2003; KARP 2005].

Os principais métodos utilizados para o rompimento celular são apresentados no item 3.1.1.

3.1.1. MÉTODOS EMPREGADOS NO ROMPIMENTO CELULAR

3.1.1.1. Agitação com abrasivos

O moinho de bolas é utilizado para romper células microbianas, fungos filamentosos e microalgas, o qual é constituído por uma câmara cilíndrica fechada, horizontal ou vertical, um sistema de refrigeração e um eixo que gira em alta rotação. Nessa câmara são adicionadas esferas de vidro e células em suspensão. Ao longo do eixo de rotação estão distribuídos um ou mais discos ou hastes que giram em alta velocidade e provocam atrito entre as esferas e as células intactas e causam rompimento celular. O rompimento ocorre devido à força de cisalhamento aplicada pelas esferas de vidro contra a parede celular das células. As condições de rompimento nesse equipamento são facilmente controláveis e a eficiência do processo depende da geometria da câmara de rompimento, do tipo de agitador, do tamanho das esferas, concentração celular, velocidade de alimentação e da temperatura [FONSECA 2002].

As câmaras horizontais são mais eficientes porque comportam maiores cargas de esferas e abrigam mais esferas de diâmetros reduzidos. Nas câmaras verticais a vazão de fluido é na direção ascendente e ocorre a fluidização das esferas. As esferas devem ocupar entre 80 e 85% do volume da câmara horizontal e entre 50 e 60% se a câmara for vertical [FONSECA 2002].

A velocidade do agitador influencia o número de contato entre as células e as esferas e quanto maior a velocidade de rotação, mais rápido é o rompimento celular. O tipo de agitador também influencia a eficiência de rompimento. Os agitadores podem estar dispostos no eixo central ou fora dele, perpendicular ou oblíquo. Para auxiliar na agitação eles podem conter fendas, pequenos cortes ou furos [FONSECA 2002].

O material mais utilizado nas esferas é o vidro, mas também são usados materiais como o aço, inox e a cerâmica [NUMANOGLU, SUNGUR 2004].

A fração de células rompidas diminui com o aumento do fluxo de alimentação do moinho, pois diminui o tempo de residência no rompedor. O fluxo ótimo de alimentação depende da velocidade do agitador, da carga das esferas, da geometria do equipamento e das propriedades do micro-organismo [MEDEIROS 2008].

As temperaturas de operação em processos de rompimento celular devem ser controladas para prevenir a destruição da biomolécula-alvo. Neste processo é liberada grande quantidade de calor [MEDEIROS 2008].

Usa-se também o Dyno-Mill que é um moinho de bolas com recipiente de moagem horizontal para melhor ruptura celular em um sistema completamente fechado, trabalhando de forma contínua e descontínua. Nesse processo há geração de calor, sendo assim, o aparelho deve trabalhar em câmara fria ou refrigerada com água fria, através de uma camisa. Essa técnica é adequada para micro-organismos que oferecem resistência ao rompimento por outros métodos, sendo particularmente eficaz no caso de fungos filamentosos [REHACEK, SCHAEFER 2003].

3.1.1.2. Através de “mixers” e liquidificadores

Aparelho feito de aço inoxidável para facilitar o congelamento e assim minimizar o aquecimento gerado pelo atrito e pelo próprio motor. Órgãos e tecidos animais são homogeneizados facilmente com esses aparelhos, que não são adequados para rompimento de células microbianas. Dependendo das células, até mesmo algumas bactérias são susceptíveis ao tratamento com aparelhos do tipo “polytron”, que munidos de uma haste de aço inoxidável com uma grade na ponta, trabalham em altas velocidades, provocando efeitos de cisalhamento e impacto das células entre as lâminas e a grade [LIMA 2001; KARP 2005].

3.1.1.3. Congelamento e descongelamento

Nesse processo há a formação intracelular de grandes cristais de gelo que podem perfurar a célula e provocar seu total rompimento ou lesioná-la a ponto de formar poros permeáveis à biomolécula-alvo. Os fatores que influenciam nesse processo são o tipo e a idade da célula, temperatura e velocidade dos ciclos de congelamento/descongelamento. Este método é simples e indicado para o rompimento de patógenos, mas é um processo demorado, de custo elevado e inadequado para biomoléculas sensíveis ao congelamento [GEIGES 1996].

3.1.1.4. Homogeneizador ultrassônico

É o método mais utilizado em escala de laboratório e ocorre quando ondas sonoras, com frequência da ordem de 20 kHz, são convertidas em vibrações.

Essas vibrações formam bolhas muito pequenas que ao se chocarem geram ondas de choque que circulam pelo meio líquido e resulta em impacto e aumento da tensão de cisalhamento, com consequente rompimento celular.

3.1.1.5. Ultrassom

O rompimento ultrassônico tem sido aplicado em diversos processos de separação, seja como uma etapa de pré-tratamento ou como processo integral. As ondas ultrassônicas são aquelas cuja frequência está por volta de 16 Hz. A maior parte das ondas ultrassônicas é dissipada no sistema líquido através de bolhas de cavitação, as quais formam uma espécie de campo, onde ocorre aumento de massa e consequente transferência de calor para o meio líquido, produzindo um gradiente de velocidade e a criação de uma força capaz de romper as células e liberar as enzimas [BOSSIO et al. 2008].

O uso do ultrassom para o rompimento em larga escala é inviável, pois é necessário utilizar grande quantidade de sondas dispostas em série e instalar um eficiente sistema de refrigeração [FONSECA 2002; NEVES 2003].

3.1.1.6. Choque osmótico

Enzimas podem ser liberadas de plantas, células animais e bactérias Gram negativas, utilizando-se esta técnica, que é bastante apropriada para enzimas localizadas na região periplástica. As células são recolhidas do meio de cultivo por centrifugação e suspensas em solução tamponada contendo 20% de sacarose. Após o equilíbrio (cerca de 30 minutos), centrifuga-se novamente e ressuspende-se os sedimentos celulares em água pura a 4° C. Utilizando-se

essa técnica, quando possível, evitam-se etapas adicionais de purificação, porque o extrato resultante tem pouca contaminação. Esse método não é adequado para bactérias gram positivas, porque essas bactérias têm alta pressão osmótica interna [CHARM, MATTEO 1971; LIMA 2001; KARP 2005].

3.1.1.7. Tratamento alcalino

Os compostos alcalinos mais utilizados são amônia e hidróxido de sódio, porque causam inativação de patógenos ou micro-organismos geneticamente modificados durante o rompimento.

Quando a proteína desejada é estável em pH alcalino (em torno de 11), esse método torna-se adequado, devido ao baixo custo. Além disso, as proteases são rapidamente inativadas, também ocorrendo à eliminação de pirogênio. O primeiro passo depois de recolher as células por centrifugação é elevar o pH para 11,5 com NaOH e esperar por 30 minutos, depois disso, reduz-se o pH para 6,5 com ácido acético e centrifuga-se novamente. A geração de poluentes é a principal desvantagem no uso de álcalis em rompimento celular [WISEMAN 1985; LIMA 2001; KARP 2005].

3.1.1.8. Uso de detergentes e solventes

Os detergentes agem dissolvendo a membrana celular e assim liberam os componentes intracelulares. São frequentemente utilizados sais biliares, laurilsulfato de sódio, dodecilsulfato de sódio (SDS) e triton. Sua ação é muito dependente do pH e temperatura, motivo pelos quais cuidados redobrados

devem ser tomados com respeito a desnaturação e precipitação [NEVES 2003].

Os solventes podem ser empregados como desidratantes químicos das células. Esse procedimento é indicado só para biomoléculas que não sejam desnaturadas na presença do solvente empregado. O tratamento das células com solvente, como acetona que inicia e estimula a autólise, pode ser utilizado para obtenção do extrato bruto, a partir do autolisado de leveduras [NUMAGOGLU, SUNGUR 2004].

3.1.1.9. *Enzimas hidrolíticas de parede*

É um método suave e seletivo para o rompimento de paredes celulares. Como o custo dessas enzimas é relativamente alto, seu uso se limita a pequena escala. Dentre as enzimas mais utilizadas estão: tripsina, neuroaminidase e lisozima. Esta última, a mais utilizada e que catalisa a hidrólise de ligações β -1-4-glicosídicas da parede de bactérias Gram positivas [WISEMAN 1985; LIMA 2001; KARP 2005].

As bactérias Gram negativas podem ser tratadas com EDTA para aumentar a susceptibilidade à lisozima. Existem preparados comerciais de enzimas líticas apropriadas ao uso com leveduras e fungos filamentosos, tais como preparadas pelas Novozymes. As desvantagens desse tipo de tratamento é o relativo alto custo e o fato dessas enzimas terem de ser removidas posteriormente [WISEMAN 1985; LIMA 2001; KARP 2005].

3.1.1.10. Homogeneizador a alta pressão

É o método mais utilizado para a lise celular e é adaptado às indústrias de laticínios. Esse tipo de rompimento provoca aumento da temperatura do meio. O calor gerado no processo pode aumentar a temperatura da suspensão em 1,5 °C para cada 1000 psi de pressão de operação. Esse homogeneizador é constituído por pistões projetados para aplicar altas pressões, forçando a passagem da suspensão celular por um orifício estreito seguido de colisão contra uma superfície rígida e imóvel em uma câmara à pressão atmosférica, ou colisão contra um segundo fluxo sob pressão elevada. A redução instantânea da pressão associada ao impacto provoca o rompimento celular sem danificar biomoléculas. O rompimento das células ocorre de acordo com fatores que atuam simultaneamente sobre as células, como cavitação, turbulência e cisalhamento [CHISTI, YOUNG 1986; NAGLAK et al. 1990].

3.1.1.11. Termólise

Nessa técnica a suspensão celular pode ser aquecida em banho termostatzado, com injeção de vapor direto, em tambor rotativo ou em spray-drier. Método utilizado no rompimento de algas, fungos filamentosos, leveduras e bactérias destinadas à produção de proteína. Este método gera fragmentos celulares com maiores dimensões e facilmente removíveis por filtração ou centrifugação [HEDENSKOG, MOGREN 1973].

3.1.1.12. Ultra-turrax

A ruptura da parede celular empregando o ultra-turrax pode ocorrer devido à elevada velocidade de rotação do rotor, em que a substância a ser processada é automaticamente aspirada axialmente para dentro de um cabeçote de dispersão e, em seguida, espremida radialmente pelas aberturas do conjunto rotor/estator. Devido às elevadas forças de aceleração, o material fica exposto às forças de cisalhamento muito grandes. Na fenda de cisalhamento entre o rotor e o estator surgem adicionalmente fortes turbulências que garantem a perfeita mistura da solução.

3.2. TÉCNICAS DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Entre os métodos modernos de purificação de proteínas, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido à facilidade com que efetua separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como a espectrofotometria ou a espectrometria de massas.

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases, de tal forma, que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes [KARP 2005; COLLINS et al. 2006]. Separação cromatográfica de misturas de

proteínas tornou-se um dos meios mais eficazes e mais amplamente utilizados para purificação de proteínas individuais [CUATRECASAS, WILCHEK 1968].

Propriedades gerais das proteínas são usadas para isolá-las uma das outras ou de contaminantes. Pequenas diferenças entre várias proteínas, tais como tamanho (Filtração em gel), carga (Cromatografia de troca iônica), hidrofobicidade (Cromatografia de interação hidrofóbica e Fase reversa) e especificidade de ligante (Cromatografia por afinidade) são utilizadas para purificar as proteínas [KARP 2005]. Em um processo típico de cromatografia, inicialmente ocorre à adsorção do produto ao adsorvente, enquanto que as impurezas não. Além disso, as proteínas fracamente ligadas são removidas por lavagem antes que as condições sejam alteradas para que a proteína alvo seja eluída. Várias versões de cromatografia líquida, diferindo principalmente no tipo de fase estacionária, são utilizadas para a purificação de proteínas [CUATRECASAS, WILCHEK 1968].

Nesse estudo foram utilizadas três dessas técnicas de purificação: a cromatografia de troca iônica, interação hidrofóbica e afinidade.

3.2.1. Cromatografia de troca iônica

A Cromatografia por troca iônica é um método de absorção que se baseia na interação eletrostática entre o soluto e a fase estacionária, buscando o equilíbrio de troca entre íons em solução e íons de mesmo sinal na superfície de um sólido que deve ser insolúvel e de alto peso molecular. A amostra a ser separada é geralmente uma solução aquosa contendo íons orgânicos e inorgânicos; na superfície da fase estacionária cátions e ânions são covalentemente ligados e íons são trocados com a fase móvel, separando

assim os íons que não interagem com a resina daqueles que se ligam com os grupos carregados [SKOOG et. al. 2002].

A fase estacionária utilizada neste método, geralmente, é uma resina de poliestireno entrecruzada com divinilbenzeno na qual são ligados os grupos iônicos. As trocas podem ser catiônicas ou aniônicas que depende da natureza da fase estacionária. Os ligantes mais comuns para as resinas trocadoras de cátions são os ânions sulfonatos ($-\text{SO}_3^-$) e carboxilatos ($-\text{COO}^-$) e para as resinas com trocadores de ânions são as que contêm sal de amônio quartenário ($-\text{NR}_3^+$) e primários ($-\text{NH}_3^+$). Os aminoácidos carregados positivamente ou negativamente possuem contra-íons que são deslocados por íons de carga similar da fase móvel. Nas trocas catiônicas as resinas possuem ligantes com cargas negativas e contra-íons com carga positiva, de forma que os resíduos de aminoácidos carregados positivamente sejam trocados pelos cátions da fase móvel; nas trocas aniônicas, ocorre o contrário, os ligantes da resina têm carga positiva e o contra-íon tem carga negativa permitindo a troca destes com a fase móvel [COLLINS; GUIMARÃES, 1997; SKOOG et. al., 2002].

O princípio de uma separação de troca aniônica pode ser visualizado na Figura 3.1.

Figura 3.1: Princípios de uma separação de troca aniônica [HEALTHCARE 2007].

A cromatografia de troca iônica foi introduzida em 1960, e continua a ter um papel importante na separação e purificação de biomoléculas [WEISS 2004a]. Hoje em dia, essa técnica é mais utilizada para a purificação de proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos e outras biomoléculas carregadas [WEISS 2004a]. Sendo capaz de separar espécies moleculares que têm apenas pequenas diferenças em suas propriedades de carga, por exemplo, proteínas que diferem por um aminoácido carregado. Estas características tornam a cromatografia de troca iônica bem adequada para a captura, à purificação intermediária ou passos de polimento de um protocolo de purificação. Essa técnica é utilizada

para purificação desde micro-escala à purificação de quilogramas de produto [SIMON 2001; WEISS 2004b; COLLINS et al. 2006; JONSON 2011].

3.2.2. Cromatografia de interação hidrofóbica

A cromatografia de interação hidrofóbica separa as biomoléculas, sob condições relativamente suaves, de acordo com diferenças na sua hidrofobicidade.

Essa técnica é amplamente utilizada na purificação de proteínas, como um complemento de outras técnicas que separam as proteínas de acordo com a quantidade da carga, ou de reconhecimento bioespecífico. A cromatografia de interação hidrofóbica é um passo seguinte, ideal quando as amostras forem submetidas à precipitação com sulfato de amônio ou após a separação por cromatografia de troca iônica. Em ambas as situações, a amostra contém uma concentração elevada de sal e pode ser aplicada diretamente na coluna de cromatografia de interação hidrofóbica com pouca ou nenhuma preparação adicional. O nível elevado de sal aumenta a interação entre os aminoácidos hidrofóbicos da proteína e do meio de cromatografia. Durante a separação, as proteínas são eluídas em volumes menores, assim concentrando a amostra de forma que ela possa ir diretamente para a filtração em gel, ou, depois de uma troca de tampão, a uma separação de troca iônica [SIMON 2001; WEISS 2004b; COLLINS et al. 2006; JONSON 2011].

A cromatografia de interação hidrofóbica pode ser empregada para a purificação de captura, ou passos de polimento intermédio de um protocolo de purificação, podendo ser usada na purificação em pequena e grande escala [SIMON 2001; WEISS 2004b; COLLINS et al. 2006; JONSON 2011].

O meio da cromatografia de interação hidrofóbica se divide em dois grupos, em função das suas interações com os componentes da proteína. Cadeia alquila linear (butila, octila, éter, isopropila) que mostra um caráter hidrofóbico "puro", enquanto que os ligantes arilas (fenila) mostram um comportamento de modo misto em que ambas as interações hidrofóbicas e aromáticas, bem como a falta de carga, desempenham um papel nas propriedades cromatográficas finais [SIMON 2001; WEISS 2004b; COLLINS et al. 2006; JONSON 2011].

As matrizes de cromatografia de interação hidrofóbica são feitas de poliestireno com divinilbenzeno, produzindo esferas pequenas e porosas que facilitam a separação das proteínas com elevadas taxas de fluxo. Também existem as matrizes de sefarose que se baseiam em cadeias hidrófilas de agarose, dispostas em feixes e com diferentes graus de reticulação entre as cadeias para se obter uma variedade de matrizes rígidas, macroporosas com boa capacidade de ligação. A matriz mais adequada pode ser escolhida de acordo com o grau de resolução e capacidade de ligação [SIMON 2001; WEISS 2004b; COLLINS et al. 2006; JONSON 2011].

A porosidade da matriz proporciona uma elevada área de superfície interna, enquanto que o ligante tem um papel significativo na hidrofobicidade final do meio. O meio é aplicado em uma coluna de modo a formar um leito compactado. A interação entre a proteína e o meio é promovida por concentrações salinas moderadamente elevadas, tipicamente 1-2 mol/L de sulfato de amônio ou 3 mol/L de NaCl [SIMON 2001; WEISS 2004b; COLLINS et al. 2006; JONSON 2011].

O tipo de sal e a concentração necessária de tampão de partida são escolhidos para assegurar que as proteínas de interesse liguem-se no meio e

as outras proteínas menos hidrofóbicas e as impurezas passem diretamente através da coluna. As proteínas são eluídas através da diminuição da concentração de sal no tampão de eluição. À medida que o nível de sal diminui as proteínas com menor hidrofobicidade começam a eluir da coluna através de um gradiente linear ou em passos de eluição. As proteínas com maior grau de hidrofobicidade serão eluídas depois. Um passo de lavagem em tampão sem sal remove a maioria das proteínas de ligação forte, como pode ser vista pela Figura 3.2 [SIMON 2001; WEISS 2004b; COLLINS et al. 2006; JONSON 2011].

Figura 3.2: Princípios de uma separação de interação hidrofóbica [2007b].

3.2.3. Cromatografia por afinidade

A cromatografia por afinidade separa proteínas com base em uma interação reversível entre a proteína (ou um grupo de proteínas) e um ligante específico, acoplado a uma matriz cromatográfica. Essa técnica é ideal para uma captura ou a fase intermédia de um protocolo de purificação, podendo ser usada sempre que um ligante adequado esteja disponível para a proteína de interesse [HEALTHCARE 2007; ZACHARIOU 2008].

Durante o processo de purificação de uma determinada proteína há interação biológica entre o ligante e a molécula alvo, devido possivelmente às interações eletrostáticas ou hidrofóbicas, forças de van der Waals e/ou de ligação de hidrogênio. Em que pode haver uma interação reversa durante a eluição da molécula alvo, a partir do ligante de afinidade, quer especificamente, utilizando um ligante competitivo ou não, alterando o pH, força iônica ou polaridade [MAGDELDIN, MOSER 2012].

Em uma única etapa, a purificação por afinidade pode oferecer imensa economia de tempo ao longo de várias etapas de procedimentos menos seletivos. O efeito de concentração permite que grandes volumes possam ser processados. As proteínas podem ser purificadas com base em misturas biológicas complexas, formas nativas podem ser separadas a partir de formas desnaturadas da mesma substância, e pequenas quantidades de materiais biológicos podem ser purificados. Para um grau ainda mais elevado de pureza, ou quando não existe qualquer ligante adequado para a purificação por afinidade, um processo multi-passo eficiente deve ser desenvolvido [DUNN, CHAIKEN 1974].

A purificação por afinidade bem sucedida requer um ligante bioespecífico que possa ser ligado covalentemente a uma matriz de cromatografia . O ligante acoplado deve manter a sua afinidade de ligação específica às moléculas alvo durante a lavagem da coluna em que se retira o material não ligado. Portanto, a ligação entre o ligante e a molécula-alvo deve ser reversível para permitir que as moléculas alvo possam ser removidas de uma forma ativa [HEALTHCARE 2007].

A cromatografia por afinidade é também usada para remover contaminantes específicos, por exemplo a coluna Benzamidine Sepharose™ 6 Fast Flow pode remover serina-proteases, semelhante à trombina e Fator Xa. A Figura 3.3 mostra as principais etapas de uma purificação por afinidade [HEALTHCARE 2007; MAGDELDIN, MOSER 2012].

Figura 3.3: Princípios de uma separação por afinidade [HEALTHCARE 2007].

A técnica de purificação por afinidade foi desenvolvida originalmente por Cuatrecasas e Anfinsen Wilchek em 1968 para a purificação de enzimas, mas tem sido estendida desde proteínas receptoras até imunoglobulinas, glicoconjugados, nucleotídios, para as células íntegras e os fragmentos de

células [CUATRECASAS, WILCHEK 1968]. Aplicações dessa técnica são limitadas apenas pela disponibilidade de ligantes imobilizados.

Dentre as colunas de afinidade utilizadas na purificação de proteína, uma atenção especial tem sido dada às colunas com ligantes miméticos, os quais são altamente estáveis e capazes de interagir com uma vasta gama de proteínas. Uma grande variedade de estruturas desses ligantes tem sido desenvolvida, cada uma com características que mimetizam os aminoácidos de ligação das proteínas. Como consequência, cada ligante mimético tem uma especificidade muito diferente, permitindo purificação de uma grande variedade de proteínas [HERMANSON 1992; OSTGROVE 1993].

Esses ligantes são baseados em agarose, adsorventes concebidos para a captura e a purificação de proteínas derivadas de diferentes fontes, como por exemplo, de plasma, soro e células recombinantes. Esta família de ligantes tem especificidade excepcional e leva a proteína altamente purificada [HERMANSON 1992; OSTGROVE 1993].

3.3. ZIMOGRAFIA

A zimografia é uma técnica que permite detectar a atividade de uma determinada enzima diretamente no gel, onde se faz a separação eletroforética. Para isso, é necessário manter a integridade da enzima durante o processo eletroforético, em que o substrato sobre o qual a enzima atua e que será o repórter da atividade enzimática pode ser adicionado ao tampão de incubação do gel ou incorporado no próprio gel [LEVY et al. 2012].

A zimografia é amplamente utilizada em vários campos, como nas ciências biológicas e médicas e aplicada com sucesso em diferentes campos de

atividades humanas. A expansão dessa metodologia é principalmente devida à sua simplicidade e sua alta capacidade de separar isoenzimas e aloenzimas que provaram ser marcadores genéticos muito úteis [GUGLIELMI et al. 2000; LIM et al. 2001; OKWUMABUA 2001].

Essa técnica é usada para detectar uma grande variedade de oxidoredutases [BERGMEYER 1983], incluindo as isoenzimas [JENG et al. 1987] e para classificar os vários gêneros de leveduras com base na mobilidade relativa das bandas de atividade das enzimas produzidas [YAMAZAKI, KOMAGATA 1983; TAKAMI 1986; JENG et al. 1987, GOTO].

3.4. GEL DE ELETROFORESE SDS-PAGE E *NATIVE*-PAGE

3.4.1. *PAGE*

Eletroforese em gel de poliacrilamida é a técnica analítica mais comum utilizada para separar e caracterizar proteínas. Uma solução de acrilamida e bisacrilamida é polimerizada, em que a acrilamida sozinha forma polímeros lineares e o bisacrilamida introduz ligações cruzadas entre as cadeias de poliacrilamida. Com isso, os "tamanhos dos poros" são determinados pela relação de acrilamida- bis-acrilamida [ANDREWS 1986].

A polimerização de acrilamida e monômeros de bisacrilamida é induzida por persulfato de amônio (PSA), o qual se decompõe espontaneamente para formar radicais livres e pelo *N,N,N',N'*-tetrametiletenodiamina (TEMED) que é um estabilizador de radical livre [ANDREWS 1986].

3.4.1.1. SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) é uma técnica rápida, reprodutível e de baixo custo que é usada para quantificar, comparar e caracterizar proteínas. Essa técnica separa as proteínas baseada primariamente em seu peso molecular [LAEMMLI, 1970]. Isto é conseguido através da adição do SDS que é um detergente anfipático que tem um grupo aniônico “cabeça” e uma cauda lipofílica. O SDS liga-se de forma não covalente às proteínas, com uma estequiometria de cerca de uma molécula de SDS por dois aminoácidos. Esse detergente provoca a desnaturação das proteínas e dissociação uma da outra (excluindo a ligação cruzada covalente). Ele também confere carga negativa e as cargas intrínsecas das proteínas são mascaradas, o que levam todas as proteínas migrarem para o ânodo (eletrodo de carga positiva), durante o SDS-PAGE [HAMES, RICKWOOD 1981; ANDREWS 1986].

O resultado é que as proteínas tratadas com SDS possuem formas similares e razões carga/massa muito parecidas. Em consequencia disso, a SDS-PAGE separa as proteínas somente por efeitos de filtração em gel, isto é, de acordo com a massa molecular.

Portanto, a separação de proteínas por SDS-PAGE pode ser utilizada para estimar a massa molecular relativa, para determinar a abundância relativa de proteínas em uma amostra, e para determinar a distribuição de proteínas entre as frações. A pureza das amostras de proteínas pode ser avaliada e o andamento de um processo de fracionamento ou de purificação pode ser seguido [ANDREWS 1986].

3.4.1.2 native-PAGE

Eletroforese de uma proteína em seu estado nativo depende somente das cargas presentes nos seus resíduos de aminoácidos da proteína, bem como de sua massa. Para que uma proteína migre para dentro do gel no sentido do ânodo deve-se ter uma carga total negativa a um determinado pH do sistema gel/tampão. Por esta razão, native-PAGE é comumente realizado em um pH ligeiramente básico, pois as proteínas com um pH neutro ou ácido terão necessariamente cargas líquidas negativas. Alternativamente, o processo pode ser realizado no sentido inverso, usando um pH ácido para conferir uma carga positiva para a maioria das proteínas, em que este método exige a inversão do ânodo e cátodo, porque proteínas carregadas positivamente irão migrar em direção ao cátodo.

Além da carga da proteína, outros fatores tais como o tamanho e forma influenciam sua mobilidade no native-PAGE. Isso ocorre devido a ausência de agentes desnaturantes no native-PAGE, em que as interações de subunidades dentro da proteína multimérica são geralmente mantidas. Além disso, muitas proteínas têm mostrado serem enzimaticamente ativas logo após à separação por esse gel. Assim, o native-PAGE pode ser utilizado para a preparação de proteína ativas purificadas [ROTHER, MAURER 1986].

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse estudo, inicialmente, buscou-se purificar a oxidoredutase responsável pela oxidação enantiosseletiva dos hetero-alcoóis. A cada etapa do processo de purificação houve necessidade de avaliar a atividade enzimática presente nas frações protéicas obtidas. Como estava desenvolvendo uma metodologia para purificação de uma enzima selvagem e o número de teste de atividade era muito grande, optou-se por isolar essa enzima, já que as reações de redução necessitavam de atmosfera de N₂, o que tornaria o processo de purificação da oxidoredutase responsável pela redução economicamente desfavorável.

3.5.1. Isolamento induzido da *Arthrobacter* sp. CCT 7749

A *Arthrobacter* sp. CCT 7749 foi isolada de amostra de sedimento marinho antártico, utilizando a técnica de enriquecimento com um composto orgânico, o (*R,S*)-1-(fenil)etanol [ARAÚJO 2010]. Este composto foi adicionado ao meio de cultura utilizado para o crescimento da bactéria, uma vez que seu uso poderia resultar no isolamento de micro-organismos contendo nova oxidoredutase, que poderia ter sido produzida durante o seu metabolismo. É conhecido que a adaptação para meio sintético contendo um composto químico alvo, frequentemente, resulta no isolamento de micro-organismos contendo novas enzimas [LAYH et al. 1997; NI,XU 2002; MIYAMOTO et al. 2004].

3.5.2. PREPARAÇÃO DO EXTRATO PROTÉICO

Inicialmente a *Arthrobacter* sp. CCT 7749 foi ativada, pois a mesma era preservada a 4 °C. Após a ativação ela foi inoculada em volume maior de meio de cultura apropriado, já que para aperfeiçoar a metodologia de purificação da oxidoredutase era necessária uma maior quantidade de células.

As condições empregadas no crescimento da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 foram as mesmas utilizadas durante a prospecção da mesma (20 °C, 2 dias e 160 rpm) [ARAÚJO 2010].

3.5.3. SUSPENSÃO DAS CÉLULAS EM TAMPÃO FOSFATO 20 mmol/L

Após a obtenção da massa celular, iniciou-se a ruptura celular da *Arthrobacter* sp., em que foram adicionados ao tampão fosfato 20 mmol/L, utilizado na ruptura celular PMSF, DPTA e $MgCl_2$.

O PMSF é um inibidor de proteases, sendo assim, o mesmo foi empregado nesse processo devido à ruptura celular resultar na liberação de proteases a partir dos compartimentos subcelulares. Estas proteases, às vezes necessitam rapidamente serem removidas para assegurar que as proteínas permaneçam intactas. Já o DPTA age como agente quelante para cátions que eventualmente poderiam interferir na atividade da enzima ou na degradação do cofator, principalmente os íons Fe(II) [KATZUNG 2012]. Além disso, fez-se a adição de $MgCl_2$ pois muitas oxidoredutases são dependentes de íons Mg(II) [KATZUNG 2012].

3.5.4. RUPTURA DA PAREDE CELULAR BACTERIANA/CENTRIFUGAÇÃO DAS CÉLULAS

3.5.4.1. Ruptura da parede celular da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 em prensa francesa

Inicialmente a parede celular foi rompida em prensa francesa (equipamento utilizado no laboratório do prof. Dr. Shaker Chuck Farah no IQ-USP), em que a metodologia empregada foi eficiente para romper a parede celular e manter a integridade da oxidoredutase de interesse, uma vez que a enzima apresentou elevada atividade na reação de oxidação do (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol com concentração de cetona de 49% e seletividade >99%. Isso ocorreu porque este equipamento usa alta pressão e descompressão rápida, produzindo assim altos rendimentos da proteína de interesse. Sendo assim, esse equipamento mostrou-se eficiente no processo de ruptura celular da *Arthrobacter* sp.

3.5.5. PROTEÍNAS PRECIPITADAS COM SULFATO DE AMÔNIO

A precipitação de proteínas com sulfato de amônio é conhecida por ser útil na concentração de soluções diluídas de proteína e no fracionamento de misturas de proteínas [LEHNINGER 2006].

O mecanismo de precipitação de proteínas com sais decorre de um aumento da força iônica do sistema. Quando pequenas quantidades de sais são adicionadas à solução contendo proteínas, ocorre uma interação dessas proteínas com as cargas provenientes da dissociação do sal e diminuição da interação entre as proteínas, aumentando a solubilidade no meio aquoso.

Porém, em condições de elevada força iônica, decorrente da adição de grandes quantidades de sais, verifica-se um efeito oposto. As moléculas de água interagem mais fortemente com os íons provenientes da dissociação do sal, promovendo desta forma, a desidratação das proteínas. Durante esse processo, a interação inter-proteínas se torna mais forte, diminuindo a solubilidade das mesmas em meio aquoso e, conseqüentemente, a ocorrência de precipitação das proteínas. Esse processo é também conhecido por "salting-out" [DUONG-LY et al. 2014].

A precipitação de proteínas pelo aumento gradativo da concentração de sais é um processo muito importante para a separação de misturas complexas de proteínas, uma vez que a concentração de sal necessária para precipitação é diferente para cada proteína. O sulfato de amônio tem sido o sal mais comumente utilizado nos ensaios de precipitação de proteína por algumas de suas características como a alta solubilidade, baixo custo e baixa toxicidade [DUONG-LY et al. 2014].

Sendo assim, as proteínas presentes no extrato protéico, obtidas anteriormente, foram precipitadas em diferentes concentrações de sulfato de amônio (10, 20, 30, 40, 50 e 60 %).

Após a análise da atividade enzimática do sobrenadante, resultante da precipitação das proteínas em diferentes concentrações de sulfato de amônio, percebeu-se baixa atividade enzimática nas frações em que as concentrações de sulfato de amônio foram superiores a 40% (conc. cetona 12-18% e e.e. 18-26%) e excelente atividade enzimática nas frações em que a concentração de sulfato de amônio foi 30% (conc. cetona 45% e e.e. >99 %). Sendo assim, essa concentração foi escolhida para os estudos posteriores.

Para verificar o tempo necessário para a oxidação do (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol decidiu-se testar a reação em três tempos; 3, 6 e 24 horas de reação. Nesse estudo utilizou-se o extrato protéico obtido da precipitação da proteína com 30% de sulfato de amônio, juntamente com o NAD⁺ ou NADP⁺. Em que foi possível verificar boa atividade enzimática nas reações com ambos cofatores em 3 horas de reação (conc. cetona 42 e 45% e e.e 94 e 95%, respectivamente). Portanto, para os estudos posteriores, decidiu-se realizar as reações de oxidação enantiosseletiva do (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol neste tempo, utilizando o NAD⁺ como cofator, já que seu custo (1 g, R\$ 245,00; Sigma-Aldrich) é bem inferior comparado ao NADP⁺ (1 g, R\$ 1.718,00; Sigma-Aldrich).

3.5.6. Membranas de celulose

O extrato protéico obtido da precipitação das proteínas com sulfato de amônio 30% foi concentrado em membranas de celulose regenerada 10, 30, 50 e 100 kDa. Estas membranas são caracterizadas por um limite de peso molecular nominal (NMWL), isto é, sua capacidade de reter moléculas acima de um peso molecular especificado. As proteínas com pesos moleculares perto do NMWL podem ser apenas parcialmente retidas. O poder de retenção das membranas depende do tamanho molecular da proteína e da forma. As membranas de celulose são também usadas na remoção de sais ou na troca de soluções, como mostra a Figura 3.4.

Figura 3.4: Membrana de celulose regenerada [AMICON 2009].

Avaliou-se a atividade enzimática presente em ambas as frações obtidas da centrifugação do extrato protéico através das membranas de celulose. Em que se observou atividade enzimática nos filtrados resultante das membranas de 30, 50 e 100 kDa. No entanto, o extrato protéico, obtido na parte superior da membrana de 10 kDa apresentou elevada atividade (conc. cetona 46% e e.e. 98%).

Sendo assim, estabeleceu-se uma ordem no processo de purificação da proteína através das membranas. Inicialmente as proteínas foram filtradas na membrana de 100 kDa, em que o filtrado foi aplicado na membrana de 50 kDa. Mais uma vez, aplicou-se o filtrado em outra membrana, porém de 10 kDa. Em que, o extrato protéico, obtido na parte superior dessa membrana, apresentou excelente atividade enzimática na reação de oxidação, com concentração de cetona 45 % e e.e. 95%.

3.5.7. CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA (HIC) REALIZADAS MANUALMENTE

As proteínas presentes no extrato protéico obtido na parte superior da membrana 10 kDa foram aplicadas em diferentes colunas de interação hidrofóbicas: Phenyl FF (high sub), Phenyl FF (low sub), Butyl FF, Butyl-S FF e Octyl FF. As proteínas foram eluídas com diferentes concentrações de sulfato de amônio (1,0; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0 mol/L e H₂O, 3 mL de cada solução) em tampão fosfato 20 mmol/L. A concentração desse sal foi reduzida gradualmente para a dessorção das proteínas de acordo com a hidrofobicidade.

3.5.7.1. Cromatografia de interação hidrofóbica através da coluna Phenyl FF (high e low sub)

Ao analisar a atividade enzimática nas frações obtidas das colunas Phenyl FF (low sub) e Phenyl FF (high sub) observou-se atividade nas frações 33-36 (coluna phenyl FF high sub) e 34-36 (phenyl FF low sub).

As frações 25-36, obtidas da coluna phenyl FF high sub, foram aplicadas em gel de eletroforese, SDS-PAGE, Figura 3.5, com o intuito de verificar a pureza da oxidoredutase.

Figura 3.5: SDS-PAGE- linha 1: BenchMark™ Protein Ladder; linhas 2-14: Frações 25-37 da coluna Phenyl FF (high sub), respectivamente.

De acordo com o gel de eletroforese das frações protéicas obtidas da coluna Phenyl FF high sub, Figura 3.5, observou-se que houve elevada interação entre as proteínas e o ligante da coluna, pois praticamente todas as proteínas saíram nas últimas frações (31-37, linhas 9-14), cuja presença de sulfato de amônio 1 mol/L foi quase inexistente. Com isso, percebeu-se que o nível elevado de sal aumentou a interação entre os aminoácidos hidrofóbicos da oxidorredutase e o ligante fenila da coluna, já que a oxidorredutase permaneceu retida na coluna, sendo eliminada somente nas últimas frações, juntamente com outras proteínas com maior grau de hidrofobicidade. Sendo assim, percebeu-se que essa coluna, nas condições empregadas, não foi indicada para a purificação dessa proteína, já que a mesma não apresentou pureza, o que pôde ser visto pelo elevado número de bandas no SDS-PAGE (linhas 9-14).

Comportamento semelhante foi observado ao aplicarem as frações obtidas da coluna Phenyl FF low sub no gel de eletroforese, SDS-PAGE (Figura 3.6).

Figura 3.6: SDS-PAGE- linhas 1-7 e 9: Frações 25-32 da coluna Phenyl FF (low sub), respectivamente; linha 8: BenchMark™ Protein Ladder.

Observou-se na Figura 3.6 que as proteínas também só foram eliminadas da coluna somente nas últimas frações, o que mostrou que essa coluna, nessas condições, também não foi indicada para a purificação da oxidoredutase de interesse.

Essas colunas são baseadas em uma matriz de 34 μm , sendo ideais para processos iniciais e intermediários em purificações de proteínas em escalas laboratoriais. Quando se tem um problema na purificação empregando esse tipo de cromatografia pode-se resolver esse problema selecionando um meio substituído com a mesma fase estacionária, mas com densidade de ligação

inferior, como ocorre com a coluna Phenyl FF low sub, em vez de Phenyl FF high sub.

Como essas colunas não se mostraram eficientes para a purificação da oxidoredutase decidiu-se testar outras colunas de interação hidrofóbica.

3.5.7.2. Cromatografia de interação hidrofóbica através das colunas Butyl FF e Butyl-S FF

Ao avaliar a atividade enzimática das frações protéicas obtidas da coluna Butyl FF observou-se atividade nas frações 2, 3, 8, 16, 17, 21-36 com diferentes concentrações de sulfato de amônio (1,0; 0,8; 0,5; 0,3; 0,2 e 0,1 mol/L, respectivamente), o que mostrou que a proteína de interesse interagiu de maneira diferente com o ligante butila. Dessa maneira, percebeu-se que essa coluna não foi indicada para a purificação da oxidoredutase de interesse, já que não havia uma única concentração de sulfato de amônio favorável à purificação.

Para verificar o perfil de purificação da oxidoredutase aplicou-se as frações protéicas obtidas da coluna Butyl FF no gel de eletroforese, SDS-PAGE (Figura 3.7).

Figura 3.7: SDS-PAGE- linhas 1-8 e 10-25: Frações 2, 3, 8, 10, 11, 12, 16,17, 21-36 da coluna Butyl FF, respectivamente; linha 9: BenchMark™ Protein Ladder.

De acordo o perfil de purificação representado pelas bandas no gel de SDS-PAGE (Figura 3.7), comprovou-se que essa coluna não era indicada para a purificação da oxidoredutase, não havendo, portanto, purificação da mesma.

Já ao avaliar a atividade enzimática das frações protéicas obtidas da coluna Butyl-S FF, verificou-se atividade enzimática somente nas primeiras frações (1-7). O que mostrou que a proteína de interesse não interagiu bem com o ligante butila dessa coluna. O que foi confirmado na análise das frações no gel de eletroforese SDS-PAGE (Figura 3.8).

Figura 3.8: SDS-PAGE- linha 1: BenchMark™ Protein Ladder; linhas 2-8: Frações 1-7 da coluna Butyl-S FF, respectivamente.

De acordo com as bandas apresentadas no SDS-PAGE (Figura 3.8, linhas 1-8) percebeu-se que a oxidoredutase não apresentava pureza. Com isso, observou-se que essa coluna, nessas condições, não foi indicada para a purificação da proteína de interesse.

Os mecanismos de adsorção e dessorção para os ligantes butilas são diferentes dos usados nos ligantes fenilas, dando uma diferença de seletividade. Em que o fluxo, muitas vezes, funciona de forma eficiente com concentrações baixas de sal.

As diferenças entre os ligantes Butyl FF e Butyl-S FF estão no comprimento de seus braços espaçadores, nas concentrações dos ligantes imobilizados e no tipo de átomo conector (O-éter ou S-éter) que liga o ligante à matriz sefarose da coluna.

A coluna Butyl-S FF contém um átomo de enxofre como um agente de ligação entre o braço espaçador e o ligante butila, apresentando assim, o meio menos hidrofóbico dentre as colunas de interação hidrofóbica, sendo, portanto, destinada à purificação ou à remoção de biomoléculas fortemente hidrofóbicas em meio com baixas concentrações de sal, tendo assim, baixo risco de desnaturação [HEALTHCARE 2005].

Já a coluna Butyl FF contém um átomo de oxigênio como um agente de ligação entre o braço espaçador e o ligante butila, destina-se à purificação inicial e intermediária que exigem um meio com baixa a média hidrofobicidade [HEALTHCARE 2005].

3.5.7.3. Cromatografia de interação hidrofóbica através da coluna octyl FF.

Ao analisar a atividade enzimática nas frações protéicas obtidas da coluna Octyl FF detectou-se atividade nas frações 22-32 com concentrações de sulfato de amônio de 0,3-0,1 mol/L. Dessa forma, percebeu-se que essa coluna poderia ser indicada para a purificação da oxidoredutase de interesse, já que houve uma concentração de sulfato de amônio favorável à purificação da mesma. Isso pôde mostrar que a oxidoredutase interagiu favoravelmente com o ligante octila.

Para verificar o perfil de purificação da oxidoredutase aplicou-se as frações protéicas obtidas da coluna Octyl no gel de eletroforese, SDS-PAGE (Figura 3.9).

Figura 3.9: SDS-PAGE- linha 1: BenchMark™ Protein Ladder; linhas 2-12: Frações protéicas 22-32 da colona Octyl FF, respectivamente.

De acordo com a Figura 3.9 observou-se um melhor perfil de purificação da oxidoredutase com menor quantidade de bandas, vistas no gel de eletroforese nas frações 22-28 (linhas 2-8).

A coluna Octyl FF é a cromatografia de interação hidrofóbica alifática padrão para meio de captura e de purificação intermediária de proteínas maiores. O ligante não contém grupos carregados, o que faz desta uma cromatografia de interação hidrofóbica verdadeira sem interferência de efeitos iônicos[HEALTHCARE 2005].

De posse desses resultados, optou-se por empregar essa coluna nos estudos posteriores para purificação da oxidoredutase.

3.5.7.4. Concentração e purificação de proteínas através de membranas de celulose

As frações obtidas da Octyl FF que apresentaram semelhanças nas bandas (22-28) foram filtradas nas membranas de 100, 50 e 10 kDa, conforme item 3.5.6. Em que o extrato protéico obtido na parte superior da membrana de 10 kDa apresentou excelente atividade na reação de oxidação (conc. cetona 40% e e.e. 90%) e ao ser aplicado no gel de eletroforese foi observada uma única subunidade com massa molecular de ≈ 40 kDa (Figura 3.10).

Figura 3.10: SDS-PAGE- linha 1: BenchMark™ Protein Ladder; linhas 2, 4 e 5: Frações obtidas das soluções resultantes da filtração nas membranas de 10, 50 e 100 kDa; linha 3: Oxidorredutase obtida na parte superior da membrana de 10kDa, respectivamente.

A oxidorredutase purificada foi aplicada na oxidação dos alcoóis **1-3** (Esquema 3.1) às suas correspondentes cetonas, as quais apresentaram moderadas concentrações (15-25%) e seletividades dos (S)-alcoóis (45-65%).

Esquema 3.1. Oxidação enantiosseletiva de alcoóis.

Após encontrar a fração que continha a enzima de interesse foi necessário repetir o procedimento com uma massa maior de proteína, para que se pudesse chegar até o final da purificação com uma quantidade suficiente de enzima para realizar a sua caracterização. Foram várias as tentativas de se obter uma massa maior de enzima. Apesar de seguir o mesmo procedimento, a quantidade de enzima extraída e/ou mantida em atividade após o processo de purificação foi insatisfatória. Isso ocorreu, provavelmente, devido a não uniformidade no fluxo do eluente, já que as proteínas e os eluentes foram injetados nas colunas de cromatografia manualmente, com fluxo de aproximadamente 1 mL/min. O controle do fluxo foi realizado com a contagem das gotas por minutos.

Sendo assim, outros métodos de purificação foram testados.

3.5.8. PURIFICAÇÃO POR MEMBRANAS E COLUNAS CROMATOGRÁFICAS DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICAS COM AUXÍLIO DE BOMBA DE SERINGA

Como a metodologia de purificação realizada manualmente não havia sido reproduzível, decidiu-se empregar uma bomba de seringa para auxiliar na adição dos eluentes nas colunas cromatográficas de interação hidrofóbica e

troca iônica. Essa bomba utilizou seringas de injeção descartáveis comuns para aplicar os eluentes, em que um dispositivo mecânico empurrou o embolo da seringa com fluxo contínuo.

Inicialmente, testou-se a metodologia já estabelecida item 3.5.7.4, em que se empregava a coluna Octyl FF na purificação da oxidoredutase, no entanto, não se obteve a oxidoredutase com a mesma pureza obtida na etapa inicial da purificação, em que se utilizava essa coluna e membranas de celulose.

Com isso foram testados diferentes fluxos e concentrações do tampão empregado como eluente na coluna cromatográfica de interação hidrofóbica, mas mesmo assim a metodologia não se mostrou eficiente nessa purificação.

Como a purificação estava sendo realizada com o auxílio da bomba de seringa, em que se podia manter um fluxo contínuo, optou-se por um fluxo de 1 mL/min, o mais empregado nesse tipo de cromatografia. Mais uma vez, decidiu-se testar as colunas cromatográficas de interação hidrofóbicas Phenyl FF high sub, Phenyl FF low sub, Butyl FF, Butyl-S FF e Octyl FF. Em que o extrato protéico foi filtrado em membrana de 10 kDa e depois aplicado nas colunas com auxílio da bomba de seringa. As proteínas foram eluídas com diferentes concentrações de sulfato de amônio e de cloreto de sódio.

Empregou-se o NaCl como eluente com o intuito de melhorar a purificação, já que este sal poderia promover eficazmente interação hidrofóbica tendo, assim, uma influência estabilizadora sobre a estrutura da proteína. Na prática, sulfato de amônio e cloreto de sódio pode promover eficientes interações entre as proteínas e os ligantes hidrofóbicos, além de terem efeito estabilizador sobre a estrutura da proteína [LEHNINGER 2006].

Ao analisar a atividade enzimática das frações obtidas após colunas de interação hidrofóbica e aplicá-las no gel de eletrofores (SDS-PAGE), observou-se um perfil de purificação semelhante ao observado anteriormente, em que as cromatografias com colunas foram realizadas manualmente. Com isso, a coluna Octyl FF permaneceu apresentando um melhor perfil para purificação protéica, com menor quantidade de bandas nas frações 22-28. Sendo assim decidiu-se continuar empregando essa coluna no passo inicial de purificação da oxidoredutase de interesse.

Com relação à troca do sulfato de amônio pelo cloreto de sódio, como eluentes nas colunas de interação hidrofóbica, não se observou uma melhora no perfil de purificação da oxidoredutase. Sendo assim, decidiu-se manter o sulfato de amônio nos estudos posteriores, já que o mesmo havia se mostrado eficiente nos estudos iniciais da purificação, além de ser o mais empregado em estudos de purificação de proteínas através de colunas cromatográficas de interação hidrofóbica [LEHNINGER 2006].

Decidiu-se testar outra técnica de cromatografia, como segundo passo de purificação, conforme item 3.5.9, já que a oxidoredutase não estava pura nas frações obtidas com a coluna Octyl.

3.5.9. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Como a quantidade de massa protéica obtida da coluna Octyl (frações 22-28) foi pequena para a triagem das colunas de troca iônica decidiu-se testar primeiro as colunas com o extrato protéico obtido diretamente da ruptura celular para determinar a concentração de eluição.

As proteínas presentes no extrato foram aplicadas em diferentes colunas de troca iônica: SP XL, SP FF, CM FF, Q FF, ANX FF e DEAE FF e a enzima foi eluída com diferentes concentrações de cloreto de sódio (0-1 mol/L) e tampão Tris-HCl 20, 30, 40 e 50 mmol/L, com fluxo de 1 mL/min. Utilizou-se este sal em Tris-HCl como eluente nessas colunas, devido o mesmo ser comumente empregado em coluna de troca iônica e por recomendação do fabricante.

3.5.9.1. Cromatografia de troca catiônica através das colunas SP XL e SP FF

Ao analisar a atividade enzimática das frações obtidas das colunas SP XL e SP FF observou-se atividade somente nas 3 primeiras frações, o que mostrou a falta de interação entre os resíduos de aminoácidos da oxidoredutase e os ligantes dessas colunas, indicando assim, que essas colunas, nas condições empregadas não foram apropriadas para a purificação da oxidoredutase.

Essas colunas têm como ligante o sulfonato de propila ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$), que é um forte trocador de cátions para purificações de proteínas em pequena escala. A coluna SP FF é conveniente e acessível para rápida e fácil separação de troca iônica sozinha ou conectada em série. Apresenta alta capacidade de ligação, suportando altas taxas de fluxo [HEALTHCARE 2005].

O que diferencia essa coluna da SP FF é a composição da matriz, em que na SP FF tem-se 6% de agarose e a SP XL apresenta somente 4%. Essa diferença na quantidade de agarose reflete na porosidade da matriz e pode influenciar diretamente na pureza da proteína [HEALTHCARE 2005].

De acordo com esses resultados decidiu-se testar outra coluna de troca catiônica, CM FF.

3.5.9.2. Cromatografia de troca catiônica através da coluna CM FF

A coluna CM FF apresentou um perfil de purificação parecido com os das colunas SP FF e SP XL, já que ao analisar a atividade enzimática das frações obtidas observou-se atividade somente nas 5 primeiras frações, o que indicou pouca interação entre a oxidoredutase e o ligante carboximetil. Mais uma vez essa coluna nas condições empregadas não foi indicada para a purificação da oxidoredutase de interesse.

A coluna cromatográfica de troca catiônica CM FF tem como ligante um carboximetil ($-\text{OCH}_2\text{COO}^-$), que é um fraco trocador de cátions para purificações em escalas analíticas.

De acordo com esses resultados optou-se por testar colunas de troca aniônica, já que os resíduos de aminoácidos da oxidoredutase não interagiram com os trocadores catiônicos. Isso poderia indicar a presença predominante de aminoácidos carregados negativamente nessa enzima.

3.5.9.3. Cromatografia de troca aniônica através da coluna Q FF

As proteínas presentes no extrato protéico foram aplicadas na coluna Q FF e a enzima foi eluída com diferentes concentrações de cloreto de sódio (0-1 mol/L) em tampão Tris-HCl 20 mmol/L. O extrato protéico apresentava coloração amarelada, sendo assim, foi possível observá-lo sendo eliminado da coluna imediatamente após a sua aplicação. Ao avaliar a atividade enzimática

presente nas frações obtidas dessa coluna, observou-se atividade somente nas duas primeiras frações, o que mostrou que realmente as proteínas não interagiram com o ligante trimetil amino, que é um forte trocador de ânions para purificações de proteínas em pequena e grande escala. Essa coluna é ideal para cromatografia em escala industrial, pois apresenta elevadas taxas de fluxo.

De acordo com esses resultados decidiu-se testar outras colunas de troca aniônica, item 3.5.9.4.

3.5.9.4. Cromatografia de troca aniônica através da coluna ANX FF e DEAE FF.

O extrato protéico foi aplicado nas colunas DEAE FF e ANX FF e a enzima foi eluída com diferentes concentrações de cloreto de sódio (0-1 mol/L) em tampão Tris-HCl 20 mmol/L, pH 8,0.

Ao avaliar a atividade enzimática presente nas frações obtidas da coluna ANX FF observou-se atividade somente nas frações 10-21. Essas frações foram aplicadas no gel de eletroforese SDS-PAGE, Figura 3.11, objetivando observar a pureza da enzima.

Figura 3.11: SDS-PAGE- linhas 1-12: Frações protéicas 10-21 da coluna ANX FF, respectivamente.

De acordo com a Figura 3.11 percebeu-se que esta coluna poderia ser usada para a purificação da proteína, já que as proteínas interagiram com o ligante presente na mesma. Não se observou uma boa pureza, mas essa poderia ser conseguida com alteração de alguns parâmetros, como tipo e concentração de tampão de eluição, fluxo e pH.

Ao avaliar a atividade enzimática presente nas frações obtidas da coluna DEAE FF, observou-se que as frações 1-11 apresentaram atividade e que ao serem aplicadas no gel de eletroforese (SDS-PAGE, Figura 3.12) apresentaram poucas bandas, o que significava que a oxidoredutase estava parcialmente pura.

Figura 3.12 : SDS-PAGE- linha 1: BenchMark™ Protein Ladder; linhas 2-11: Frações 1-10 obtidas da coluna DEAE, respectivamente.

Decidiu-se concentrar as frações protéicas de acordo com a pureza apresentada, representada pelas bandas vistas no gel de eletroforese, Figura 3.12. As frações de 5-11 foram concentradas na membrana de celulose 10 kDa. O extrato protéico obtido na parte superior da membrana apresentou excelente atividade na reação de oxidação, sendo assim, o mesmo foi aplicado na coluna de interação hidrofóbica Octyl FF, já que a oxidoredutase estava mais pura nessas frações. O perfil de purificação pôde ser visto na Figura 3.13.

Figura 3.13: SDS-PAGE- linha 2: BenchMark™ Protein Ladder; linhas 1 e 3: Frações protéicas parcialmente puras obtida da coluna Octyl.

De acordo com o SDS-PAGE (Figura 3.13) observou-se que a oxidoredutase apresentava um alto grau de pureza, pois havia somente duas bandas nas frações 28-30 e 31-34 (linhas 1 e 3) da coluna Octyl FF, com bandas em aproximadamente 45 e 50 kDa.

O que diferencia a coluna DEAE FF da ANX FF é a fase estacionária e a quantidade de agarose presente na matriz. Em que a DEAE FF apresenta o ligante dietilaminoetil, sendo utilizada na purificação de proteínas e ácidos nucléicos. Esse ligante interage com os resíduos de aminoácidos da proteína, carregados negativamente, até serem liberados por aumento da concentração de sal presente no eluente. Esse tipo de interação ocorre também com a coluna ANX FF, porém o ligante presente nessa coluna é o dietilaminopropil.

A DEAE FF baseia-se em 6% de agarose de matriz sólida altamente reticulada com boas propriedades de fluidez e elevada capacidade de carga, já a coluna ANX FF baseia-se em 4% de agarose reticulada, isso resulta em um

meio com maior porosidade, o que é particularmente útil para a purificação de proteínas com massas elevadas.

Portanto, levando em consideração os resultados obtidos com estas metodologias, bem como sua reprodutibilidade, as mesmas foram empregadas nas purificações posteriores, em que a purificação da oxidoredutase ocorreu em três etapas, coluna DEAE FF, Octyl e membrana de 10 kDa, respectivamente.

3.5.10. ALTERAÇÃO NO MÉTODO DE PURIFICAÇÃO DA OXIDORREDUTASE

Ao dar continuidade ao processo de purificação teve-se limitação de uso da prensa francesa, equipamento empregado na ruptura da parede celular da *Arthrobacter* sp. CCT 7749. Sendo assim, testou-se a ruptura da parede celular em dois novos equipamentos, o Ultra-turrax (equipamento utilizado no laboratório do prof. Dr. Massuo Jorge Kato no IQ-USP) e o Ultrassom.

3.5.10.1. Ruptura da parede celular da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 através de ultra-turrax

A tentativa de ruptura da parede celular da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 realizada através do ultra-turrax não foi bem sucedida, pois ao observar a amostra em microscópico óptico, percebeu-se que as células permaneciam intactas. Sendo assim, este equipamento não foi apropriado para o rompimento da parede celular da *Arthrobacter* sp.

3.5.10.2. Ruptura da parede celular da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 através de Ultrassom

Inicialmente o rompimento celular da parede celular da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 foi realizado com aplicação de ultrassom com amplitude de 30% em 10 segundos, por 12 minutos a intervalos de 50 segundos. Porém a ruptura não foi bem sucedida, pois ao observar a amostra, em microscópico óptico, percebeu-se que as células permaneciam intactas.

Sendo assim, decidiu-se testar outros parâmetros como amplitudes de 40, 60 e 70% com pulsos de 10, 20, 30, 40 e 59 segundos, por 6, 12, 25, 30 minutos a intervalos de 40, 50, 59 segundos. No entanto, não foi obtido êxito nesse processo de ruptura, pois não se observou atividade enzimática no extrato protéico obtido e ao observar as células da bactéria em microscópio, percebeu-se que as mesmas permaneceram intactas, não havendo, portanto a lise celular. Sendo assim, decidiu-se adicionar outros reagentes, favoráveis à lise celular, juntamente à solução tampão empregada na ruptura celular, item 3.5.10.2.1.

3.5.10.2.1. Suspensão das células em tampão Tris-HCl 20 mmol/L com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e β -mercaptoetanol

As células obtidas da centrifugação foram suspensas em uma solução tampão Tris-HCl 20 mmol/L, juntamente com EDTA, β -mercaptoetanol, além do $MgCl_2$, DTPA e PMSF e rompidas em ultrassom com amplitudes de 30, 40 e 60% com pulsos de 10, 20, 30 e 40 segundos, por 6, 12, 25, 30 minutos a intervalos de 30, 40, 50 segundos. O β -mercaptoetanol foi empregado na

ruptura celular para clivar ligação de dissulfeto, que poderia ter sido formada entre proteínas contaminantes e 6xHis da proteína de interesse. Já o EDTA é um composto orgânico que age como agente quelante formando complexos estáveis com diversos íons metálicos. Mais uma vez, não ocorreu a ruptura celular, pois as células das bactérias permaneceram intactas. Sendo assim, optou-se por testar o detergente Triton X-100, para auxiliar na ruptura celular, conforme relatos da literatura [KUMAR et al. 2012], item 3.5.10.2.2.

3.5.10.2.2. Suspensão das células em tampão Tris-HCl 20 mmol/L com Triton X-100

As células da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 obtidas da centrifugação foram suspensas em uma solução tampão TrisHCl 20 mmol/L contendo Triton x-100 e rompidas em ultrassom com amplitude de 40% com pulso de 10 segundos, por 30 minutos a intervalos de 50 segundos.

Optou-se por testar este detergente como auxiliar na ruptura celular da *Arthrobacter* sp., uma vez que, sua utilização poderia ajudar a melhorar as condições de lise das células, pois ocorre a solubilização de corpos de inclusão e de proteínas [KUMAR et al. 2012].

Ao observar as células em microscópio, pôde-se perceber o rompimento celular, porém ao testar a atividade do extrato protéico obtido, não foi possível observar a reação de oxidação do álcool de interesse. Sendo assim, nessas condições, este detergente não foi favorável à ruptura celular dessa bactéria.

Como os aditivos utilizados anteriormente não contribuíram para a ruptura celular da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 decidiu-se empregar outras enzimas para

auxiliar nessa ruptura, baseado em relatos da literatura [SUZUKI, IWAHASHI 2013], item 3.5.10.2.3.

3.5.10.2.3. Suspensão das células em tampão Tris-HCl 20 mmol/L com liticase ou lisozima

Dentre as enzimas empregadas em procedimentos de ruptura celular, uma atenção especial tem sido dada as liticases e lisozimas. Uma vez que estas enzimas auxiliam na ruptura da membrana celular de alguns micro-organismos.

As lisozimas catalisam a hidrólise da ligação β -glicosídica entre o C1 de ácido *N*-acetil murâmico e o C4 de *N*-acetil-D-glucosamina no peptidoglicano circundante de membranas plasmáticas bacterianas, por isso, essas enzimas têm um potencial para matar bactérias [JOLLÈS, JOLLÈS 1984].

Existem lisozimas isoladas de três tipos de fontes (aves e invertebrados) e são frequentemente encontradas em combinações de duas das três fontes [MASSCHALCK, MICHIELS 2003]. Estas enzimas atuam atacando polissacarídeos da parede celular de diferentes espécies bacterianas, rompendo a parede celular. Esta é, sobretudo, efetiva hidrolisando tetrassacarídeos de enzimas [MYRNES 2013]. Por esta razão, selecionou-se esta bactéria para ajudar no rompimento da parede celular da *Arthrobacter* sp. CCT 7749. No entanto, com a metodologia aplicada não se observou o rompimento de todas as células, o que refletiu nos resultados das reações de oxidação enantiosseletiva do (*R,S*)-1-4-(metilfenil)etanol catalisada pela oxidoredutase presente no extrato protéico obtido da ruptura celular.

De acordo com este resultado, decidiu-se testar a liticase, outra enzima que também é empregada em ruptura celular de micro-organismos, como por exemplo, leveduras.

A liticase é uma enzima importante na microbiologia, isolada a partir de *Arthrobacter luteus*, que ativamente degrada paredes celulares de leveduras [KITAMURA et al. 1971]. O principal ingrediente na liticase é laminaria pentahidrolase β -1,3-glucana, que hidrolisa os polímeros de glucose ligados por 1,3- β -ligações, produzindo laminaripentaose [KANEKO et al. 1973; KITAMURA et al. 1971]. Esta enzima também inclui protease e manase que degradam fortemente paredes das células de leveduras. Alterando o pH ou a temperatura, a lise da parede celular e a desidratação da glucana são facilmente realizáveis [SUZUKI et al. 2013].

Com base nessas características, decidiu-se usar essa enzima, juntamente com β -mercaptoetanol, $MgCl_2$, DTPA e PMSF para romper as células em ultrassom com amplitudes de 40, 50, 55, 60 e 70% com pulsos de 10, 20, 30, 40 e 59 segundos, por 6, 12, 20, 25 e 30 minutos a intervalos de 10, 20, 30, 40, 50 e 59 segundos.

Ao observar as células em microscópio, pôde-se perceber que todas as células haviam sido rompidas e ao testar-se a atividade enzimática do sobrenadante na reação de oxidação do álcool (*R,S*)-1-(4metilfenil)etanol observou-se boa concentração de cetona e seletividade (49%, >99%, respectivamente), em que foi usada amplitude de 50% com pulsos de 20 segundos, por 30 minutos a intervalos de 50 segundos.

Sendo assim, decidiu-se empregar esta enzima como auxiliar na ruptura celular da *Arthrobacter* sp.

Como o primeiro passo da purificação foi realizado em colunas de troca iônica empregando o tampão Tris-HCl, decidiu-se verificar a influência/eficiência desse tampão na ruptura celular. Com isso testou-se a ruptura celular nas concentrações 10, 20 e 50 mmol/L.

Deste estudo observou-se uma quantidade maior de proteína presente no sobrenadante resultante da ruptura celular no tampão Tris-HCl 20 mmol/L (28 mg/mL), já nas concentrações de 10 e 50 mmol/L obtiveram 6 e 12 mg/mL de proteínas, respectivamente.

Ao avaliar a atividade enzimática nesses extratos protéicos observou-se excelentes concentrações de cetona (49%) e seletividade (>99%) no extrato protéico obtido da ruptura celular com Tris-HCl 20 mmol/L, nos demais extratos os valores de concentração de cetona e seletividade foram inferiores.

De acordo com esses resultados, selecionou-se o tampão Tris-HCl 20 mmol/L para as futuras rupturas celulares.

3.5.10.3. Purificação da oxidoredutase por coluna cromatográfica de troca iônica DEAE FF através de FPLC-Akta Purifier

No primeiro semestre de 2012 o Laboratório adquiriu um equipamento próprio para a purificação de proteínas, FPLC-Akta Purifier, visando um avanço no processo de purificação da oxidoredutase de interesse, bem como de outras proteínas.

O FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) consiste em um sistema de cromatografia líquida frequentemente utilizada para analisar, identificar e purificar proteínas e peptídeos de maneira rápida e confiável, pois a mesma possui uma fase móvel, que é uma solução aquosa ou tampão, sendo sua taxa

de fluxo controlada por uma bomba de deslocamento positivo, normalmente mantido constante, enquanto que a composição do tampão pode ser variada conforme o interesse. Em que, após a passagem pela coluna a amostra eluída percorre a célula de UV onde está conectada a um detector e posteriormente a um monitor, isto permite o experimentador identificar onde os picos de concentração de proteína ocorrem, indicando quais as frações em que os componentes específicos da mistura se encontram. Estas frações são encaminhadas para o coletor de frações, o qual tem a função de acomodar cada fração em um tubo de ensaio.

O extrato protéico obtido da ruptura celular foi aplicado em coluna de troca iônica (DEAE FF) e a enzima foi eluída com um gradiente crescente NaCl (0-1 mol/L) em Tris-HCl 20 mmol/L conforme Figura 3.14. Em seguida, analisou-se a atividade enzimática nas frações obtidas.

Figura 3.14: Purificação da oxidoredutase a partir da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 em coluna DEAE FF HiTrap, 1 mL. Amostra: 45 mg de proteínas; fluxo: 1 mL/min; tampão de ligação: Tris-HCl 20 mmol/L; tampão de eluição: Tris-HCl 20 mmol/L + NaCl 1.0 mol/L; Condições de eluição: 20 mL de tampão de eluição, gradiente crescente linear de NaCl 0-100 %. A linha sólida representa % de tampão Tris-HCl carregado de NaCl.

Observou-se no cromatograma obtido da coluna DEAE FF (Figura 3.14), 2 picos com grandes áreas em diferentes concentrações de sal, o que poderia indicar pouca purificação da proteína de interesse.

Ao avaliar a atividade enzimática presentes nas frações obtidas dessa coluna, observou-se atividade somente nas frações 4-12, o que mostrou que a oxidoredutase interagiu bastante com o ligante da coluna, já que a mesma saiu em diferentes concentrações de NaCl, isso ocorreu provavelmente devido

ao aumento brusco na concentração desse sal, em que o volume total de eluente foi 20 mL.

De acordo com esse resultado testou-se a purificação da oxidoredutase com um gradiente crescente de NaCl (0-0,5 mol/L) em Tris-HCl 20 mmol/l mantendo o volume total do eluente (20 mL), conforme Figura 3.15. Em seguida, analisou-se a atividade enzimática nas frações obtidas.

Figura 3.15: Purificação da oxidoredutase a partir da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 em coluna DEAE FF HiTrap, 1 mL. Amostra: 45 mg de proteínas; fluxo: 1 mL/min; tampão de ligação: Tris-HCl 20 mmol/L; tampão de eluição: Tris-HCl 20 mmol/L + NaCl 1.0 mol/L; Condições de eluição: 20 mL de tampão de eluição, gradiente crescente linear de NaCl 0-50 %. A linha sólida representa % de tampão Tris-HCl carregado de NaCl.

Observou-se no cromatograma obtido da coluna DEAE FF Figura 3.15, 4 picos em diferentes concentração de NaCl, o que poderia indicar uma melhora

no processo de purificação da proteína de interesse, apesar de apresentarem grandes áreas.

Observou-se atividade enzimática nas frações 4-7, 12, 15-19, o que mostrou uma melhora no processo de purificação, já que as proteínas saíram em concentrações definidas de NaCl.

De acordo com esses resultados, decidiu-se melhorar o processo de purificação empregando a coluna DEAE FF, porém com 5 passos de eluição com NaCl 15, 18, 26, 50 e 100 % e com 62 mL de eluente, Figura 3.16.

Figura 3.16: Purificação da oxidorreductase a partir da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 em coluna DEAE FF HiTrap, 1 mL. Amostra: 45 mg de proteínas; fluxo: 1 mL/min; tampão de ligação: Tris-HCl 20 mmol/L; tampão de eluição: Tris-HCl 20 mmol/L + NaCl 1.0 mol/L; Condições de eluição: 62 ml de tampão de eluição, 5 passos de eluição com NaCl 15, 18, 26, 50 e 100 %. A linha sólida representa % de tampão Tris-HCl carregado de NaCl.

A Figura 3.16 representa o cromatograma obtido da coluna DEAE FF, em que foram observados 5 picos em diferentes concentrações de NaCl. Ao analisar a atividade enzimática nas frações obtidas da coluna DEAE FF, referentes a esses picos, pôde-se perceber que a proteína de interesse concentrava-se nas frações 32-54, com 26% de NaCl, em que se observou 30% de concentração de cetona e 80% de excesso enantiomérico.

De acordo com esses resultados percebeu-se que essas condições eram ideais para a purificação da oxidoredutase. Portanto, concentrou-se as proteínas presentes nessas frações em membranas de 10 kDa e aplicou-se inicialmente na coluna Octyl FF, depois nas colunas de afinidade Mimetic Orange® 3 A6XL, Blue® 1 P6XL, Red® 2 A6XL, Green® 1 A6XL, troca aniônica (ANX) e troca catiônica (SP XL, CM FF), conforme itens abaixo:

3.5.10.4. Purificação da oxidoredutase por coluna Cromatografia de interação hidrofóbica Octyl FF através de FPLC-Akta Purifier

As proteínas presentes nas frações 32-54 foram aplicadas na coluna Octyl FF, com gradiente decrescente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0-1 mol/L) em tampão fosfato 20 mmol/L (Figura 3.17).

Figura 3.17: Purificação da oxidoredutase a partir da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 em coluna Octyl FF HiTrap, 1 mL. Amostra: 15 mg de proteínas; fluxo: 1 mL/min; tampão de ligação: Fosfato 20 mmol/L, pH 7,0; tampão de eluição Fosfato 20 mmol/L + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 mol/L; Condições de eluição: 20 ml de tampão de eluição, gradiente linear de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0-100%. A linha sólida representa % de tampão fosfato carregado de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Observou-se, no cromatograma obtido da coluna Octyl FF (Figura 3.17), 2 picos em diferentes concentrações de NaCl. O que pode indicar pouca purificação da proteína de interesse. No entanto, analisou-se a atividade enzimática nas frações proteínas obtidas dessa coluna (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Oxidação enantiosseletiva do (R,S)-1-(4-metilfenil)etanol mediada por oxidorreductase da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 presentes nas frações da coluna Octyl FF.

Reação	Frações Coluna Octyl	Cetona/Álcool (%)	Álcool e.e. (%) ^a
1	7	3/97	5(R)
2	10	2/98	3(R)
3	12	3/97	4(R)
4	14	2/98	3(R)
5	16	3/97	4(R)
6	18	2/98	2(R)
7	20	5/95	6,5(R)
8	22	2/98	2(R)
9	24	6/94	6,5(R)
10	26	10,5/89,5	15(R)
11	28	9,5/90,5	13(R)
12	30	11,5/88,5	17(R)
13	32	10,5/89,5	12(R)
14	34	11/89	15(R)
15	35	5,5/94,5	7(R)
16	36	11/89	16(R)
17	38	10/90	12(R)
18	39	9/91	9(R)
19	40	13/87	16(R)
20	42	4/96	4(R)
21	43	4/96	3(R)
22	44	4/96	6(R)
23	45	2/98	2(R)

Condições de reação: (R,S)-1-(4-metilfenil)etanol (0,25 mmol/L), extrato protéico (200 µL), NAD⁺ (0,3 mmol/L), 20 °C, 160 rpm, 15 h. ^aDeterminado por GC usando uma coluna quiral (Chiral-Dex-CB).

De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 3.1 percebeu-se que a proteína de interesse encontrava-se nas frações 26-40 (entradas 10-19), pois se observou atividade enzimática nessas frações embora com valores baixos de concentração de cetona (5,5-13%) e de seletividade (6,5-17%). No entanto, verificou-se a pureza das proteínas presentes nessas frações através de SDS-PAGE, conforme Figura 3.18.

Figura 3.18: SDS-PAGE- linhas 3 e 20: BenchMark™ Protein Ladder; linhas 1,2, 4-19, 21-30: Frações 26, 27, 28-43 da coluna Octyl FF, respectivamente.

De acordo com o SDS-PAGE, Figura 3.18, observou-se semelhanças nas bandas das frações 26-39 (linhas 1,2, 4-15) com isso, decidiu-se concentrar essas frações em membranas de 10 kDa e aplicá-las em colunas por afinidade e troca aniônica e catiônica.

3.5.10.5. Purificação da oxidorredutase em colunas cromatográfica por afinidade realizada através de força gravitacional.

A cromatografia por afinidade tem sido utilizada no isolamento seletivo de macromoléculas biológicas através da utilização de suas propriedades, as quais são capazes de unirem-se reversivelmente à fase estacionária, composta por um ligante específico associado a um suporte inerte.

Nesse estudo, utilizou-se o kit de teste PIKSI (cedido pelo prof. Dr. Cassius Vinicius Stevani do IQ-USP) que apresentou colunas de afinidade, com ligantes altamente estáveis. Cada ligante tem uma especificidade diferente permitindo purificar uma vasta variedade de proteínas.

Inicialmente testou-se a coluna Mimetic Orange® 3 A6XL na purificação da oxidorredutase, provenientes das frações 26-39 da coluna Octyl FF.

3.5.10.5.1. Purificação da oxidorredutase na coluna cromatográfica de afinidade Mimetic Orange® 3 A6XL

Aplicou-se as proteínas presentes nas frações 26-39 (obtidas da coluna de interação hidrofóbica Octyl FF) na coluna de afinidade Mimetic Orange® 3 A6XL, com diferentes concentrações de NaCl (0-1 mol/L) em tampão Tris-HCl 20 mmol/L. Em seguida, avaliou-se a atividade enzimática nas frações obtidas (Tabela 3.2).

Tabela 3.2: Oxidação enantiosseletiva do (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol mediada por oxidorreductase da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 presentes nas frações da coluna Mimetic Orange® 3 A6XL.

Frações Coluna Orange	Cetona/Álcool (%)	e.e. (%) ^a
1	6/94	10 (<i>R</i>)
2	4/96	7(<i>R</i>)
3	2/98	6(<i>R</i>)
4	5/95	17(<i>R</i>)
5	4/96	8(<i>R</i>)
6	-	-
Condições de reação: (<i>R,S</i>)-1-(4-metilfenil)etanol (0,25 mmol/L), extrato protéico (200 µL), NAD ⁺ (0,3 mmol/L), 20 °C, 160 rpm, 15 h. ^a Determinado por GC usando uma coluna quirai (Chiral-Dex-CB).		

De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 3.2 pôde-se perceber pouca atividade enzimática nas frações obtidas 1-5, com concentração de cetona de 2-6% e seletividade de 6-17%. Esses valores baixos podem ter ocorrido devido à pequena quantidade de proteína estar, já que foi injetado 1 mg de proteína na coluna. Para verificar a pureza da proteína nas frações protéicas obtidas, aplicou-se as frações 1-6 no gel de eletroforese SDS-PAGE (Figura 3.19).

Figura 3.19: SDS-PAGE- linha 1: BenchMark™ Protein Ladder; linha 2-7: frações 1-6 da coluna mimetic orange® 3 A6XL, respectivamente.

De acordo com o gel de eletroforese das frações protéicas obtidas da coluna de afinidade *Mimetic Orange® 3 A6XL*, Figura 3.19, pôde-se perceber que houve pouca interação entre os aminoácidos da proteína e o ligante da coluna, já que praticamente todas as proteínas saíram nas 3 primeiras frações. Sendo assim, percebeu-se que essa coluna não foi indicada para a purificação dessa proteína, já que a mesma não apresentava pureza. De acordo com esse resultado, decidiu-se testar outra coluna de afinidade, *Blue® 1 P6XL*.

3.5.10.5.2. Purificação da oxidoredutase na coluna cromatográfica de afinidade *Mimetic Blue® 1 P6XL*

Assim como foi realizado na coluna *Mimetic Orange® 3 A6XL*, aplicou-se as proteínas presentes nas frações 26-39, obtidas da coluna *Octyl FF*, na coluna de afinidade *Mimetic Blue® 3 P6XL*, com diferentes concentrações de NaCl (0-

1 mol/L) em tampão Tris-HCl 20 mmol/L. Avaliou-se a atividade enzimática nas frações obtidas (Tabela 3.3).

Tabela 3.3: Oxidação enantiosseletiva do (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol mediada por oxidorreductase da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 presentes nas frações da coluna Mimetic Blue® 1 P6XL

Frações Coluna Blue	Cetona/Álcool (%)	e.e. (%) ^a
1	3/97	6 (<i>R</i>)
2	5/95	8(<i>R</i>)
3	3/97	6(<i>R</i>)
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
Condições de reação: (<i>R,S</i>)-1-(4-metilfenil)etanol (0,25 mmol/L), extrato protéico (200 µL), NAD ⁺ (0,3 mmol/L), 20 °C, 160 rpm, 15 h. ^a Determinado por GC usando uma coluna quiral (Chiral-Dex-CB).		

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3.3 observou-se baixa atividade enzimática nas frações 1-3 e nenhuma atividade nas demais frações obtidas da coluna Mimetic Blue® 1 P6XL, com concentrações de cetona de 3 e 5% e seletividades de 6 e 8%. Para verificar a pureza da proteína nas frações protéicas obtidas, aplicou-se as frações 1-4 no gel de eletroforese SDS-PAGE (Figura 3.20).

Figura 3.20: SDS-PAGE- linhas 1, 3-5: Frações 1-4 da coluna Mimetic Blue® 1 P6XL, respectivamente; linha 2: BenchMark™ Protein Ladder.

Observou-se na Figura 3.20 que as proteínas saíram praticamente nas 3 primeiras frações, sendo assim, percebeu-se que esta coluna também não foi indicada para purificação da oxidorreductase de interesse. Portanto, decidiu-se testar outra coluna do kit de teste PIKSI, Mimetic Red® 2 A6XL.

3.5.10.5.3. Purificação da oxidorreductase na coluna cromatográfica de afinidade Mimetic Red® 2 A6XL

Aplicou-se as proteínas presentes nas frações 26-40 obtidas da coluna de interação hidrofóbica Octyl FF, na coluna de afinidade Mimetic Red® 2 A6XL, com diferentes concentrações de NaCl (0-1 mol/L) em tampão TrisHCl 20 mmol/L. Em seguida, avaliou-se a atividade enzimática nas frações obtidas (Tabela 3.4).

Tabela 3.4: Oxidação enantiosseletiva do (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol mediada por oxidorreductase da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 presentes nas frações da coluna Mimetic Red® 2 A6XL

Frações Coluna Red	Cetona/Álcool (%)	e.e. (%) ^a
1	9/91	13(<i>R</i>)
2	6/94	9(<i>R</i>)
3	3/97	6(<i>R</i>)
4	7/93	11(<i>R</i>)
5	4/96	7(<i>R</i>)
6	2/98	4(<i>R</i>)
7	2/98	4(<i>R</i>)
8	1/99	2(<i>R</i>)
9	1	2(<i>R</i>)
10	-	-
11	-	-

Condições de reação: (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol (0,25 mmol/L), extrato protéico (200 µL), NAD⁺ (0,3 mmol/L), 20 °C, 160 rpm, 15 h. ^aDeterminado por GC usando uma coluna quiral (Chiral-Dex-CB).

Observou-se nos resultados apresentados na Tabela 3.4 baixas concentrações de cetona 1-9% e seletividade 2-13% nas frações protéicas 1-10, obtidas da coluna Mimetic Red® 2 A6XL. Percebeu-se que a proteína de interesse saiu em oito frações, mostrando que o ligante dessa coluna interagiu um pouco com a oxidorreductase de interesse, como pôde ser visto no gel de eletroforese, Figura 3.21.

Figura 3.21: SDS-PAGE- linhas 1, 3-12: Frações, 1, 2-11 da coluna Mimetic Red® 2 A6XL, respectivamente; linha 2: BenchMark™ Protein Ladder.

Conforme as bandas vistas no gel de eletroforese (Figura 3.21) percebeu-se que as proteínas saíram praticamente nas frações 1-6. Sendo essas frações às que apresentaram melhores atividades enzimáticas, Tabela 3.4.

O emprego dessa coluna nessas condições não foi possível obter a oxidoredutase pura, sendo assim, decidiu-se continuar a purificação da proteína, testando 2 colunas de troca catiônica (CM FF e SP XL) e uma de troca aniônica (ANX FF), já que essas colunas poderiam ser realizadas através do FPLC-Akta Purifier, o que facilitaria no melhoramento da metodologia de purificação.

3.5.10.6 Purificação da oxidorreductase por coluna cromatográfica de Troca catiônica (SP XL, SP FF, CM FF) através de FPLC-Akta Purifier

Aplicaram-se as proteínas presentes nas frações 26-40, obtidas da coluna de interação hidrofóbica Octyl FF nas colunas de troca iônica: SP XL, SP FF, CM FF, ANX FF e a enzima foi eluída com gradientes crescentes de cloreto de sódio (0-1 e 0-0,5 mol/L) em tampão Tris-HCl 20 mmol/L. Em seguida, avaliou-se a atividade enzimática das frações. Desta forma, conseguiu-se determinar as frações que possuíam a atividade enzimática desejada.

Figura 3.22: Purificação da oxidorreductase a partir da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 em coluna SP FF HiTrap, 1 mL. Amostra: 18 mg de proteínas; fluxo: 1 mL/min; tampão de ligação: Tris-HCl 20 mmol/L, pH 8,0; tampão de eluição: Tris-HCl 20 mmol/L + NaCl 1.0 mol/L; Condições de eluição: 20 mL de tampão de eluição, gradiente crescente linear de NaCl 0-0,5 mol/L. A linha sólida verde representa % de tampão Tris-HCl carregado de NaCl.

Observou-se 5 picos no cromatograma obtido da coluna SP FF (Figura 3.22) o que poderia indicar uma possível purificação da oxidorreductase. No entanto,

ao testar a atividade enzimática nas frações protéicas obtidas dessa coluna, não se detectou atividade enzimática em nenhuma das frações obtidas. Porém, observou-se atividade enzimática na fração protéica obtida logo após a aplicação da amostra na coluna, antes mesmo da eluição das proteínas, mostrando assim, que a proteína não interagiu com o ligante da proteína.

Aplicou-se algumas frações obtidas dessa coluna no gel de eletroforese SDS-PAGE (Figura 3.23), com a finalidade de verificar se realmente não houve interação das proteínas com o ligante sulfonato de propila ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$).

Figura 3.23: SDS-PAGE- linhas 1-3, 5-15: Frações 6, 10, 11, 12, 14-21, 23, 27 da coluna SP XL FF, respectivamente; BenchMark™ Protein Ladder.

De acordo com a Figura 3.23 observou-se que algumas proteínas interagiram com o ligante da coluna, já que as mesmas começaram a ser eluídas da coluna a partir da fração 6. Como essas frações não apresentaram atividade observou-se que as proteínas presentes nessas frações, embora parcialmente puras, não foi a oxidoredutase de interesse, sendo assim,

decidiu-se testar a purificação na coluna SF XL FF, em que a mesma apresentou um perfil de purificação semelhante ao da coluna SP FF.

Com isso, decidiu-se testar outra coluna de troca catiônica (CM FF, Figura 3.24), já que as colunas SP FF e SP XL não se mostraram eficientes nessa etapa de purificação da oxidorreductase.

Figura 3.24: Purificação da oxidoredutase a partir da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 em coluna CM FF HiTrap, 1 mL. Amostra: 18 mg de proteínas; fluxo: 1 mL/min; tampão de ligação: Tris-HCl 20 mmol/L, pH 8,0; tampão de eluição: Tris-HCl 20 mmol/L + NaCl 1.0 mol/L; Condições de eluição: 20 mL de tampão de eluição, gradiente crescente linear de NaCl 0-0,5 mol/L. A linha sólida verde representa % de tampão Tris-HCl carregado de NaCl.

Observou-se no cromatograma obtido da coluna CM XL FF (Figura 3.24) somente 2 picos, porém não bem definidos, o que poderia indicar pouca purificação da oxidoredutase. O que foi confirmado com o teste de atividade

das frações protéicas obtidas dessa coluna, pois somente a fração protéica obtida logo após a aplicação da amostra na coluna apresentou atividade enzimática, como havia ocorrido com as colunas SP FF e SP XL. Também se aplicou algumas amostras obtidas dessa coluna no gel de eletroforese SDS-PAGE (Figura 3.25), com a finalidade de verificar se realmente não houve interação das proteínas com o ligante carboximetil ($-\text{OCH}_2\text{COO}^-$).

Figura 3.25: SDS-PAGE- linhas 1, 3-12 frações 1, 2-11 da coluna CM XL FF; linha 2: BenchMark™ Protein Ladder.

Percebeu-se na Figura 3.25 poucas proteínas de tamanhos variados, representadas pelas bandas entre 25-220 kDa, mostrando-se parcialmente puras. No entanto, as enzimas presentes nessas frações não apresentaram atividade, o que indicou que a oxidoredutase de interesse não se encontrava nessas frações.

De acordo com esses resultados decidiu-se alterar a segunda coluna empregada na purificação da oxidoredutase, em que se usava a coluna de interação hidrofóbica Octyl FF. Aplicou-se as frações 32-54 (obtidas da coluna DEAE FF) na coluna de troca aniônica ANX FF, já que essa coluna tinha apresentado um melhor perfil de purificação da oxidoredutase, com maior grau de pureza, do que a coluna octyl.

3.5.10.6.1 Purificação da oxidoredutase por coluna Cromatográfica de Troca aniônica ANX FF através de FPLC-Akta Purifier

Inicialmente, aplicou-se as proteínas presentes nas frações 32-54, obtidas da coluna DEAE FF, na coluna de troca aniônica ANX FF e a enzima foi eluída com um gradiente crescente de cloreto de sódio (0-1 e 0-0,5 mol/L) em tampão Tris-HCl 20 mmol/L e em 5 passos de eluição com NaCl 0,2-0,5 e 1 mol/L, (Figuras 3.26, 3.28, 3.29).

Figura 3.26: Purificação da oxidorreductase a partir da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 em coluna ANX FF HiTrap, 1 mL. Amostra: 18 mg de proteínas; fluxo: 1 mL/min; tampão de ligação: Tris-HCl 20 mmol/L, pH 8,0; tampão de eluição: Tris-HCl 20 mmol/L + NaCl 1.0 mol/L; Condições de eluição: 20 mL de tampão de eluição, gradiente crescente linear de NaCl 0-1 mol/L. A linha sólida verde representa % de tampão Tris-HCl carregado de NaCl.

De acordo com a Figura 3.26 observou-se que as proteínas foram eluídas nas frações 5-36, em diferentes concentrações de NaCl. Portanto, ao avaliar a atividade enzimática das frações obtidas observou-se atividade enzimática nas frações 20-32 com boas concentrações de cetona (20-32%) e seletividade (75-82%).

Com isso aplicou-se essas frações no SDS-PAGE como mostra a Figura 3.27.

Figura 3.27: SDS-PAGE- linhas 1-3; 5-10: Frações 20, 22, 24, 26, 28, 29, 32 da coluna ANX, respectivamente; linha 4: BenchMark™ Protein Ladder.

De acordo com o SDS-PAGE, Figura 3.27, percebeu-se que as frações 22-32 apresentavam certo grau de pureza, vista pelo menor número de bandas presentes no mesmo, sendo essa coluna indicada para a segunda etapa de purificação da oxidoredutase.

Já que a oxidoredutase presente nas frações 22-32 não estava totalmente pura, decidiu-se testar concentrações menores de proteínas aplicadas na coluna ANX FF em 20 mL de tampão Tris-HCl 20 mmol/L com gradiente crescente linear de NaCl 0-0,5 mol/L, como mostra a Figura 3.28.

Figura 3.28: Purificação da oxidorreductase a partir da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 em coluna ANX FF HiTrap, 1 mL. Amostra: 18 mg de proteínas; fluxo: 1 mL/min; tampão de ligação: Tris-HCl 20 mmol/L, pH 8,0; tampão de eluição: Tris-HCl 20 mmol/L + NaCl 1.0 mol/L; Condições de eluição: 20 mL de tampão de eluição, gradiente crescente linear de NaCl 0-0,5 mol/L. A linha sólida verde representa % de tampão Tris-HCl carregado de NaCl.

Observou-se no cromatograma, Figura 3.28, uma melhor separação nos picos obtidos durante o processo de purificação da oxidorreductase na coluna ANX FF. Sendo assim, testou-se a atividade enzimática presentes em algumas frações obtidas dessa coluna, conforme Tabela 3.5.

Tabela 3.5: Oxidação enantiosseletiva do (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol mediada por oxidorreductase da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 presentes nas frações protéicas da coluna ANX FF.

Reação	Frações Coluna ANX	Cetona/Álcool [%]	Álcool e.e. (%) ^a	TrisHCL + NaCl 1 M (%)
1	1	-	-	0
2	2	-	-	1,3
3	4	-	-	3,9
4	6	-	-	6,5
5	8	-	-	9,0
6	10	-	-	11,7
7	12	-	-	14,2
8	14	-	-	16,9
9	16	-	-	19,5
10	18	-	-	22,1
11	20	-	-	24,7
12	22	-	-	27,3
13	24	-	-	29,8
14	26	-	-	32,6
15	28	2/98	6(<i>R</i>)	35,8
16	30	2/98	6(<i>R</i>)	38,4
17	32	3/97	6(<i>R</i>)	40,8
18	34	3/97	4(<i>R</i>)	43,4
19	36	3/97	4(<i>R</i>)	46,1
20	38	5/95	10(<i>R</i>)	48,6
21	40	6/94	12(<i>R</i>)	50
22	42	7/93	14(<i>R</i>)	50
23	44	2/98	6(<i>R</i>)	50

Condições de reação: (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol (0,25 mmol/L), extrato proteico (200 µL), NAD⁺ (0,3 mmol/L), 20 °C, 160 rpm, 15 h.
^aDeterminado por GC usando uma coluna quiral (Chiral-Dex-CB).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3.5 percebeu-se que a proteína de interesse, encontrava-se nas frações 28-44, pois foram nessas frações que se observou atividade enzimática nas reações de oxidação, embora com valores baixos de concentração de cetona (2-7%) e de seletividade (6-14%). Verificou-se a pureza das proteínas presentes nessas frações através de SDS-PAGE, conforme Figura 3.29.

Figura 3.29: SDS-PAGE- linhas 1-5, 7-15: Frações 28-32, 33-41 da coluna ANX FF, respectivamente; linha 6: BenchMark™ Protein Ladder.

De acordo com o gel da coluna ANX FF, Figura 3.29, observou-se que as frações 32-37 apresentam entre si um perfil semelhante de purificação, vistas pelas poucas bancas.

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 3.5 observou-se que as proteínas começaram a ser eluídas da coluna em concentrações de NaCl de 0,35 mol/L e sendo totalmente eluídas na presença de 0,50 mol/L desse sal. Com isso, decidiu-se mais uma vez melhorar o processo de purificação empregando a coluna ANX FF, porém com 5 passos de eluição com NaCl 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; e 1 mol/L e com 42 mL de eluente e fluxo de 0,5 mL/min, como mostra a Figura 3.30.

Figura 3.30: Purificação da oxidorreductase a partir da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 em coluna ANX FF HiTrap, 1 mL. Amostra: 4 mg de proteínas; fluxo: 0,5 mL/min; tampão de ligação: Tris-HCl 20 mmol/L; tampão de eluição: Tris-HCl 20 mmol/L + NaCl 1.0 mol/L; Condições de eluição: 42 ml de tampão de eluição, 5 passos de eluição com NaCl 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 e 1 mol/L. A linha sólida representa % de tampão Tris-HCl carregado de NaCl.

A Figura 3.30 apresentou o cromatograma obtido da coluna ANX FF, em que foram observados 5 picos em diferentes concentrações de NaCl, o que indicou uma possível melhora no processo de purificação da oxidorreductase.

Avaliou-se a atividade enzimática nas frações obtidas dessa coluna, Tabela 3.6.

Tabela 3.6: Oxidação enantiosseletiva do (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol mediada por oxidorreductase da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 presentes nas frações protéicas da coluna ANX FF.

Reação	Frações Coluna ANX	Cetona/Álcool (%)	Álcool e.e. (%) ^a
1	1	-	-
2	4	-	-
3	5	-	-
4	6	-	-
5	7	-	-
6	8	-	-
7	9	-	-
8	10	-	-
9	11	-	-
10	12	-	-
11	13	-	-
12	14	-	-
13	15	-	-
14	16	-	-
15	17	-	-
16	18	5/95	10(<i>R</i>)
17	19	10/90	17(<i>R</i>)
18	20	5/95	10(<i>R</i>)
19	21	2/98	6(<i>R</i>)
20	22	2/98	6(<i>R</i>)
21	23	2/98	6(<i>R</i>)
22	24	3/97	7(<i>R</i>)
23	25	2/98	6(<i>R</i>)
24	26	2/98	6(<i>R</i>)
25	27	5/95	10(<i>R</i>)
26	28	-	-
27	29	-	-
28	30	-	-

Condições de reação: (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol (0,25 mmol/L), extrato protéico (200 µL), NAD⁺ (0,3 mmol/L), 20 °C, 160 rpm, 15 h. ^aDeterminado por GC usando uma coluna quiral (Chiral-Dex-CB).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3.6 pôde-se perceber que a proteína de interesse concentrava-se nas frações 18-27, com 0,26-1 mol/L de NaCl, em que foram obtidas baixas concentrações de cetona (2-10%) e seletividade (6-17%). Acredita-se que os valores baixos de concentrações de cetona e seletividade podem ter ocorrido devido à pequena quantidade de proteína presente na amostra que foi aplicada na coluna (2 mg). Verificou-se a pureza das proteínas presentes nessas frações através de SDS-PAGE, Figura 3.31.

Figura 3.31: SDS-PAGE- linhas 1-2, 4-13: Frações 17, 18, 19-28 da coluna ANX FF, respectivamente; linha 3: BenchMark™ Protein Ladder.

Observou-se nos resultados da Tabela 3.6 que as frações 18-27 apresentaram atividade enzimática, o que mostrou uma boa interação da proteína com o ligante dietilaminoetil e ao analisar a Figura 3.31, percebeu-se que nessas frações as proteínas apresentaram bom grau de pureza, principalmente as frações 20-28, que apresentaram poucas bandas (linhas de 4-13).

De acordo com esses resultados decidiu-se realizar outras colunas ANX FF empregando essa metodologia, porém com quantidade maior de proteínas (4 mg). Com isso, decidiu-se coletar em tubos separados as frações 11-14, 15-17, 18-19, 20-21, 22-24, 25-26, 27. Avaliou-se a atividade enzimática nessas frações, Tabela 3.7.

Tabela 3.7: Oxidação enantiosseletiva do (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol mediada por oxidorreductase da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 presentes nas frações protéicas da coluna ANX FF.

Reação	Frações Coluna ANX	Cetona/Álcool (%) ^a	Álcool e.e.(%) ^a
1	11-14	19/81	27(<i>R</i>)
2	15-17	18/82	34(<i>R</i>)
3	18-19	17/83	31(<i>R</i>)
4	20-21	15/85	27(<i>R</i>)
5	22-24	7/93	14(<i>R</i>)
6	25-26	6/94	12(<i>R</i>)
7	27	3/97	11(<i>R</i>)
Condições de reação: (<i>R,S</i>)-1-(4-metilfenil)etanol (0,25 mmol/L), extrato proteico (200 µL), NAD ⁺ (0,3 mmol/L), 20 °C, 160 rpm, 15 h. ^a Determinado por GC usando uma coluna quiral (Chiral-Dex-CB)			

Conforme os resultados apresentados na Tabela 3.7 as 4 frações iniciais mostraram uma razão cetona/álcool muito parecidas (15-19%, entradas 1-4), bem como os excessos enantioméricos do (*R*)-álcool (27-34%, entradas 1-4). Esses valores foram decrescendo nas frações seguintes, em que a razão cetona/álcool e os excessos enantioméricos foram baixos (3-7% e 11-14%, respectivamente; entradas 5-7).

Conforme esses resultados, decidiu-se realizar a Zimografia para determinar a massa molecular aproximada da oxidorreductase de interesse, como mostra o item 3.5.10.7.

3.5.10.7. Zimograma *native-PAGE*

Aplicou-se a técnica de zimografia nas frações 11-14, 15-17, 18-19, 20-21, 22-24, 25-26, 27, obtidas da coluna ANX FF (concentradas em membranas de 10 kDa), com a finalidade de confirmar a presença da oxidoredutase Figura 3.32.

Figura 3.32: *native-PAGE*-Teste de atividade da oxidoredutase - linhas 1, 2, 4-7: Frações 11-14, 15-17, 18-19, 20-21, 22-24, 25-26, 27 da coluna ANX, respectivamente; linha 3: NativeMark™ Unstained Protein Standard.

Observou-se em cada fração protéica (Figura 3.32; linhas 1, 2, 4-7) uma banda escura no gel de eletroforese referente ao produto da reação de oxidação, catalisada pela oxidoredutase, em que ocorreu a redução de NAD^+ , que estava acoplado à redução do metossulfato de fenazina, que por sua vez estava acoplada à redução do cloreto de idonitrotetrazólio, produzindo-se um precipitado de formazano, de cor azul, onde a enzima estava imobilizada no gel.

Não se observou uma banda escura na linha 3 da Figura 3.32 devido essa amostra ser o marcador de proteínas, que não poderia reagir com os reagentes anteriores, já que nessa fração não existia uma oxidoredutase.

Corou-se o gel com Coomassie Blue do teste de atividade da oxidorreductase, Figura 3.32, com Coomassie Blue Figura 3.33.

Figura 3.33: *native*-PAGE- linhas 1, 2, 4-7: Frações 11-14, 15-17, 18-19, 20-21, 22-24, 25-26, 27 da coluna ANX, respectivamente; linha 3: NativeMark™ Unstained Protein Standard.

De acordo com as bandas observadas no *native*-PAGE, Figura 3.33, percebeu-se que a oxidorreductase estava parcialmente pura, vista pelo número pequeno de bandas em cada fração obtida da coluna ANX FF.

Conforme o marcador de proteína (NativeMark™ Unstained Protein Standard) apresentado no gel de teste de atividade da oxidorreductase (linha 3) e das correspondentes bandas apresentadas nas frações proteicas, observou-se que a oxidorreductase tem uma massa de aproximadamente 240 kDa, pois essa banda foi a detectada no zimograma, Figura 3.33.

Com isso, foi possível realizar o SDS-PAGE com a oxidorreductase presente nessa banda, Figura 3.34, objetivando determinar quantas subunidades essa enzima apresentava, uma vez que este gel é desnaturante. Para esse estudo,

recortou-se portanto, a banda 240 kDa (gel native-PAGE, Figura 3.32) e aplicou-se no SDS-PAGE (Figura 3.34).

Figura 3.34: SDS-PAGE- linha 1: BenchMark™ Protein Ladder; linha 2: Proteína presente na fração 15-17 da coluna ANX FF.

Observou-se no SDS-PAGE, Figura 3.34, que esta enzima provavelmente se encontrava na forma hetero-hexamérica, apresentando três subunidades em ~35 e três em ~45 kDa.

Após encontrar as frações, com a oxidoredutase de interesse, realizaram-se várias colunas DEAE FF e ANX FF, para que se pudesse avaliar a atividade dessa enzima em outros substratos, bem como sua caracterização.

3.5.10.8. Determinação da Atividade Específica da oxidoredutase da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 que catalisa a oxidação enantiosseletiva de alcoóis.

O resumo do processo de purificação da oxidoredutase a partir da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 está demonstrado na Tabela 3.8.

Tabela 3.8: Purificação da oxidoredutase a partir da *Arthrobacter* sp.

	Proteína (mg)	Unidade ^a	Atividade específica (U/mg)	Pureza da proteína/Etapa de purificação
Extrato bruto	1500	0,0186	0,85	1
DEAE FF	337	0,0074	2,12	2,49
ANX FF (Frações 15-17)	4,71	0,0037	4,23	4,98
^a Uma unidade é definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir 1 µmol de NAD ⁺ para NADH em um minuto, calculado na oxidação do (R,S)-1-(4-metilfenil)etanol.				

A oxidoredutase foi purificada 4,98 vezes a partir do extrato bruto, através das colunas de troca aniônica DEAE FF e ANX FF (Tabela 3.8, entrada 4). Esse cálculo foi realizado dividindo a atividade específica de cada etapa de purificação pela atividade específica do extrato bruto.

A atividade específica da oxidoredutase aumentou de 0,85 do extrato bruto (entrada 1) para 4,23 após a coluna ANX FF (entrada 4). Este aumento na atividade específica significou, naturalmente, que o procedimento adotado eliminou proteínas indesejadas nessas colunas de troca aniônica.

Observou-se também que somente 0,0037 µmol de oxidoredutase era necessária para reduzir 1 µmol de NAD⁺ por minuto (entrada 4), já no extrato bruto era necessário 0,0186 µmol de oxidoredutase (entrada 2). De acordo com esses resultados comprovou-se que a oxidoredutase estava bem mais pura na última etapa de purificação.

Pôde-se perceber que a quantidade de oxidoredutase obtida na etapa final da purificação (4,71 mg, entrada 4) foi bem inferior ao presente no extrato bruto

(1500 mg, entrada 1). Isso mostrou que inicialmente existiam outras proteínas presentes no extrato bruto que foram eliminadas nas etapas de purificação.

3.5.10.9. Oxidação enantiosseletiva dos (R,S)-alcoóis 1-3 mediada pela oxidorredutase da *Arthrobacter* sp. CCT 7749

Avaliou-se a atividade da oxidorredutase presente nas frações 15-17, da coluna ANX FF, na reação de oxidação dos alcoóis *para*-substituídos (Tabela 3.9).

Tabela 3.9: Oxidação enantiosseletiva de alcoóis mediada pela Oxidorredutase da *Arthrobacter* sp. CCT 7749.

Substrato	Tempo (h)	Cetona/Álcool (%)	Álcool e.e. (%) ^a
Me	24	35/65	61(<i>R</i>)
(CH ₃) ₃ Si	24	18/82	32(<i>R</i>)
OMe	24	42/58	60(<i>R</i>)

Condições de reação: substrato (1 μmol/L); extrato protéico (200 μL), NAD⁺ (0,3 mmol/L), 20 °C, 160 rpm.
^aDeterminado por GC usando uma coluna quiral (Chiral-Dex-CB).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3.9 observou-se que a oxidorredutase apresentou boa atividade, com boas concentrações de cetona (18-42%) e moderadas seletividades (32-61%).

3.5.10.10. Redução enantiosseletiva da 4-metilacetofenona catalisada pela oxidorreductase sob atmosfera de N₂ e Ar.

Como era conhecida a presença de outra oxidorreductase que poderia catalisar a redução enantiosseletiva da 4-metilacetofenona, bem como de cetonas contendo hetero-átomos, conforme resultados apresentados no capítulo 2, decidiu-se testar a reação de redução enantiosseletiva da 4-metilacetofenona catalisada pela oxidorreductase presente nas frações 15-17 da coluna ANX FF, sob atmosfera de N₂ e Ar Tabela 3.10.

Tabela 3.10: Redução enantiosseletiva da 4-metilacetofenona mediada pela Oxidorreductase da *Arthrobacter* sp. CCT 7749.

Reação	Tempo (h)	Atmosfera	Álcool/Cetona (%) ^b	Álcool e.e. (%) ^c
1	3	Ar	3/97	>99 (S)
2	8	Ar	5/95	>99 (S)
3	3	N ₂	17/83	>99 (S)
4	8	N ₂	20/80	>99 (S)

Condições de reação: substrato (1 µmol/L); oxidorreductase (0,289 mg), NADH (0,3 mmol/L), 20 °C, 160 rpm, 3 e 8 h. ^aDeterminado por GC usando uma coluna quiral (Chiral-Dex-CB).

De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 3.10, observou-se que, surpreendentemente, as frações 15-17, apresentaram ambas as oxidorreductases, já que se observou 17% do (S)-1-(4-metilfenil)etanol, com excesso enantiomérico >99% (entrada 3), na redução da 4-metilacetofenona, sob atmosfera de N₂, com apenas 3 h de reação. Essa conversão aumentou para 20% com 8 h de reação, mantendo o excesso enantiomérico do álcool >99% (entrada 4).

Por outro lado, as reações em sistema de ar, em 3 e 8 h, mostraram baixas conversões (3 e 5%, respectivamente, entradas 1 e 2), apesar do excesso enantiomérico do (S)-4-(metilfenil)etanol ter sido > 99%, em ambos os tempos reacionais.

Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos no capítulo 2, em que as reduções enantiosseletivas foram catalisadas por oxidorredutases presentes nas células da *Arthrobacter* sp. e que as melhores conversões foram obtidas nas reações realizadas sob atmosfera de N₂.

Conforme esses resultados, decidiu-se testar a atividade específica dessa oxidorredutase, Tabela 3.11.

Tabela 3.11: Atividade específica da oxidorredutase a partir da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 na redução da 4-metilacetofenona.

	Proteína (mg)	Atividade específica (U/mg)
Extrato bruto	1500	0,22
DEAE FF	337	0,22
ANX FF (Frações 15-17)	4,71	0,22

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3.11 observou-se que a oxidorredutase apresentou a mesma atividade específica em ambas às etapas de purificação, bem como no extrato bruto (0,22 U/mg; entradas 1-3). Não se observou aumento na atividade específica, provavelmente devida os testes não terem sido realizados sob atmosfera de N₂, condições que favoreceriam a atividade dessa enzima, como haviam sido observada

anteriormente, Tabela 3.10. Esses testes não foram realizados sob atmosfera de N₂ devido indisponibilidade de equipamento apropriado para esse fim.

Conforme esses resultados, não foram possíveis verificar os fatores de purificação da oxidorredutase, o que mostraria o quão pura estaria a oxidorredutase em cada etapa da purificação, apesar do gel *native*-PAGE ter mostrado poucas bandas nas frações 15-17, da coluna ANX FF (Figura 3.33, linha 2).

3.6. CONCLUSÕES

Observou-se que a lise celular da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 ocorreu com o emprego da liticase na presença de β -mercaptoetanol e usando ondas ultrassônicas.

Dentre as colunas cromatográficas utilizadas para a purificação da oxidoredutase as de troca aniônicas DEAE FF e ANX FF foram as mais eficientes.

Pôde se perceber que a atividade específica da oxidoredutase aumentou de 0,85 do extrato bruto para 4,23 após a coluna ANX FF, mostrando que o procedimento adotado eliminou proteínas indesejadas nessas colunas de troca aniônica.

Observou-se também que somente 0,0037 μmol de oxidoredutase era necessária para reduzir 1 μmol de NAD^+ por minuto , já no extrato bruto foi necessário 0,0186 μmol de oxidoredutase o que indicou que a oxidoredutase estava bem mais pura na última etapa de purificação.

Com o *native*-PAGE e a zimografia detectou-se que a oxidoredutase apresentou massa molecular de ≈ 240 kDa e que o SDS-PAGE mostrou que essa enzima provavelmente se encontrava na forma hetero-hexamérica apresentando três subunidades em ~ 35 kDa e três em ~ 45 kDa.

Essa enzima parcialmente purificada catalisou a oxidação do (S)-enantiômero dos alcoóis *para*-substituídos derivados do (R,S)-1-(metilfenil)etanol para as cetonas correspondentes, que levou a boas conversões e seletividade.

Observou-se que, surpreendentemente, a fração protéica parcialmente pura foi capaz de reduzir a 4-metilacetofenona obtendo 17% do (S)-1-(4-metilfenil)etanol com excelente excesso enantiomérico >99%.

3.7. PARTE EXPERIMENTAL

3.7.1. Obtenção dos alcoóis racêmicos

Os alcoóis **1-4** foram preparados e caracterizados de acordo com a metodologia descrita por nosso grupo anteriormente [ARAÚJO 2010] (Esquema 3.35). Já o álcool-**5** foi preparado e caracterizados de acordo com metodologia descrita na literatura [PALMEIRA et al. 2011] (Esquema 3.35).

Figura 3.35: Alcoóis racêmicos selecionados para a oxidação enantiosseletiva.

3.7.2. PREPARAÇÃO DO EXTRATO PROTÉICO

Todos os materiais empregados no preparo do extrato protéico estavam sob condições assépticas e foram manuseados em capela de fluxo laminar.

3.7.2.1. Pré-inóculo: Ativação da *Arthrobacter* sp.

Transferiu-se a *Arthrobacter* sp. CCT 7749 do meio de cultura sólido MCBE7 ao meio de cultura líquido MCBE7, com o auxílio de uma alça de platina, e adicionou-se à solução do indutor [(R,S)-1-(fenil)etanol- 100 mmol/L]. Incubou-se por 48 horas a 20 °C sob agitação orbital, 160 rpm.

3.7.2.2. Inóculo: Crescimento da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 para obtenção de massa celular

Transferiu-se 100 mL do pré-inóculo a um frasco Erlenmeyer de 2 L contendo 1 L de meio de cultura MCBE7, com o auxílio de uma proveta (100 mL), e adicionou-se 10 mL da solução do indutor [(R,S)-1-(fenil)etanol, 100 mmol/L]. Incubou-se por dois dias a 20 °C sob agitação orbital, 160 rpm.

3.7.2.3. Centrifugação/suspensão: Separação das células da *Arthrobacter* sp. CCT 7749 e suspensão em solução tampão ou dextrose

O meio de cultura contendo as células (1000 mL) foi centrifugado a 5000 rpm (10 °C por 20 minutos). Durante a centrifugação houve a formação de uma massa celular que ficou depositada no fundo do tubo da centrífuga, o sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em solução tampão, conforme itens abaixo:

3.7.2.4. Suspensão das células em tampão fosfato ou Tris-HCl

As células obtidas da centrifugação do meio de cultura foram suspensas em 20 mL de solução tampão fosfato (20 mmol/L, pH 7,0) ou Tris-HCl (10, 20 , 30,

40 e 50 mmol/L, pH 8,0). Após a suspensão das células, adicionou-se 40 µL da solução de cloreto de magnésio (MgCl_2 , 1 mmol/L), 20 µL de solução de *ácido dietileno-triamina-pentacético* (DTPA, 100 mmol/L) e 100 µL da solução de *fenil-metano(sulfonil)fluoreto* (PMSF, 200 mmol/L). Ao término desta etapa, iniciou-se a ruptura das células. Os tampões fosfato (20 mmol/L, pH 7,0) e Tris-HCl (10, 20, 40, 30 e 50 mmol/L, pH 8,0) foram empregados separadamente na suspensão celular.

3.7.2.5. Suspensão das células em tampão Tris-HCl 20 mmol/l com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)

As células obtidas da centrifugação do meio de cultura foram suspensas em 20 mL de uma solução de EDTA 7 mmol/L (2,92 mg/20 mL de tampão Tris-HCl 20 mmol/L). Após a suspensão das células, adicionou-se 9,75 µL de β -mercaptoetanol, 40 µL da solução de cloreto de magnésio (MgCl_2 , 1 mmol/L), 20 µL de solução de *ácido dietileno-triamina-pentacético* (DTPA, 100 mmol/L) e 100 µL da solução de *fenil-metano(sulfonil)fluoreto* (PMSF, 200 mmol/L). Ao término desta etapa, iniciou-se a ruptura das células.

3.7.2.6. Suspensão das células em tampão Tris-HCl 20 mmol/l com triton x-100.

As células obtidas da centrifugação do meio de cultura foram suspensas em 20 mL de uma solução de EDTA 7 mmol/L (2,92 mg/20 mL de tampão Tris-HCl 20 mmol/L). Após a suspensão das células, adicionou-se 9,75 µL de β -mercaptoetanol, 40 µL da solução de cloreto de magnésio (MgCl_2 , 1 mmol/L),

20 µL de solução de *ácido dietileno-triamina-pentacético* (DTPA, 100 mmol/L) e 100 µL da solução de *fenil-metano(sulfonil)fluoreto* (PMSF, 200 mmol/L). Ao término desta etapa, iniciou-se a ruptura das células.

3.7.2.7. Suspensão das células em tampão TrisHCl 20 mmol/L com dextrose

As células obtidas da centrifugação do meio de cultura (conforme item 3.7.2.3) foram suspensas em 20 mL de uma solução dextrose (1,8 g/20 mL de tampão TrisHCl 20 mmol/L). Após a suspensão das células, adicionou-se 100 µL da solução de liticase (2,8 g/100 µL de tampão TrisHCl 20 mmol/L) ou 100 µL da solução lisozima (6,25 g/100 µL tampão TrisHCl 20 mmol/L) e 2,4 µL de β-mercaptoetanol. Esta solução permaneceu sob agitação por 30 minutos (50 rpm, 20 °C). Ao término desta etapa, deixou-se a solução em repouso por 40 minutos, depois as células foram centrifugadas a 5000 rpm (10°C por 30 minutos). Durante a centrifugação houve a formação de uma massa celular que ficou depositada no fundo do tubo da centrífuga, o sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 20 mL de uma solução de tampão fosfato 20 mmol/L. Após a suspensão das células, adicionou-se 40 µL da solução de cloreto de magnésio (MgCl₂, 1 mmol/L), 20 µL de solução de *ácido dietileno-triamina-pentacético* (DTPA, 100 mmol/L) e 100 µL da solução de *fenil-metano(sulfonil)fluoreto* (PMSF, 200 mmol/L). Ao término desta etapa, iniciou-se a ruptura das células.

3.7.3. RUPTURA DAS CÉLULAS BACTERIANA/CENTRIFUGAÇÃO DAS CÉLULAS

3.7.3.1. Ruptura das células bacteriana em prensa francesa

Colocou-se 20 mL da solução tampão/células (fosfato 20 mmol/L, pH 7,0) na prensa francesa (French Pressure Cell Press, Sim Aminco, Figura 3.36) sob banho de gelo. Aplicou-se uma pressão de 2000 psi. Repetiu-se 5 vezes este procedimento. A solução resultante foi centrifugada por 60 min a 4 °C e 9000 rpm. Restos de células foram descartados e o sobrenadante foi reservado para estudos posteriores.

Figura 3.36: Prensa francesa.

3.7.3.2. Ruptura das células bacteriana em ultra-turrax

Colocou-se 20 mL da solução tampão/células (fosfato 20 mmol/L, pH 7,0) em tubo Falcon (50 mL). As células foram rompidas, sob banho de gelo, em ultra-turrax (modelo T 25 basic IKA-Werke, Figura 3.37) a 24.000 psi, durante 15 minutos com intervalos de repouso de 3 minutos. A solução resultante foi centrifugada por 60 min a 4 °C e 9000 rpm. Restos de células foram descartados e o sobrenadante foi reservado para estudos posteriores.

Figura 3.37: *Ultra-Turrax.*

3.7.3.3. Ruptura das células utilizando ultrassom

Colocou-se 20 mL da solução tampão/células (fosfato 20 mmol/L, pH 7,0) ou (Tris-HCl 10, 20, 30, 40 ou 50 mmol/L, pH 8,0) em tubo de plástico (50 mL), sob-banho de gelo. Aplicou-se ultrassom (Branson Digital Sonifier, modelo 250, Figura 3.38) com amplitudes de 40, 50, 55, 60 e 70% com pulsos de 10, 20, 30, 40 e 59 segundos, por 6, 12, 20, 25 e 30 minutos a intervalos de 10, 20, 30, 40, 50 e 59 segundos. A solução resultante foi centrifugada por 60 min a 4°C e

9000 rpm. Restos de células foram descartados e o sobrenadante (extrato protéico) foi reservado para estudos posteriores.

Também foram testados dois tipos de micro-pontas [1/2" (13 mm) e 3/4" (3 mm)] na ruptura celular bacteriana com amplitudes de 40, 50, 60 e 70% com pulsos de 10, 20, 30, 40 e 59 segundos, por 6, 12, 20 e 30 minutos a intervalos de 10, 20, 30, 40, 50 e 59 segundos.

Figura 3.38: *Ultrassom.*

3.7.4. OBSERVAÇÃO DA LISE CELULAR

Para verificar a lise celular, posicionou-se a solução resultante do rompimento celular (sobrenadante) entre a lâmina e a lamínula e observou-se em microscópio óptico (Bel photonics) com aumento de 1000 vezes (usando óleo de imersão). Empregou-se a fucsina na amostra para aumentar o contraste e facilitar a visualização.

3.7.5. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA

3.7.5.1. Proteínas precipitadas com sulfato de amônio

Em microtubos de 2 mL, sob banho de gelo, colocou-se 1 mL de extrato protéico, em seguida, adicionou-se aos poucos sulfato de amônio. Foram testadas diferentes concentrações de sulfato de amônio (20, 30, 40, 50 e 60 %), em que se agitou lentamente a solução durante a adição de sulfato. Este procedimento foi realizado com todo o extrato protéico obtido nos itens 3.7.3.1 e 3.7.3.3. As soluções resultantes foram centrifugadas por 60 min à 4 °C e 9000 rpm. Restos de células foram descartados e foi analisada a atividade enzimática na reação de oxidação enantiosseletiva do (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol presente no sobrenadante. Para verificar o tempo necessário para a oxidação do (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol, decidiu-se analisar 3, 6 e 24 horas de reação, utilizando-se o sobrenadante precipitado em 20, 30, 40, 50 e 60 % de sulfato de amônio juntamente com o NAD⁺ ou NADP⁺.

3.7.5.2. Purificação por membranas e colunas cromatográficas de interação hidrofóbicas realizadas manualmente

O extrato protéico usado para a purificação enzimática presente na *Arthrobacter* sp. CCT 7749 foi concentrado em membrana de celulose regenerada 10 kDa (Millipore, 15 mL, limite protéico: 20 mg/mL), depois foi aplicado em colunas cromatográficas de interação hidrofóbica (Phenyl FF (high sub), Phenyl FF (low sub), Butyl FF, Butyl-S FF, Octyl FF, Hi-trap 1,0 mL; Limite protéico: 50 mg/mL). As proteínas foram eluídas com diferentes concentrações

de sulfato de amônio (1; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0 mol/L de cada solução) em tampão fosfato 20 mmol/L e de cloreto de sódio (1; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0 mol/L de cada solução) em tampão fosfato 20 mmol/L, com fluxo de 1 mL/min. Após o término da cromatografia as colunas eram lavadas com 3 mL de H₂O. As amostras e os eluentes foram aplicados nas colunas, manualmente, com o auxílio de seringas de 1 mL (Figura 3.40). Em seguida, analisou-se a atividade enzimática nas frações obtidas na reação de oxidação do álcool (*R,S*)-1-(4metilfenil)etanol, com a adição de NAD⁺.

Aplicou-se as frações com atividade no gel de eletroforese (SDS–PAGE). As frações que apresentaram semelhanças nas bandas foram filtradas na membrana de celulose regenerada 100 kDa (Millipore 15 mL, limite protéico: 20 mg/mL), o filtrado foi aplicado em outra membrana de celulose, 50 kDa (Millipore, 15 mL, limite protéico: 20 mg/mL). Mais uma vez aplicou-se o filtrado em outra membrana, porém de 10 kDa (Millipore, 15 mL, limite protéico: 20 mg/mL).

As membranas utilizadas na filtração das proteínas foram centrifugadas a 5000 rpm, 20° C por 20 min.

Figura 3.39: Colunas cromatográficas realizadas manualmente com auxílio de uma seringa.

3.7.5.3. Purificação por membranas e colunas cromatográficas de interação hidrofóbicas através de bomba de seringa

O extrato protéico usado para a purificação enzimática presente na *Arthrobacter* sp. CCT 7749 foi concentrado em membrana de celulose de 10 kDa depois foi aplicado em colunas cromatográficas de interação hidrofóbica (Phenyl FF (high sub), Phenyl FF (low sub), Butyl FF, Butyl-S FF, Octyl FF, Hi-trap 1,0 mL; Limite protéico: 50 mg/mL) com auxílio de uma bomba de seringa (syringe pump- modelo 341 A, Figura 3.40. As proteínas foram eluídas com diferentes concentrações de sulfato de amônio (1; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0 mol/L, 3 mL de cada solução) em tampão fosfato e de cloreto de sódio (1; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0 mol/L, 3 mL de cada solução) em tampão fosfato 20 mmol/L, com fluxo de 1 mL/min. Após o término da cromatografia as colunas eram lavadas com 3 mL de H₂O. As amostras foram aplicadas nas colunas com o auxílio de seringas de 1mL. Em seguida,

analisou-se a atividade enzimática nas frações obtidas na reação de oxidação do álcool (*R,S*)-1-(4metilfenil)etanol, com a adição de NAD^+ .

Aplicou-se as frações com atividade no gel de eletroforese (SDS-PAGE). As frações que apresentaram semelhanças nas bandas foram filtradas na membrana de 100 kDa, o filtrado foi aplicado em outra membrana, 50 kDa. Mais uma vez aplicou-se o filtrado em outra membrana, porém de 10 kDa.

As membranas utilizadas na concentração das proteínas foram centrifugadas a 5000 rpm, 20° C por 20 min.

Figura 3.40: Colunas cromatográficas de Interação hirofóbica ou de troca iônica realizadas através de uma bomba de seringa.

3.7.5.4. Purificação por membrana de celulose regenerada e colunas cromatográficas de troca iônica através de bomba de seringa

O extrato protéico usado para a purificação enzimática presente na *Arthrobacter* sp. CCT 7749 foi concentrado em membrana de celulose regenerada 10 kDa (Millipore, 15 mL, limite protéico: 20 mg/mL), depois foi aplicado em colunas de troca iônica (DEAE FF, QXL, QFF, SP XL, SP FF, CM FF, ANX FF, Hi-trap 1,0 mL; Limite protéico: 50 mg/mL) com auxílio de uma bomba de seringa (syringe pump- modelo 341 A, Figura 3.40). As proteínas foram eluídas com diferentes concentrações de sulfato de amônio em tampão fosfato 20 mmol/L, (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7,; 0,8; 0,9; 1 mol/L, 3 mL de cada solução) e de cloreto de sódio (0, 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7,; 0,8; 0,9; 1 mol/L, 3 mL de cada solução) em tampão fosfato 20 mmol/L, com fluxo de 1 mL/min. Após o término da cromatografia as colunas eram lavadas com 3 mL de H₂O. As amostras foram aplicadas nas colunas com o auxílio de seringas de 1mL. Em seguida, analisou-se a atividade enzimática nas frações obtidas na reação de oxidação do álcool (*R,S*)-1-(4metilfenil)etanol, com a adição de NAD⁺.

Aplicou-se as frações com atividade no gel de eletroforese (SDS–PAGE). As frações que apresentaram semelhanças nas bandas foram filtradas na membrana de 100 kDa, o filtrado foi aplicado em outra membrana, 50 kDa. Mais uma vez aplicou-se o filtrado em outra membrana, porém de 10 kDa.

As membranas utilizadas na concentração das proteínas foram centrifugadas a 5000 rpm, 20° C por 20 min.

3.7.5.5. Purificação por coluna cromatográfica de troca iônica através de FPLC- AKTA purifier

O extrato protéico usado para a purificação enzimática presente na *Arthrobacter* sp. CCT 7749 foi concentrado em membrana de 10 kDa e depois foi aplicado em colunas de troca iônica (DEAE FF, QXL, QFF, SP XL, SP FF, CM FF, ANX FF, Hi-trap 1,0 mL; Limite protéico: 50 mg/mL) com auxílio equipamento FPLC AKTA Purifier (GE Healthcare com detector de absorção no UV em 280 nm combinado com monitor UPC-900 e coletor de frações, Frac-920, Figura 3.41). As proteínas foram eluídas com um gradiente crescente de cloreto de sódio (0-100 mol/L, volume total: 20 mL) em tampão TrisCl 20 mmol/L com fluxo de 1 mL/min. Em seguida, analisou-se a atividade enzimática nas frações obtidas na reação de oxidação do álcool (*R,S*)-1-(4metilfenil)etanol, com a adição de NAD⁺.

As frações com atividade foram aplicadas no gel de eletroforese (SDS–PAGE).

A membrana de celulose utilizada na concentração das proteínas foi centrifugada a 5000 rpm, 20° C por 20 min.

Figura 3.41: Equipamento FPLC AKTA Purifier (GE Healthcare).

3.7.5.6. Purificação por coluna cromatográfica de troca aniônica DEAE FF através de FPLC- AKTA purifier

O extrato protéico usado para a purificação enzimática presente na *Arthrobacter* sp. CCT 7749 foi concentrado na membrana de 10 kDa e depois foi aplicado na coluna de troca iônica DEAE FF, com auxílio do equipamento FPLC AKTA Purifier (GE Healthcare, Figura 3.41). As proteínas foram eluídas em 5 passos, com diferentes concentrações de cloreto de sódio (0,15; 0,18; 0,26; 0,50 e 1 mol/L, volume total empregado em cada concentração: 14, 10, 20, 3, 3 mL, respectivamente) em tampão Tris-HCl 20 mmol/L com fluxo de 1 mL/min. Em seguida, analisou-se a atividade enzimática nas frações obtidas na reação de oxidação do álcool (*R,S*)-1-(4metilfenil)etanol, com a adição de NAD^+ .

As frações com atividade foram aplicadas no gel de eletroforese (SDS–PAGE). As frações que apresentaram semelhanças nas bandas (32-54) foram concentradas na membrana de 10 kDa.

3.7.5.7. Purificação por coluna cromatográfica de troca catiônica (SP XL, SP FF, CM FF) através de FPLC- AKTA purifier

Aplicou-se as proteínas presentes nas frações 32-54, obtidas da coluna de troca aniônica (DEAE FF, item 3.7.5.6), em colunas de troca catiônica (SP XL, SP FF, CM FF, Hi-trap 1,0 mL; Limite protéico: 50 mg/mL). As proteínas foram eluídas com um gradiente crescente de cloreto de sódio (0-0,5 mol/L, volume total 20 mL) em tampão Tris-HCl 20 mmol/L. Em seguida, analisou-se a atividade enzimática nas frações obtidas.

3.7.5.8. Purificação por coluna cromatográfica de troca aniônica (ANX FF) através de FPLC- AKTA purifier

Aplicou-se as proteínas presentes nas frações 32-54, obtidas da coluna de troca aniônica (DEAE FF, item 3.7.5.6) na coluna de troca aniônica ANX FF. As proteínas foram eluídas com um gradiente crescente de cloreto de sódio (0-1 mol/L, volume total: 20 mL) e (0-0,5 mol/L, volume total 20 mL) em tampão Tris-HCl 20 mmol/L com fluxo de 1 mL/min. Em seguida, analisou-se a atividade enzimática nas frações obtidas.

Também se aplicou as proteínas presentes nas frações 32-54 (DEAE FF) na coluna ANX FF em que as proteínas foram eluídas em 5 passos, com diferentes concentrações de NaCl (0,2; 0,3; 0,4; 0,5; e 1 mol/L, volume total

empregado em cada concentração: 14, 10, 20, 3, 3 mL, respectivamente) em tampão Tris-HCl 20 mmol/L com fluxo de 0,5 mL/min. Em seguida, analisou-se a atividade enzimática nas frações obtidas.

As frações com atividade foram aplicadas no gel de eletroforese (SDS-PAGE). As frações que apresentaram semelhanças nas bandas (11-14, 15-17, 18-19, 20-21, 22-24, 25-26, 27) foram concentradas na membrana de 10 kDa.

3.7.5.9. Purificação por coluna cromatográfica de interação hidrofóbica (OCTYL FF) através de FPLC- AKTA purifier

As proteínas presentes nas frações 32-54, obtidas da DEAE FF, foram aplicadas em coluna cromatográfica de Interação hidrofóbica (Octyl FF) e as proteínas foram eluídas com um gradiente decrescente de sulfato de amônio (0-1 mol/L, volume total 20 mL) e (0-0,5 mol/L, volume total 20 mL) em tampão fosfato 20 mmol/L, pH 7,0 com fluxo de 1 mL/min. Em seguida, analisou-se a atividade enzimática nas frações obtidas.

As frações com atividade foram aplicadas no gel de eletroforese (SDS-PAGE). As frações que apresentaram semelhanças nas bandas (26-40) foram concentradas na membrana de 10 kDa.

3.7.5.10. Purificação por coluna cromatográfica de troca aniônica através de FPLC- AKTA purifier

As proteínas presentes nas frações 26-40, obtidas da coluna Octyl FF (item 3.7.5.9), foram aplicadas em colunas cromatográficas de troca iônica (ANX, SP XL, SP FF e CM FF, Hi-trap 1,0 mL). As proteínas foram eluídas com um

gradiente crescente de cloreto de sódio (0-0,5 mol/L, volume total 20 mL) em tampão Tris-HCl 20 mmol/L com fluxo de 1 mL/min. Em seguida, analisou-se a atividade enzimática nas frações obtidas.

3.7.5.11. Purificação por coluna cromatográfica de afinidade através de gravidade

As proteínas presentes nas frações 26-40, obtidas da coluna Octyl FF (item 3.7.5.9), foram aplicadas em colunas cromatográficas de afinidade: Mimetic Orange® 3 A6XL, Blue® 1 P6XL, Red® 2 A6XL, Green® 1 A6XL (kit PIKSI™ ProMetic Life Sciences, 1 mL, Figura 3.42). As proteínas foram eluídas com um gradiente crescente de cloreto de sódio (0-1 mol/L, volume final 20 mL por gravidade) em tampão fosfato 20 mmol/L. Em seguida, analisou-se a atividade enzimática nas frações obtidas.

Figura 3.42: Colunas cromatográficas de afinidades realizadas através de gravidade.

3.7.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para o(a) extrato/fração protéico (a) obtido(a) anteriormente, uma alíquota de 200 μL foi transferida para microtubo contendo 0,136 μL de (*R,S*)-1-(metilfenil)etanol (1 ηmol), 594 μL de solução tampão fosfato (20 mmol/L) e 206 μL de solução de NAD^+ (0,44 $\mu\text{mol/L}$). Os microtubos foram mantidos a 20 $^{\circ}\text{C}$ sob agitação (800 rpm, Thermomixer) por 3 horas. Adicionou-se ao microtubo éter metil *tert*-butilico (2,0 mL), agitou-se com agitador de tubos, seguido de centrifugação (6000 rpm). A fase orgânica foi analisada por CLAE equipado com uma coluna quiral (Chiralpak[®] AD-H) e GC contendo coluna β -ciclodextrina (25 m x 0,32 milímetros x 0,25 mM, Varian CP-Chirasil-DEX CB), conforme item 2.7.6.9, capítulo 2.

3.7.7. DETERMINAÇÃO PROTÉICA

As concentrações das proteínas solúveis foram determinadas pelo método de Bradford [BRADFORD 1976], utilizando albumina de soro bovino como padrão, onde 50 μL de amostra foi misturada com 1500 μL do reagente de Bradford (Aldrich, B6916), sendo medida em espectrofotômetro (Biospectro modelo sp-220) com um caminho de luz de 1 cm com A_{595} .

3.7.8. GEL DE ELETROFORESE SOBRE CONDIÇÕES DESNATURANTES

3.7.8.1. Preparação das soluções estoque

1. Tris-HCl 1 mol/L, pH 8,8

Pesou-se, em béquer de 500 mL, 24,2 g de Tris. Seguiu-se adicionando 150 mL de água MilliQ e o ajuste do pH para 8,8 foi realizado com ácido clorídrico concentrado (aproximadamente 3 mL). Completou-se a solução a um volume final de 200 mL.

2. *Tris-HCl 1 mol/L, pH 6,8*

Pesou-se, em béquer de 500 mL, 24,2 g de Tris. Seguiu-se adicionando 150 mL de água MilliQ e o ajuste do pH para 6,8 foi realizado com ácido clorídrico concentrado (aproximadamente 6 mL). Completou-se a solução a um volume final de 200 mL.

3. *Solução de azul de bromofenol 1 %*

Pesou-se, em béquer de 50 mL, 50 mg de azul de bromofenol, sendo adicionado ao mesmo 5 mL de água MilliQ. Esta solução foi filtrada em papel filtro para remover algum material particulado.

4. *Solução de persulfato de amônio (PSA) 10 %*

Pesou-se, em béquer de 50 mL, 400 mg de persulfato de amônio, sendo adicionado ao mesmo 4 mL de água MilliQ. Esta solução foi adicionada em microtubos (100 µL cada). Os microtubos foram mantidos a -20 °C.

5. *Tampão de amostra*

Adicionou-se em tubo Falcon (15 mL) 0,9 mL de Tris-HCl (1 mol/L, pH 6,8), 1,5 mL de glicina (30 %), 0,345 g de dodecilsulfato de sódio (SDS, 40 %), 15,5

mg de ditioneitol (DTT, 0,2 mmol/L), 0,5 mL de bromofenol (0,1 %) e 5 mL de água MilliQ. A solução resultante foi estocada a -20 °C.

6. Solução de acrilamida

Pesou-se, em béquer de 250 mL, 29,2 g de acrilamida (30 %), 0,8 g de bisacrilamida (0,8 %), sendo adicionado ao mesmo 100 mL de água MilliQ. A solução resultante foi filtrada em membranas de 0,45 µm e mantida em frasco âmbar a 4 °C.

7. Tampão para eletroforese (5X)

Pesou-se, em béquer de 1000 mL, 15 g de Tris (25 mmol/L), 72 g de glicina (192 mmol/L), 5 g de SDS (0,1 %), sendo adicionado ao mesmo 1000 mL de água MilliQ. A solução resultante foi estocada a 4 °C.

3.7.8.2. Preparação de amostra para aplicar no gel de eletroforese

As amostras foram colocadas em microtubos e adicionou-se tampão de amostra [Tris-HCl pH 6,8 100mmol/L, dodecilsulfato de sódio (SDS) 40%, Azul de bromofenol 0,2 % e Glicerol 20 %]. As mesmas foram mantidas em estufa a 100 °C por 15 minutos, depois, centrifugadas a 8500 rpm, 20 °C por 2 minutos.

3.7.8.3. Preparação do gel de Poliacrilamida

Poliacrilamida: Polimeriza-se a partir da reação da acrilamida (C_3H_5NO) com a Bis-Acrilamida (*N,N'*-Metileno-bis-acrilamida) em presença de persulfato de amônio e catalisada por TEMED (*N,N,N',N'*-Tetrametiletilenodiamino). Esta

solução foi dissolvida no tampão Tris-HCl (1 mol/L, pH 8,8) e colocada rapidamente para polimerizar numa cuba de montagem orientada verticalmente, sendo feitos pequenos furos (poços) em uma das suas extremidades, perpendicularmente ao seu comprimento com o uso de um “pente”; são os poços que receberam a amostra protéica (Figura 3.43A).

Após a polimerização, colocou-se o tampão de corrida Tris/glicina/SDS pH 8,0 na cuba de eletroforese (MiniVE vertical electrophoresis system). Aplicou-se as amostras, o marcador de proteína e uma corrente elétrica de 250 A e 50 mA (Eletrophoresis Power Supply-EPS 301), à temperatura ambiente, durante 2 horas (Figura 3.43B).

Figura 3.43: Sistema de eletroforese. A) Sistema de eletroforese vertical, MiniVE; B) Fonte de alimentação do sistema de eletroforese

3.7.8.4. Revelação das proteínas

A revelação do gel foi feita de acordo com as seguintes etapas:

1ª Etapa: Solução fixadora

O Gel foi colocado em solução aquosa contendo etanol (10 %), ácido acético (12 %), formaldeído (37 %) durante 60 minutos, sob agitação (29 rpm).

2ª Etapa: Lavagem

Após o período de fixação, o gel foi lavado 3 vezes com etanol (50 %) em períodos de 20 minutos.

3ª Etapa: Pré-tratamento

Realizadas as lavagens, o gel foi tratado em uma solução aquosa de tiosulfato de sódio (0,02 %) por 1 minuto.

4ª Etapa: Lavagem

Após o pré-tratamento o gel foi lavado duas vezes com água destilada, 20 segundos cada lavagem.

5ª Etapa: Solução de impregnação

O Gel foi colocado em solução contendo nitrato de prata (0,2 %) e formaldeído (37 %) por 20 minutos, sob agitação (29 rpm).

6ª Etapa: Lavagem

Mais uma vez o gel foi lavado duas vezes com água destilada, 20 segundos cada lavagem.

7ª Etapa: Solução reveladora

O gel foi revelado em solução aquosa de carbonato de sódio (6 %), tiosulfato de sódio (0,0004 %) e formaldeído (37 %).

8ª Etapa: lavagem

Após o surgimento das bandas no gel, o mesmo foi lavado duas vezes com água destilada, 20 minutos cada lavagem.

9ª Etapa: solução bloqueio

O gel foi bloqueado em solução aquosa de etanol (50 %) e ácido acético (12 %), 10 min.

10ª Etapa: lavagem

Lavou-se o gel com etanol 50 % por 30 minutos.

11ª Etapa: Armazenagem

O gel foi armazenado em solução aquosa de etanol (30 %) e glicina (4 %) até o momento da análise.

3.7.9. GEL DE ELETROFORESE SOBRE CONDIÇÕES NÃO-DESNATURANTES (NATIVE)

Inicialmente preparam-se as soluções estoque, conforme itens abaixo:

3.7.9.1. Tampão de amostra

Adicionou-se em tubo Falcon (15 mL) 0,9 mL de Tris-HCl (1 mol/L, pH 6,8), 1,5 mL de glicina (30 %), 15,5 mg de ditioneitol (DTT, 0,2 mmol/L), 0,5 mL de bromofenol (0,1 %) e 5 mL de água MilliQ. A solução resultante foi estocada a -20 °C.

3.7.9.2. Tampão para eletroforese (5X)

Pesou-se, em béquer de 1000 mL, 15 g de Tris (25 mmol/L), 72 g de glicina (192 mmol/L), sendo adicionado ao mesmo 1000 mL de água MilliQ. A solução resultante foi estocada a 4 °C.

3.7.9.3. Preparar amostra para aplicar no gel de eletroforese

As amostras foram colocadas em microtubos e adicionou-se tampão de amostra (Tris-HCl pH 6,8; Azul de bromofenol 0,2 % e Glicerol 20 %). As mesmas foram mantidas em estufa a 100 °C por 15 minutos, depois, centrifugadas a 8500 rpm, 20 °C por 2 minutos. Essa amostra foi aplicada no gel de poliacrilamida, preparado conforme item 3.7.3.

3.7.10. ZIMOGRAMA

Após a conclusão da eletroforese (item 3.7.9), iniciou-se o ensaio de atividade (zimografia), que foi realizado através de uma mistura de reação que continha 50 mL de tampão fosfato (20 mmol/L), (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol (20 mmol/L), NAD^+ (0,3 mmol/L); metassulfato de fenazina (0,3 mg/mL); azul de nitro-tetrazólio (0,5 mg/ml) e fenazina (66 μL). Usou-se a solução de descoloração (40% de metanol e 10% glacial ácido acético) para finalizar as reações. Para garantir a igual carga de proteína, foi utilizada a coloração de Coomassie [LEVY 2012].

3.7.11. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA OXIDORREDUTASE

A atividade da oxidorredutase presente no extrato bruto e nas frações da DEAE e ANX foi determinada utilizando-se o (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol ou 4-metilacetofenona como substrato. Em uma cubeta (1,5 mL) foram adicionados 1,05 mL de solução tampão fosfato 20 mol/L (pH 7,5), 300 μL de extrato protéico (0,525 μmol de oxidorredutase) e 150 μL de NAD^+ (0,44 $\mu\text{mol/L}$) ou NADH (0,44 $\mu\text{mol/L}$). Após a homogeneização dessa solução zerou-se o espectrofotômetro em 340 nm, depois se adicionou 0,204 μL do álcool (1 nmol), em que a mistura foi rapidamente colocada no espectrofotômetro, iniciando assim a reação de oxidação ou redução. Realizou-se a leitura (A_{340}) em intervalos de 1 s durante 20 min (reação de oxidação) ou 30 minutos (reação de redução).

3.7.12. REAÇÃO DE OXIDAÇÃO ENANTIOSSELETIVA DE ALCOÓIS

Transferiu-se 200 μL do extrato protéico a um microtubo contendo 0,136 μL dos alcoóis **1-4** (1 ηmol), 594 μL de solução tampão fosfato (20 mmol/L) e 206 μL de solução de NAD^+ (0,44 $\mu\text{mol/L}$). Os microtubos foram mantidos a 20 $^{\circ}\text{C}$ sob agitação (800 rpm, Thermomixer) por 20 horas. Adicionou-se ao microtubo éter metil *tert*-butílico (2,0 mL), agitou-se com agitador de tubos, seguido de centrifugação (6000 rpm). A fase orgânica foi analisada por GC, conforme item 2.7.6.9, capítulo 2.

3.7.13. REAÇÃO DE REDUÇÃO ENANTIOSSELETIVA EM CONDIÇÕES ANAERÓBIAS

Transferiu-se 100 μL do extrato protéico a um tubo de vidro (10 mL) contendo 850 μL de solução tampão fosfato (20 mmol/L) e 206 μL de solução de NADH (0,44 $\mu\text{mol/L}$), selou-se o tubo e a atmosfera de gás do recipiente foi saturado com N_2 durante 1 h antes da reação. Em seguida, adicionou-se 0,135 μL da 4-metilacetofenona (1 ηmol) e a reação foi realizada a 20 $^{\circ}\text{C}$, 700 rpm, atmosfera de N_2 , durante 8 h. A mistura da reação foi extraída com éter metil *tert*-butílico (2,0 mL) e a fase orgânica foi analisada por GC.

3.9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- ANDREWS, A. T. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE): homogeneous gel and buffer systems. In: *Electrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications*. Oxford University Press, New York **1986**.
- ARAÚJO, L. S.; KAGOHARA, E.; GARCIA, T. P.; PELLIZARI, V. H.; ANDRADE, L. H. Screening of Microorganisms Producing Cold-Active Oxidoreductases to Be Applied in Enantioselective Alcohol Oxidation. An Antarctic Survey. *Marine Drugs* **2011**, 9, 889-905.
- ARAÚJO, L. S. Busca de álcool desidrogenases para aplicação em oxidação enantiosseletiva de alcoóis. Dissertação de Mestrado em Química, Instituto de Química, Universidade de São Paulo. São Paulo, **2010**.
- ARMAREGO, W. L. F.; PERRIN, D. D. Purification of laboratory chemicals 4^a ed. Oxford, Boston: Butterworth Heinemann **1996**, 529p.
- BERGMAYER, H. U. Alkoholdehydrogenase. In: Bergmeyer, H.U. *Methods of enzymatic analysis*, Verlag Chemie, Weinheim. **1983**, 11, 139-145.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **1976**, 72(1-2), 248-254.
- BOSSIO, J. P.; HARRY, J.; KINNEY, C. A. Application of ultrasonic assisted extraction of chemically diverse organic compounds from soils and sediments. *Chemosphere* **2008**, (50)9, 858-864.
- CHARM, S. E.; MATTEO, C. C. Scale-UP of Protein Isolation. *Methods in Enzymology* **1971**, 22, 476-556.
- CHISTI, Y.; YOUNG, M. M. Disruption of microbial cells for intracellular products. *Enzyme and Microbial Technology* **1986**, 8, 194-204.
- COLE, J. R.; CHAI, B.; MARSH, T. L. ; FARRIS, R. J. ; WANG, Q. ; KULAM-SEYDMOHIDEEN, A. S.; CHANDRA, S.; MCGARREL, D. M.; SCHMIDT, T. M.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Research* **2003**, 31, 442-443.
- COLE, J. R.; CHAI, B.; FARRIS, R. J. ; WANG, Q.; KULAM-SEYDMOHIDEEN, A. S.; MCGARREL, D. M.; BANDELA, A. M.; CARDENAS, E.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Research*. **2007**, 35 (Database Iss), D169-D172.

COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. In: Introdução a métodos cromatográficos. 7ª ed. Campinas: Editora da UNICAMP, **1997**, p.11-27.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia. Campinas, Editora da Unicamp, **2006**, p. 452.

CUATRECASAS, P.; WILCHEK, M. Single-step purification of avidine from egg white by affinity chromatography on biocytin-Sepharose columns. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1968**, 33(2), 235–239.

DUNN, B. M.; CHAIKEN, I. M. Quantitative Affinity Chromatography. Determination of Binding Constants by Elution with Competitive Inhibitors. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences* **1974**, 71, 2382-2385.

FONSECA, L. P.; CABRAL, J. M. S. Penicillin acylase release from *Escherichia coli* cells by mechanical cell disruption and permeabilization *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **2002**, 77(2), 159–16.

GEIGES, O. Microbial processes in frozen foods. *Advances in Space Research* **1996**, 18(12), 109-118.

GERALD, K. Biologia celular e molecular; Editora Manole Ltda, 3ª ed. São Paulo **2005**, p. 786.

GOTO, S.; TAKAMI, H. Classification of Ascoideaceous Yeasts Based on the Electrophoretic Comparison of Enzymes and Coenzymes Q Systems. *The Journal of General and Applied Microbiology* **1986**, 32, 271-282.

GUIMARÃES, L. F. L.; COLLINS, CAROL, H. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: Introdução a métodos cromatográficos. 7ª ed. Campinas: Editora da UNICAMP, **1997**, p.183-238.

GUGLIELMI, P. B.; BROER, S.; BROER, A.; HAMPRECHT, B. Isoenzyme pattern of glycogen phosphorylase in the rat nervous system and rat astroglia-rich primary cultures: electrophoretic and polymerase chain reaction studies. *Neurochemical Research* **2000**, 25, 1485-1491.

HAMES, B. D. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In Gel electrophoresis of proteins: A practical approach Hames, B. D. and Rickwood, D. (editors), IRL Press Limited, London, Washington DC, **1981**, p. 4–14.

HEALTHCARE, GE. Principles and Methods Handbook , GE Healthcare Bio-Sciences Uppsala Sweden, **2007**.

HEALTHCARE, GE. Principles and Methods Handbook , GE Healthcare Bio-Sciences Uppsala Sweden, **2005**.

HEDENSKOG, G.; MOGREN, H. Some methods for processing of single-cell protein. *Biotechnology and Bioengineering* **1973**, 15(1), 129– 142.

- HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; SMITH, P. K. Immobilized Affinity Ligand Techniques. Academic Press, New York **1992**, p. 317–416.
- JANSON, J. C. Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications, 3^a ed. Wiley, New York **2011**, 548p.
- JENG, R. S.; SHIYUAN, Y.; WAYMAN, M. Isoenzyme and Protein Patterns of Pentose-Fermenting Yeasts. *Canadian Journal of Microbiology*. **1987**, 33, 1017-1023.
- KANEKO, T.; KITAMURA, K.; YAMAMOTO, Y. Susceptibilities of Yeasts to Yeast Cell Wall Lytic Enzyme of *Arthrobacter luteus*. *Agricultural and Biological Chemistry*. **1973**, 37, 2295–2302.
- KATZUNG, B. G. Farmacologia Básica e Clínica, 12^a ed., Ed. Lange - Mc Graw Hill, Ed. Artmed, Porto Alegre, RS, **2012**.
- KITAMURA, K.; KANEKO, T.; YAMAMOTO, Y. Lysis of viable yeast cells by enzymes of *Arthrobacter luteus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1971**, 145, 402–404.
- JOLLÈS, P.; JOLLÈS, J. What's new in lysozyme research? *Molecular and Cellular Biochemistry* **1984**, 63, 165-189.
- Kumar, A.; Tiwari, S. Thavaselvam, D.; Sathyaseelan, K.; Prakash, Archana.; Barua, A.; Arora, Sonia.; Rao, M. K. Optimization and efficient purification of recombinant Omp28 protein of *Brucella melitensis* using Triton X-100 and β -mercaptoethanol. *Protein Expression and Purification* **2012**, 83, 226–232.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, 227, 680-685.
- LAYH, N.; HIRRLINGER, B.; STOLZ, A.; KNACKMUSS, H. J. Enrichment strategies for nitrile-hydrolysing bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1997**, 47, 668-674.
- LEHNINGER, A. LESTER. Fundamentos de Bioquímica. 4^a ed. São Paulo: Sarvier, 2006.
- LEVY, D. C. M.; SANTOS, A. L. S.; CUERVO, P.; JESUS, J. B.; BRANQUINHA, M. H. Applications of Zymography (Substrate-SDS-PAGE) for Peptidase Screening in a Post-Genomic Era. Gel Electrophoresis - Advanced Techniques. InTech, Rijeka, Croatia, **2012**.
- LIM, W. J.; PARK, S. R.; CHO, S. J.; KIM, M. K.; RYU, S. K., HONG, S. Y.; SEO, W. T.; KIM, H.; YUN, H. D. Cloning and characterization of an intracellular isoamylase gene from *Pectobacterium chrysantemi* PY35. *Biochemical and Biophysical Chemical Communications*. **2001**, 287, 348-354.
- LY, K. C. D.; GABELLI, S. B. Chapter Seven-Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. *Methods in Enzymology* **2014**, 541, 85-94.

Masschalck, B.; Michiels, C.W. Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* **2003**, 29, 191-214.

MAGDELDIN, S.; MOSER, A. C. Affinity Chromatography: Principles, Methods and Applications, In: Affinity Chromatography, Sameh Magdelin **2012**, p. 1-27.

MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D. S.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. *Química Nova* **2008**, 31(2), 336-339.

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

MYRNES, B.; SEPPOLA, M.; JOHANSEN, A.; ØVERBØ, K.; CALLEWAERT, L. VANDERKELEN, L.; MICHIELS, C.W.; NILSEN, I. W. Enzyme characterisation and gene expression profiling of Atlantic salmon chicken- and goose-type lysozymes. *Developmental and Comparative Immunology*. **2013**, 40, 11–19.

NAGLAK, T. J., HETTWER, D. J.; WANG, H. Y. Chemical permeabilization of cells for intracellular product release, in: Separation Process in Biotechnology, J. A. Asenjo (Ed)., Marcel Dekker, Inc., U.S.A. **1990**, pp. 177-205.

NEVES, L. C. M. Obtenção de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase a partir de *S.cerevisiae* W303-181. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Fermentações, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP). Ribeirão Preto, **2003**.

NI, Y.; XU, J. H. Asymmetric reduction of aryl ketones with a new isolate *Rhodotorula* sp. AS2.2241. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2002**, 18, 233-341.

NUMANOĞLU, Y.; SUNGUR, S. β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose–gelatin carrier system. *Process Biochemistry* **2004**, 39, 703–709.

OKWUMABUA, O.; PERSAUD, J. S.; REDDY, P. G. Cloning and characterization of the gene encoding the glutamate dehydrogenase of *Streptococcus suis* serotype 2. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. **2001**, 8, 251-257.

OSTGROVE, S. Affinity Chromatography: General Methods. *Methods in Enzymology*, M.P. Deutscher **1993**, 182, 357–371.

PALMEIRA, D. J.; ABREU, J. C. ANDRADE, L. H. Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution of Aryltrimethylsilyl Chiral Alcohols. *Molecules* **2011**, 16, 9697-9713.

REHACEK, J.; SCHAEFER, J. Desintegration of Microorganisms in a Industrial Horizontal Mill of Novel Design. *Biotechnology and Bioengineering* **1977**, 19, 1523-1534.

ROTHER, G. M.; MAURER, W. D. In Gel Electrophoresis of Proteins. IOP Publishing Limited, Bristol, England **1986**, p. 55-56.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial– Processos Fermentativos e Enzimáticos*. 1ª ed. São Paulo: Edgard Blüchwe, **2001**, v. 3, p. 377-389.

SIMON, R. *Protein purification applications: A practical approach*. 2ª ed. Oxford ; New York, Oxford University Press, **2001**.

SKOOG, D. A.; HOLLER, J.; NIEMAN, T. *Princípios de Análise Instrumental*. 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, **2002**, p. 836.

SUZUKI, T.; IWAHASHI, Y. RNA Preparation of *Saccharomyces cerevisiae* Using the Digestion Method may Give Misleading Results. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2013**, 169, 1620–1632.

WEISS, J. *Handbook of Ion Chromatography*, 3ª edição, volume 1, Alemanha, **2004**.

WEISS, J. *Handbook of Ion Chromatography*, 3ª edição, volume 2, Alemanha, **2004**.

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

WISEMAN, A. *Handbook of enzyme biotechnology*. 2ª ed. Nova York, John Wiley & Sons, **1985**.

www.ncbi.nlm.nih.gov;

www.emdmillipore.com/BR/pt/product/Amicon-Ultra-15-Centrifugal-Filter-Unit-with-Ultracel-100-membrane,MM_NF-UFC910008#anchor_UG

YAMAZAKI, M.; KOMAGATA, K. An Electrophoretic Comparison of Enzymes of Ballistosporegenous Yeasts. *The Journal of General Applied Microbiology* **1983**, 29, 115-143.

ZACHARIOU, M. *Affinity chromatography: methods and protocols*, 2ª ed. Totowa, USA. **2008**, 421p.

Capítulo 4

4. Bioprospecção de micro-organismos/enzimas amazônicos para a aplicação em reações de biorredução e oxidação

Esse capítulo foi reservado para expor um trabalho realizado no período de 21/06/2012 a 30/08/2012 em colaboração com o grupo de pesquisa da Profª Dra. Sandra Zanotto da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), que nos convidou a empregar uma metodologia desenvolvida em nosso grupo [ARAÚJO, 2010], na bioprospecção de bactérias isoladas de esponjas de água-doce e fungos endofíticos para a aplicação em reações de biorredução de cetonas e oxidação enantiosseletiva de alcoóis. Os micro-organismos testados nas reações fazem parte da Coleção de Micro-organismos do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais–MBT- UEA, em que todas as espécies foram isoladas de amostras obtidas da Floresta Amazônica.

Esse trabalho teve fundamental importância para o estudo da biodiversidade microbiana da Região Amazônica, uma vez que o Brasil possui uma biodiversidade privilegiada com enorme número de micro-organismos cuja ação química pode vir a se mostrar superior àquelas dos micro-organismos e enzimas isoladas já testadas.

Na Floresta Amazônica encontram-se os micro-organismos mesofílicos. Em que as enzimas provenientes destes micro-organismos são atualmente as mais intensamente estudadas. No Brasil existem poucos estudos com oxidoredutases (em especial álcool desidrogenases) em reações de oxidação enantiosseletiva de alcoóis, sendo assim, essa região é extremamente importante para busca de álcool desidrogenases para este fim.

Esse trabalho auxiliou na superação da dissociação do conhecimento produzido e orientou na produção de uma nova ordem de conhecimento, constituindo condição necessária para melhoria da qualidade do Ensino. A importância de trabalhos colaborativos pode ser bem definida pelo pensador CROOK (1996) que enfatiza “...a importância que o conhecimento socialmente compartilhado tem para a aprendizagem. As interações colaborativas podem concorrer para a construção de conhecimento compartilhado e desenvolvimento da intersubjetividade”.

4.1. ESPONJAS DE ÁGUA DOCE

Eponjas (*Filo Porifera*) habitam ambientes marinhos e de água doce e são normalmente associadas com diversos micro-organismos, incluindo bactérias heterotróficas, cianobactérias, algas unicelulares e *Archaea*, que podem contribuir por mais de 40% da biomassa de esponjas, em que parte dessa variedade de micro-organismos pode servir como fonte de alimento para as esponjas [HENTSCHEL et al. 2006].

Além disso, as bactérias associadas às esponjas estão envolvidas em vários processos, tais como fotossintética fixação de carbono, nitrificação, fixação de nitrogênio e metabolismo anaeróbico [MOHAMED et al. 2008]. Outra função

importante de bactérias associadas às esponjas é a produção de metabólitos secundários usados nas indústrias farmacêuticas e de estruturas moleculares [THOMAS et al. 2010].

As comunidades microbianas de algumas esponjas marinhas têm sido estudadas com detalhe nos últimos anos. Em contraste existem poucos estudos sobre a diversidade de bactérias associadas com esponjas de água doce. Este grupo de esponjas consiste de 150 espécies, que ocupam uma grande variedade de água doce, como lagos, rios, córregos e fiordes [MANCONI, PRONZATO 2002]. Um dos lugares mais interessantes que contêm a maior diversidade de espécies de esponjas de água doce é o Lago Baikal. Esse lago é o mais antigo (24 milhões de anos) e mais profunda reserva de água doce do mundo (1.637 m), sendo habitado por 18 espécies de esponjas, das quais 13 são endêmicas e pertencem à família *Lubomirskiidae* [EFREMOVA 2001].

4.2. FUNGOS ENDOFÍTICOS

As plantas desenvolveram uma série de mecanismos para controle de doenças microbianas, incluindo a produção de uma grande variedade de metabólitos. Esses metabólitos podem ser compostos secundários constitutivos já presentes em plantas saudáveis (Phytoanticipins) ou sintetizados de novo em resposta ao ataque de patógenos (fitoalexinas). A desintoxicação destes compostos de defesa altamente bioativos é uma habilidade importante de muitos patógenos de plantas [OSBOURN 1999].

Endofíticos são bactérias ou fungos que colonizam o interior dos tecidos vegetais saudáveis sem causar sintomas aparentes de doença ao hospedeiro.

Esses micro-organismos têm de lidar com os compostos de defesa das plantas, com isso um potencial de biodegradação de um conjunto de enzimas específicas podem permitir que eles subsistam sob estas condições ambientais. Existem alguns estudos sobre essas enzimas, por exemplo, aphelandra, um alcalóide poliamina macrocíclico encontrado nas raízes de diferentes espécies do gênero *Aphelandra* (Acanthaceae) é metabolizado em vários endófitos, que foram isolados a partir das raízes de *Aphelandra tetragona* [WERNER et al. 1997].

Dentre os fungos endofíticos mais frequentemente isolados incluem: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cladosporium* sp., *Phomopsis* sp., *Fusarium* sp. e *Xylaria* sp. [PEREIRA et al. 1999; PHOTITA et al. 2001].

Muitos fungos produzem enzimas extracelulares de importância na degradação e transporte de nutrientes para a célula e no processo de patogênese [BATEMAN, BASHAM 1976], podendo a produção de enzimas extracelulares ser indicativa da característica patogênica desses fungos. Como uma forma de estabelecer o papel funcional dos fungos endofíticos se faz necessário, dentre outros fatores, a detecção de enzimas extracelulares [CARROLL, PETRINI 1983].

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA (OXIDORREDUTASE) DOS MICRO-ORGANISMOS

Como biocatalisadores para as reações de biorredução e oxidação enantiosseletiva foram utilizadas 224 micro-organismos que pertenciam à Coleção de Micro-organismos do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Energia, Ambiente e Biodiversidade (INCT-CEAB). Esses micro-organismos foram isolados a partir de esponjas de água doce e plantas coletadas na Floresta Amazônica. Dentre os micro-organismos testados têm-se bactérias de esponjas de água-doce e fungos endofíticos.

4.3.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE BACTÉRIAS DE ESPONJAS DE ÁGUA-DOCE EM BIORREDUÇÃO DE CETONAS

A fim de avaliar o potencial catalítica das diferentes bactérias de esponjas de água-doce como agentes redutores decidiu-se usar a redução de cetonas para produzir os correspondentes alcoóis enantiomericamente enriquecimentos. Foram selecionados 108 bactérias para realizar esse estudo. Os resultados mais relevantes encontram-se na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Avaliação da atividade enzimática de bactérias de esponjas de água-doce em biorredução de cetonas.

Reação	Micro-organismo	R	Conversão ^a	e.e. (%) ^a
1	<i>Enterobacter</i>	Me	72	>99(S)
2	<i>sp.(20304)</i>	Cl	54	>99(S)
3	<i>Lysinibacillus</i>	Me	59	>99(S)
4	<i>sp.(20347)</i>	Cl	-	-
5	<i>Lysinibacillus</i>	Me	-	-
6	<i>sp.(20379)</i>	Cl	28	>99(R)
7	20354	Me	-	-
8		Cl	51	>99(R)
9	20402	Me	-	-
10		Cl	50	13(R)
11	20307	Me	-	-
12		Cl	22	>99(S)
13	20403	Me	-	-
14		Cl	31	>99(R)
15	20390	Me	7	>99(S)
16		Cl	-	-
17	20310	Me	29	>99(S)
18		Cl	-	-
19	20336	Me	59	7(S)
20		Cl	-	-
21	20280	Me	59	10(S)
22		Cl	55	54(R)

^aCondições reacionais: 5 mmol/L dos substratos 1 e 2 em 2 mL de meio de cultura, 160 rpm, 32 °C, 72h. A configuração absoluta foi determinada por comparação com dados da literatura. ee.: excesso enantiomérico

Tabela 4.1 continuação

Reação	Micro-organismo	R	Conversão ^e	e.e. (%) ^e
23	20399	Me	57	6(<i>R</i>)
24		Cl	-	-
25	20312	Me	39	10(<i>R</i>)
26		Cl	-	-
27	20313	Me	-	-
28		Cl	66	>99(<i>S</i>)
29		Me	-	-
30	20303	Cl	7	>99(<i>S</i>)
31		Me	-	-
32	20306	Cl	9	>99(<i>R</i>)
33		Me	-	-
34	20308	Cl	22	18(<i>S</i>)
35		Me	-	-
36	20307	Cl	58	27(<i>R</i>)
37		Me	-	-
38	20346	Cl	61	>99(<i>S</i>)
39		Me	45	9(<i>R</i>)
40	20311	Cl	-	-
41		Me	26	3(<i>S</i>)
42	20303	Cl	-	-

^aCondições reacionais: 5 mmol/L dos substratos 1 e 2 em 2 mL de meio de cultura, 160 rpm, 32 °C, 72h. A configuração absoluta foi determinada por comparação com dados da literatura. ee.: excesso enantiomérico

Após a análise dos dados da Tabela 4.1 pôde-se observar que as maiores conversões (59-72%) e excessos enantioméricos (até >99%) foram obtidos utilizando as bactérias *Enterobacter*, *Lisinibacillus*, 20336, 20280, 20313 e 20346 (Reações 1, 3, 19, 21, 28 e 38). De maneira geral observou-se boas conversões e excesso enantiomérico tanto para a 4-metilacetofenona quanto para a 4-cloroacetofenona.

Quanto à configuração absoluta dos alcoóis obtidos, 10 bactérias possuíam oxidoredutases que apresentam preferência pela formação do enantiômero-*R* do álcool e as outras bactérias pelo enantiômero-(*S*), mostrando assim, a versatilidade das bactérias de água-doce da região amazônica.

4.3.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE BACTÉRIAS DE ESPONJAS DE ÁGUA-DOCE EM OXIDAÇÃO ENANTIOSSELETIVA DE ALCOÓIS.

Também avaliou-se a atividade enzimática das 108 bactérias de esponjas de água-doce em oxidação enantiosseletiva de alcoóis, como pode ser visto na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Avaliação da atividade enzimática de bactérias de esponjas de água-doce em oxidação enantiosseletiva de alcoóis.

Reação	Micro-organismo (código da coleção)	R	Cetona/ Alcool (%) ^a	Alcool e.e. (%) ^a
1	Eccillus sp. (20337)	Me	20/80	>99(R)
2		MeO	9/91	>99(R)
3	Lysinibacillus sphaericus (20334)	Me	14/86	86(S)
4		MeO	6/94	6(R)
5	Pseudomonas sp. (20384)	Me	6/94	2(R)
6		MeO	6/94	5(S)
7	Paenibacillus sp. (20301)	Me	-	-
8		MeO	15/85	15(S)
9	Enterobacter sp. (20304)	Me	-	-
10		MeO	40/60	70(R)
11	Delftia sp. (20351)	Me	-	-
12		MeO	2/98	6(S)
13	Enterobacter sp. (20305)	Me	-	-
14		MeO	8/92	6(R)
15	Eccillus sp. (20344)	Me	28/72	98(R)
16		MeO	-	-
17	Eccillus sp. (20340)	Me	11/89	>99(R)
18		MeO	49/51	>99(R)
19	20320	Me	-	-
20		MeO	9/91	5(R)
21	20307	Me	-	-
22		MeO	32/68	32(R)
23	20352	Me	-	-
24		MeO	41/59	60(R)
25	20313	Me	-	-
26		MeO	43/57	70(R)
27	20314	Me	-	-
28		MeO	18/82	18(R)
29	20308	Me	-	-
30		MeO	9/91	6(R)
31	20306	Me	24/76	35(R)
32		MeO	-	-

^aCondições reacionais: 5 mmol/L dos substratos 1 e 2 em 2 mL de meio de cultura, 160 rpm, 32 °C, 72h. A configuração absoluta foi determinada por comparação com dados da literatura. e.e.: excesso enantiomérico

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.2 percebeu-se que 7 bactérias apresentaram oxidorreduases que catalisaram a oxidação do enantiômero (*S*) do álcool racêmico à sua correspondente cetona. Portanto, o (*R*)-álcool permaneceu intacto e com elevado excesso enantiomérico (até >99 %, reações 1, 10, 15, 17, 18, 24, 26 e 31).

Pelos dados da Tabela 4.2 percebeu-se que a atividade enzimática das bactérias foi melhor quando o substituinte R dos substratos foi uma metoxila, pois de maneira geral, as concentrações de cetonas e excesso enantioméricos foram melhores (e.e. até >99%).

4.3.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM REDUÇÃO ENANTIOSSELETIVA DE CETONAS.

Avaliou-se a atividade enzimática de 116 fungos endofíticos em biorredução da 4-metilacetofenoa e 4-cloracetofenona, Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Avaliação da atividade enzimática de fungos endofíticos em biorredução de cetonas.

Reação	Micro-organismo	R	Conversão ^a	ee ^a (%)
1	<i>Colletotrichum guaranicola</i>	Me	-	-
2	(10053)	Cl	96	>99(R)
3	<i>Aspergillus sp.</i> (10024)	Me	-	-
4		Cl	70	>99(R)
5	<i>Aspergillus sp.</i> (10025)	Me	-	-
6		Cl	61	74(R)
7	<i>Aspergillus sp.</i> (10038)	Me	-	-
8		Cl	89	81(R)
9	<i>Aspergillus niger</i> (10001)	Me	-	-
10		Cl	>99	13(R)
11	<i>Fusarium sp.</i> (10218)	Me	65	15(R)
12		Cl	87	35(R)
13	<i>Colletotrichum sp.</i>	Me	88	>99(R)
14	(10247)	Cl	77	76(R)
15	<i>Talaromyces sp.</i>	Me	-	-
16	(10354)	Cl	93	73(R)
17	<i>Colletotrichum sp.</i>	Me	63	93(R)
18	(10119)	Cl	97	>99(R)
19	<i>Trametes sp.</i>	Me	66	>99(S)
20	(10206)	Cl	-	-

^aCondições reacionais: 5 mmol/L dos substratos 1 e 2 em 2 mL de meio de cultura, 160 rpm, 32 °C, 72h. A configuração absoluta foi determinada por comparação com dados da literatura, ee.: excesso enantiomérico.

Observou-se nos resultados apresentados na Tabela 4.3 que os fungos endofíticos apresentaram potencial biorredutor das cetonas com moderadas a excelentes conversões e seletividade (61 até >99%, reações 2, 4, 6, 8, 10-14, 16-19). Quanto à configuração absoluta dos alcoóis obtidos, com exceção do *Trametes sp.* (reação 19), todos os demais fungos possuíam oxidorreduatasas que tinham preferência pela formação do enantiômero-*R* do álcool.

Percebeu-se que, de maneira geral, os fungos apresentaram somente atividade enzimática quando o substituinte R dos substratos foi uma metila.

4.3.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM OXIDAÇÃO ENANTIOSSELETIVA DE ALCÓÓIS

A fim de avaliar o potencial catalítica dos 116 fungos endofíticos decidiu-se testar a oxidação dos alcoóis (*R,S*)-1-(4-metilfenil)etanol e (*R,S*)-1-(4-metoxifenil)etanol (Tabela 4.4).

Tabela 4.4: Avaliação da atividade enzimática de fungos endofíticos em oxidação enantiosseletiva de alcoóis.

Reação	Micro-organismo (código da coleção)	R	Cetona/ Álcool (%) ^a	Álcool e.e.(%) ^a
1	<i>Aspergillus</i> sp.	Me	-	-
2	(10014)	MeO	5/95	6(<i>R</i>)
3	<i>Penicillium</i> sp.	Me	3/97	7(<i>R</i>)
4	(10027)	MeO	37/63	51(<i>R</i>)
5	<i>Colletotrichum</i>	Me	4/96	10(<i>R</i>)
6	<i>guarunicola</i> (10053)	MeO	32/68	35(<i>R</i>)
7	<i>Trameies</i> sp	Me	2/98	6(<i>S</i>)
8	(10206)	MeO	29/71	37(<i>S</i>)
9	<i>Penicillium</i> sp.	Me	-	-
10	(10003)	MeO	5/95	3(<i>R</i>)
11	<i>Colletotrichum</i> sp.	Me	2/98	4(<i>R</i>)
12	(10247)	MeO	6/94	11(<i>R</i>)
13	<i>Fusarium</i> sp	Me	-	-
14	(10218)	MeO	9/91	3(<i>R</i>)
15	<i>Fusarium oxysporum</i>	Me	7/93	4(<i>S</i>)
16	(10028)	MeO	7/93	6(<i>S</i>)

^aCondições reacionais: 5 mmol/L dos substratos 1 e 2 em 2 mL de meio de cultura, 160 rpm, 32 °C, 72h. A configuração absoluta foi determinada por comparação com dados da literatura. ee.: excesso enantiomérico.

Tabela 4.4 continuação

Reação	Micro-organismo (código da coleção)	R	Cetona/ Álcool (%) ^a	Álcool e.e.(%) ^a
17	<i>Aspergillus terreus</i>	Me	-	-
18	(A.T.)	MeO	36/64	57(R)
19	10313	Me	-	-
20		MeO	11/89	25(R)
21	10242	Me	43/57	27(R)
22		MeO	-	-

^aCondições reacionais: 5 mmol/L dos substratos 1 e 2 em 2 mL de meio de cultura, 160 rpm, 32 °C, 72h. A configuração absoluta foi determinada por comparação com dados da literatura. e.e., excesso enantiomérico.

Analisando os resultados apresentados na Tabela 4.4 percebeu-se que alguns fungos endofíticos apresentaram oxidoredutases que catalisou a oxidação do enantiômero-(S) dos alcoóis às suas correspondentes cetonas com boas concentrações de cetonas (29-43%, reações 4, 6, 8, 18 e 21). Já a enantiosseletividade foi baixa para todas as reações catalisadas pelos fungos endofíticos (3-57 %).

Assim como as bactérias de esponjas de água-doce, os fungos endofíticos apresentaram atividade enzimática preferencialmente quando o substituinte R dos substratos foi uma metoxila.

Com relação à configuração absoluta dos alcoóis obtidos, somente o *Trametes* sp. e o *Fusarium oxysporum* possuem oxidoredutases que apresentam preferência pela formação do enantiômero-(S) do álcool (Tabela 4.4, reações 7, 8, 15 e 16) e os outros fungos pelo enantiômero-(R).

4.4. CONCLUSÕES

Dos 224 micro-organismos amazônicos isolados, 24 cepas contêm oxidoredutases que catalisam a oxidação dos alcoóis racêmicos às correspondentes cetonas com elevado excesso enantiomérico até >99%. Como se tinha interesse em uma resolução cinética, podia-se obter melhores resultados variando as condições reacionais.

Desses micro-organismos testados em reação de biorredução enantiosseletiva de cetonas 53 apresentaram oxidoredutases que catalisou a redução de cetonas com excesso enantiomérico até > 99%. Na maioria dos casos, a biorredução levou a formação do (S)-álcool.

4.5. PARTE EXPERIMENTAL

4.5.1. Avaliação da atividade enzimática (oxidoreductase) dos micro-organismos.

Inicialmente foi realizado o estudo de avaliação da atividade enzimática dos micro-organismos em reações de oxidação enantiosseletiva de alcoóis derivados do (*R,S*)-1-feniletanol (**1-3**) e reduções de cetonas derivadas da acetofenona (**4-6**); Esquema 4.1.

Esquema 4.1: a) Reação de oxidação enantiosseletiva do (*R,S*)-1-feniletanol e seus derivados na presença de micro-organismos. b) Reações de biorredução enantiosseletiva da acetofenona e seus derivados na presença de micro-organismos.

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

4.5.1.1. Pré-inóculo

Foram adicionados 20 mL do meio de cultura apropriado (MCFE7 ou MCBE7) à um erlenmeyer de 50 mL. O meio foi autoclavado por 15 minutos a 120 °C. Sob condições assépticas e em capela de fluxo laminar foi transferido o micro-organismo da placa de Petri ao meio de cultura, com o auxílio de uma alça de platina e foram adicionados 200 µL da solução do indutor [(*R,S*)-1-feniletanol]. Foram incubados por tempo determinado (de acordo com o meio de cultura) a 32 °C sob agitação orbital, 160 rpm.

4.5.1.2. Inóculo e Reação de Redução e Oxidação

Neste ensaio, foram utilizadas microplacas (24 poços, volume individual de 10 mL, Figura 4.1) contendo em cada poço 2 mL de pré-inóculo (Figura 4.1, Parte A). As microplacas foram mantidas em agitador orbital por 2 ou 4 dias. Na seqüência foram adicionados 40 µL das soluções das cetonas aromáticas **4-6** (5 mmol/L) preparadas utilizando etanol como co-solvente e soluções dos alcoóis aromáticos **1-3** preparadas utilizando DMF como co-solvente (Figura 4.1, Parte B). Após 120 h de reação as culturas foram transferidas para tubos de ensaios e extraídas com éter metil-*terc*-butílico. Uma alíquota da fase orgânica de cada reação foi analisada por cromatografia gasosa (Figura 4.1, Parte C).

Figura 4.1: Resumo da etapa de avaliação da atividade enzimática enantiosseletiva dos micro-organismos, realizadas em duplicatas. (I) Micro-organismo 1. (II) Micro-organismo 2.

4.5.1.3. Avaliação das reações de biocatálise

As amostras foram analisadas em GC usando coluna com fase estacionária quiral. O excesso enantiomérico dos compostos foram determinados por comparação cromatográfica com amostras dos (*R,S*)-alcóois **1-3** sintetizados quimicamente. O excesso enantiomérico (e.e.) foi definido como a razão de $[S]/[R] + [S] \times 100\%$, em que $[R]$ e $[S]$ são as concentrações dos enantiômeros (*R*) e (*S*), respectivamente.

4.5.2. PREPARO DAS SOLUÇÕES DOS ALCOÓIS RACÊMICOS E DAS CETONAS

As soluções dos alcoóis racêmicos e das cetonas foram preparadas em microtubos (2 mL). Para a solução de 5 mmol/L foram diluídos 0,75 mmol dos substratos em 1 mL de dimetilformamida (DMF) ou etanol.

4.5.3. MEIOS DE CULTURA

- Meio de cultura MCFE7=(pH 5,6), KH_2PO_4 (0,1 %; 1,0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,04 %; 0,4 g/L), NH_4Cl (0,04 %; 0,4 g/L), Dextrose (0,025 %; 0,25 g/L), Peptona (0,025 %; 0,25 g/L).

- Meio de cultura MCBE7 (pH 7,0), K_2HPO_4 (0,2 %; 2,0 g/L), KH_2PO_4 (0,1 %; 1,0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,04 %; 0,4 g/L), NH_4Cl (0,04 %; 0,4 g/L), Extrato de Carne (0,025 %; 0,25 g/L), Peptona (0,025 %; 0,25 g/L).

4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATEMAN, D. F.; BASHAM, H. G. Degradation of plantcell walls and membranes by microbial enzymes. *Physiological and molecular plant pathology* **1976**, 4, 316-355.
- CARROLL, G.; PETRINI, O. Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. *Mycologia* **1983**, 75, 53-63.
- EFREMOVA, S. M. Sponges (Porifera). In: Timoshkin OA (ed) Index of animal species inhabiting Lake Baikal and its catchment area. Nauka, Novosibirsk **2001**, pp 182–192.
- HENTSCHEL, U.; USHER, K. M.; TAYLOR, M. W. Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiology Ecology*, **2006**, 55, 167–177.
- MANCONI, R.; PRONZATO, R. Suborder Spongillina subord. nov.: freshwater sponges. In: Hooper NJA, van Soest RWM (eds) *Systema Porifera: a Guide to the Classification of Sponges*. Kluwer/Plenum, New York **2002**, 1664p.
- MIDDLETON, D., CROOK, C. Bartlett and socially ordered consciousness: A discursive perspective. Comments on Rosa. *Culture and Psychology* **1996**, 2, 379-396.
- OSBOURN, A. E. Antimicrobial phytoprotectants and fungal pathogens: a commentary. *Fungal Genetics and Biology* **1999**, 26, 163–168.
- PEREIRA, J. O.; VIEIRA, M. L. C.; AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **1999**, 15, 37-40.
- PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; HYDE, K. D. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. *Mycological Research* **2001**, 105(12), 1508-1513.
- THOMAS, T. R. A.; KAVLEKAR, D. P.; LOKABHARATHI, P. A. Marine drugs from sponge-microbe association—a review. *Marine Drugs* **2010**, 8(4), 1417-1468.
- WERNER, C.; PETRINI, O.; HESSE, M. Degradation of the polyamine alkaloid aphelandrine by endophytic fungi isolated from *Aphelandra tetragona*. *FEMS Microbiology Letters* **1997**, 155, 147–153.

5. CURRICULUM VITAE

Dados pessoais

Nome Lidiane da Silva Araújo
Filiação Antônio Pinheiro de Araújo Filho e Iraci Rodrigues da Silva Araújo
Nascimento 23/07/1980 - Campo Maior/PI - Brasil
Carteira de Identidade 1692323 ssp - PI - 04/07/1996
CPF 654.275.213-72

Endereço residencial Rua Dr. Abraão Hudler, 74 c 02
Vila Butantã - São Paulo
05361-070, SP - Brasil
Telefone: 011 23720334

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Instituto de Química
A. Prof. Lineu Prestes, 748
- São Paulo
05508-900, SP - Brasil
Telefone: 011 30912287

Endereço eletrônico

E-mail para contato : lidianepiaui@yahoo.com.br
e-mail alternativo : lidianearaujo@usp.br

Formação acadêmica/titulação

2010 Doutorado em Química.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Biocatálise
Orientador: Leandro Helgueira de Andrade
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2008 - 2010 Mestrado em Química.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Busca de álcool desidrogenases para aplicação em oxidação enantiosseletiva de álcoois, Ano de obtenção: 2010
Orientador: Leandro Helgueira de Andrade
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Graduação interrompido(a) em Bacharelado em Química.
Universidade Federal do Ceará, UFC, Fortaleza, Brasil
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Ano de interrupção: 2008

2003 - 2006 Graduação em Licenciatura em Química.
Universidade Federal do Ceará, UFC, Fortaleza, Brasil
Título: Uma proposta de abordagem de um programa inicial de

Química para escolas de ensino médio
Orientador: Aloísio Marques da Fonseca
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Atuação profissional

1. Universidade do Estado do Amazonas - UEA

Vínculo institucional

2012 - 2012 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Treinamento de metodologia experimental , Carga horária: 400, Regime: Dedicação exclusiva

2. Estação Antártica "Comandante Ferraz" - EACF

Vínculo institucional

2008 - 2009 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Pesquisadora , Carga horária: 60, Regime: Dedicação exclusiva

3. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ

Vínculo institucional

2007 - 2008 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: pesquisador , Carga horária: 20, Regime: Dedicação exclusiva

4. Colégio Tony - CT

Vínculo institucional

2005 - 2007 Vínculo: Professor , Enquadramento funcional: Professor Química , Carga horária: 12, Regime: Parcial

Áreas de atuação

1. Química

Idiomas

Inglês Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Bem

Português Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Prêmios e títulos

2009 Painel Premiado: Tendências Interdisciplinares em Química Orgânica, Universidade de São Paulo

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. RODRIGUES, C., **ARAÚJO, L. S.**, Pelegrini, T.G., KAGOHARA, E., PELLIZARI, V. H., Andrade, L. H.

Exploiting the enzymatic machinery of *Arthrobacter artrocyaneus* for oxidative kinetic resolution of secondary alcohols.. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic (Print)*. , v.83, p.23 - 28, 2012.

2. **ARAÚJO, L. S.**, Andrade, L. H., KAGOHARA, E., Pelegrini, T.G., Pellizari, V.H

Screening of Microorganisms Producing Cold-Active Oxidoreductases to Be Applied in Enantioselective Alcohol Oxidation. *An Antarctic Survey. Marine Drugs*. , v.9, p.889 - 905, 2011.

Livros publicados

1. Andrade, L. H., **ARAÚJO, L. S.**, KAGOHARA, E.

Ciência Brasileira no IV Ano Polar Internacional, Biotransformações enantiosseletivas utilizando microrganismos isolados na Antártica. Brasília : In: Secretaria de Políticas Públicas e Desenvolvimento, Coordenação para Mar e Antártica. (Org.). *Ci*, 2009, v.1. p.55-56.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **ARAÚJO, L. S.**, KAGOHARA, E., PELLIZARI, V. H., Andrade, L. H.

Oxidação enantiosseletiva de álcoois mediada por *Arthrobacter* sp. isolada de sedimento lacustre antártico. In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, FLORIANÓPOLIS.

Livro de Resumos. , 2011.

2. **ARAÚJO, L. S.**, KAGOHARA, E., Pellizari, V.H, Andrade, L. H.

Enantioselective oxidation of sec-alcohols by new psychrophilic microorganisms: A search for cold-active enzymes from Antarctic Peninsula In: 13th BMOS - 13th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2009, Águas de São Pedro.

Book of Abstracts. , 2009. p.239 -

Artigos em jornal de notícias

1. Andrade, L. H., **ARAÚJO, L. S.**
Brasil passa longe de patente Antártica. Folha de São Paulo. Jornal da Ciência, 2009.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **ARAÚJO, L. S.**, KAGOHARA, E., SILVA, T. S., Andrade, L. H.
Purificação de uma(s) oxidoredutase(s) presente(s) na Arthrobacter sp. isolada de sedimento marinho antártico, 2014. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
2. **ARAÚJO, L. S.**, SANTOS, V. S., PEREIRA, J. C., OLIVEIRA, F. M., ZANOTTO, S. P., Andrade, L. H., BARROSO, H. S.
Bioprospecção de micro-organismos/enzima Amazônicos para a aplicação em reações de biorredução enantiosseletiva, 2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
3. **ARAÚJO, L. S.**, SANTOS, V. S., OLIVEIRA, F. M., PEREIRA, J. C., BARROSO, H. S., ZANOTTO, S. P., Andrade, L. H.
Searching for microorganisms producing oxidoreductases to be applied in enantioselective alcohol oxidation. An Amazon Forest survey, 2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
4. **ARAÚJO, L. S.**, Andrade, L. H., KAGOHARA, E.
Purification of oxidoreductase from Arthrobacter sp. for the synthesis of chiral alcohols, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
5. **ARAÚJO, L. S.**, Andrade, L. H., KAGOHARA, E., Pelegrini, T.G., Pellizari, V.H
BUSCA DE ADH DE MICRO-ORGANISMOS MESOFÍLICOS E PSICROFÍLICOS PARA APLICAÇÃO EM REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DE ÁLCOOIS, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
6. **ARAÚJO, L. S.**, Andrade, L. H., KAGOHARA, E., Pellizari, V.H
Busca de álcool desidrogenases de micro-organismos mesofílicos para aplicação em oxidação enantiosseletiva de álcoois, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
7. **ARAÚJO, L. S.**, Andrade, L. H., KAGOHARA, E., Pellizari, V.H
Bioprospecção de Álcool Desidrogenases de Microrganismos Psicofílicos para Aplicação em Oxidação Enantiosseletiva de Álcoois, 2009. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2014. (Congresso)

Purificação de uma(s) oxidoredutase(s) presente(s) na *Arthrobacter* sp. isolada de sedimento marinho antártico.

2. **VI WORKSHOP DE BIOCATÁLISE E BIOTRANSFORMAÇÃO**, 2012. (Congresso)

BIOPROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS/ENZIMAS AMAZÔNICAS PARA APLICAÇÃO EM REAÇÕES DE BIORREDUÇÃO ENANTIOSSELETIVA.

3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **ZING CONFERENCES-BIOCATALYSIS CONFERENCE**, 2012. (Congresso)

Searching for microorganisms producing oxidoreductases to be applied in enantioselective alcohol oxidation. An Amazon Forest survey.

4. **Brazilian ChemComm Symposium Chemistry and Sustainable Energy**, 2012. (Simpósio)

5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2011. (Congresso)

Oxidação enantiosseletiva de álcoois mediada por *Arthrobacter* sp. isolada de sedimento lacustre antártico.

6. Apresentação Oral no(a) **VII Simpósio & VII Reunião de Avaliação do Programa BIOTA/FAPESP e IV Reunião de Avaliação do BIOprospecTA**, 2011. (Simpósio)

PURIFICATION OF OXIDOREDUCTASE FROM ARTHROBACTER SP. FOR THE SYNTHESIS OF CHIRAL ALCOHOLS.

7. Apresentação de Poster / Painel no(a) **10th International Symposium on Biocatalysis (Biotrans)**, 2011. (Congresso)

Purification of oxidoreductase from *Arthrobacter* sp. for the synthesis of chiral alcohols.

8. **7th Biota Symposium, 7th Biota Program Assessment Meeting e 4th Biopropecta. Program Assessment Meeting**, 2011. (Simpósio)

9. Apresentação Oral no(a) **CUARTO ENCUENTRO REGIONAL DE BIOCATÁLISIS Y BIOTRANSFORMACIONES (IV EnReBB)**, 2010. (Congresso)

BUSCA DE ADH DE MICRO-ORGANISMOS MESOFÍLICOS E PSICROFÍLICOS PARA APLICAÇÃO EM REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DE ÁLCOOIS.

10. Apresentação Oral no(a) **V Workshop de Biocatálise e Biotransformação**, 2010. (Congresso)

Busca de álcool desidrogenases de micro-organismos mesofílicos para aplicação em oxidação enantiosseletiva de álcoois.

11. **Workshop on Marine Biodiversity: Current Advances on Bioprospecting, Biogeography and Phylogeography**, 2010. (Outra)

12. **Workshop on Marine Biodiversity: Current Advances on Bioprospecting, Biogeography and Phylogeography**, 2010. (Outra)

13. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **I Encontro da Pós-Graduação do Instituto de Química- USP**, 2009. (Encontro)

Bioprospecção de Álcool Desidrogenases de Microrganismos Psicrófilos para Aplicação em Oxidação Enantiosseletiva de Álcoois.

14. Apresentação Oral no(a) **XVII Simpósio Brasileiro sobre Pesquisa Antártica**, 2009. (Simpósio)

Bioprospecção de Álcool Desidrogenases de Microrganismos Psicrófilos para Aplicação em Oxidação Enantiosseletiva de Álcoois.

15. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **13th Brazilian Meeting on Organic Synthesis**, 2009. (Congresso)

Enantioselective oxidation of sec-alcohols by new psychrophilic microorganisms: a search for cold-active enzymes from Antarctic Peninsula.

16. **IV Workshop de Biocatálise e Biotransformação**, 2008. (Congresso)

17. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **Encontro "Dia do Químico"**, 2007. (Encontro)

Estudo Químico do Fungo *Tricoderma harzianum*.

18. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XXVI Encontro Universal de Iniciação à Pesquisa**, 2007. (Encontro)

Estudo Químico do Fungo *Tricoderma harzianum*.

19. **SEMANA DA QUÍMICA com o tema Química e Vida: Sintetizando Gerações**, 2005. (Encontro)

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos	completos	publicados	em	
periódico.....				2
Livros				
publicados.....				1
Jornais			de	
Notícias.....				1
Trabalhos	publicados	em	anais	de
eventos.....				2
Apresentações		de		trabalhos
(Congresso).....				6
Apresentações		de		trabalhos
(Simpósio).....				1

Eventos

Participações	em	eventos
(congresso).....		9
Participações	em	eventos
(simpósio).....		4
Participações	em	eventos
(encontro).....		4
Participações	em	eventos
(outra).....		2

Outras informações relevantes

1 Participei da pesquisa que tem como título "Otimização de Processos Biocatalíticos para a Síntese de Compostos Orgânicos", com financiamento de bolsa de iniciação científica PIBIC/CNPq no período de agosto/2007 a fevereiro/2008.

Participei do projeto de pesquisa que tem como título "Bioprospecção do Fungo Fitopatógeno Lasiodiplodia Theobromae na busca por moléculas com atividades antitumoral e antimicrobacteriana", com financiamento de bolsa de iniciação científica PIBIC/CNPq no período de fevereiro/2007 a julho/2007.

Participei do projeto de pesquisa que tem como título "Dispositivos emissores de luz de baixo custo com base em nanoestruturas de CaCO_3 " na Universidade Federal do Ceará no período de outubro/2005 a Julho/2006.

Participei do Minicurso: "Microorganismos: Ferramenta Básica para a Biocatálise" durante o V Workshop de Biocatálise e Biotransformação, realizado na Universidade Estadual de Maringá, no período de 20 a 23 de julho de 2010, em Maringá, PR, Brasil, perfazendo uma carga horária de 4 horas.

Participei do Minicurso: Organometálicos em Síntese Orgânica, realizado na Universidade Federal do Ceará, Fortaleza Ceará, no período de 13 a 18 de junho de 2005. Perfazendo uma carga horária de 6 horas.

Participei do Treinamento Pré-Antártico 2008 (TPA/2008) realizado no período de 27 julho a 03 de agosto de 2008 no Centro de Adestramento da Ilha da Marambaia (CADIM).

Participei do Curso de PRIMEIROS SOCORROS NA PARADACARDIORESPIRATÓRIA, ministrado no Instituto de Química da Universidade de São Paulo pela Profa. Dra. Thaís Tinucci e pelo Educador Bruno Modesto, no dia 28 de abril de 2011.

Participei do Curso ACIDENTES EM LABORATÓRIOS DE QUÍMICA, ministrado no Instituto de Química da Universidade de São Paulo pela Profa. Dra. Thaís Tinucci, no dia 19 de maio de 2011.

Article

Screening of Microorganisms Producing Cold-Active Oxidoreductases to Be Applied in Enantioselective Alcohol Oxidation. An Antarctic Survey

Lidiane S. Araújo¹, Edna Kagohara¹, Thais P. Garcia¹, Vivian H. Pellizari² and Leandro H. Andrade^{1,*}

¹ Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 748, SP 05508-900, São Paulo, Brazil; E-Mails: lidianeapiaui@yahoo.com.br (L.S.A); ednakb@iq.usp.br (E.K.); thais_pelegrin@yahoo.com.br (T.P.G)

² Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, Praça do Oceanográfico 191, SP 05508-120, São Paulo, Brazil; E-Mail: vivianp@usp.br (V.H.P.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: leandroh@iq.usp.br; Tel.: +55-11-3091-2287; Fax: +55-11-3815-5579.

Received: 20 April 2011; in revised form: 17 May 2011 / Accepted: 20 May 2011 /

Published: 24 May 2011

Abstract: Several microorganisms were isolated from soil/sediment samples of Antarctic Peninsula. The enrichment technique using (*RS*)-1-(phenyl)ethanol as a carbon source allowed us to isolate 232 psychrophile/psychrotroph microorganisms. We also evaluated the enzyme activity (oxidoreductases) for enantioselective oxidation reactions, by using derivatives of (*RS*)-1-(phenyl)ethanol as substrates. Among the studied microorganisms, 15 psychrophile/psychrotroph strains contain oxidoreductases that catalyze the (*S*)-enantiomer oxidation from racemic alcohols to their corresponding ketones. Among the identified microorganisms, *Flavobacterium* sp. and *Arthrobacter* sp. showed excellent enzymatic activity. These new bacteria strains were selected for optimization study, in which the (*RS*)-1-(4-methyl-phenyl)ethanol oxidation was evaluated in several reaction conditions. From these studies, it was observed that *Flavobacterium* sp. has an excellent enzymatic activity at 10 °C and *Arthrobacter* sp. at 15 and 25 °C. We have also determined the growth curves of these bacteria, and both strains showed optimum growth at 25 °C, indicating that these bacteria are psychrotroph.

Keywords: oxidoreductases; chiral alcohols; psychrophile; psychrotroph; oxidation; deracemisation

1. Introduction

Enantiomerically pure alcohols are important precursors in the synthesis of bioactive compounds, especially in agrochemical and pharmaceutical industries [1]. Biocatalytic transformation, an enzyme-catalyzed reaction, is one of the techniques that have been rapidly developed in the last years in the synthesis of chiral alcohols. The most employed enzymes for this process are alcohol dehydrogenases, a subclass of oxidoreductases [2,3]. The biocatalytic reactions can be performed by isolated enzymes or whole-cell system, which may be microorganisms or plant cells [4]. It is well known that the screening of a wide variety of microorganisms living in the soil is an efficient method to obtain the desired enzyme [5–7]. In this context, unusual sources, such as microorganisms from extreme environments, have called the scientists attention for the possibility to find new biocatalysts or natural products [8]. Psychrophile microorganisms contain cellular processes that are thoroughly adapted to survival and proliferation at low temperatures and rates similar to those achieved by the closely related species living in temperate environments. This implies that they have developed various structural and physiological adjustments, enabling them to compensate the deleterious effects of low temperatures. The two main physicochemical low temperatures effects are: chemical rates decrease exponentially with decreasing temperature; temperature has also a strong effect on the viscosity of the medium, thereby contributing to further slow down the reaction rates [9]. Several cold-adapted enzymes from Antarctic bacterial strains have been studied [10–14]. The specific activities of these enzymes are much higher than their mesophilic counterparts [9]. This is reflected by the significantly lower activation energy values and the significant enzyme flexibility improvement, leading to a large distribution of conformational isomers [15] accompanied by increased thermolability. In cold-adapted enzymes, flexibility appears to play a crucial role in catalysis by securing the accommodation of the substrate at low temperature, as well as by facilitating water molecules movement and products release [9].

In this work we isolated several microorganisms from soil and sediment samples collected in the Antarctic Continent to be applied in enantioselective oxidation of (*RS*)-1-phenylethanol derivatives. The main goal of this work was to select microorganisms producing cold-active oxidoreductases to perform alcohol oxidation in an enantioselective fashion.

2. Results and Discussion

2.1. Isolation of Microorganisms Producing Oxidoreductases

By using the enrichment technique 232 microorganisms from soils or sediments samples were isolated (Table 1). This technique consisted of applying (*RS*)-1-phenylethanol (1 mM) as a carbon source presented in the culture medium used in the isolation of microorganisms [16]. The use of this chiral alcohol results in the isolation of microorganisms containing new oxidoreductases that can be

Keywords: oxidoreductases; chiral alcohols; psychrophile; psychrotroph; oxidation; deracemisation

1. Introduction

Enantiomerically pure alcohols are important precursors in the synthesis of bioactive compounds, especially in agrochemical and pharmaceutical industries [1]. Biocatalytic transformation, an enzyme-catalyzed reaction, is one of the techniques that have been rapidly developed in the last years in the synthesis of chiral alcohols. The most employed enzymes for this process are alcohol dehydrogenases, a subclass of oxidoreductases [2,3]. The biocatalytic reactions can be performed by isolated enzymes or whole-cell system, which may be microorganisms or plant cells [4]. It is well known that the screening of a wide variety of microorganisms living in the soil is an efficient method to obtain the desired enzyme [5–7]. In this context, unusual sources, such as microorganisms from extreme environments, have called the scientists attention for the possibility to find new biocatalysts or natural products [8]. Psychrophile microorganisms contain cellular processes that are thoroughly adapted to survival and proliferation at low temperatures and rates similar to those achieved by the closely related species living in temperate environments. This implies that they have developed various structural and physiological adjustments, enabling them to compensate the deleterious effects of low temperatures. The two main physicochemical low temperatures effects are: chemical rates decrease exponentially with decreasing temperature; temperature has also a strong effect on the viscosity of the medium, thereby contributing to further slow down the reaction rates [9]. Several cold-adapted enzymes from Antarctic bacterial strains have been studied [10–14]. The specific activities of these enzymes are much higher than their mesophilic counterparts [9]. This is reflected by the significantly lower activation energy values and the significant enzyme flexibility improvement, leading to a large distribution of conformational isomers [15] accompanied by increased thermolability. In cold-adapted enzymes, flexibility appears to play a crucial role in catalysis by securing the accommodation of the substrate at low temperature, as well as by facilitating water molecules movement and products release [9].

In this work we isolated several microorganisms from soil and sediment samples collected in the Antarctic Continent to be applied in enantioselective oxidation of (*RS*)-1-phenylethanol derivatives. The main goal of this work was to select microorganisms producing cold-active oxidoreductases to perform alcohol oxidation in an enantioselective fashion.

2. Results and Discussion

2.1. Isolation of Microorganisms Producing Oxidoreductases

By using the enrichment technique 232 microorganisms from soils or sediments samples were isolated (Table 1). This technique consisted of applying (*RS*)-1-phenylethanol (1 mM) as a carbon source presented in the culture medium used in the isolation of microorganisms [16]. The use of this chiral alcohol results in the isolation of microorganisms containing new oxidoreductases that can be

applied in enantioselective alcohol oxidation. The enzymatic system able to perform the alcohol oxidation can be consisting of a dehydrogenase or an oxidase. However, after the enzyme purification, we will be able to elucidate the enzyme responsible for the alcohol oxidation reaction.

Table 1. Microorganisms isolated from soil and sediment samples.

Culture medium	Microorganisms (soil)	Microorganisms (sediment)
MCBE7 ^a	103	17
MCFE7 ^b	96	16

General conditions: 2 g soil or sediment; ^a pH 7, 2 days of incubation at 20 °C; ^b pH 5.6, 4 days of incubation at 20 °C.

The results described in Table 1 demonstrated that the highest number of microorganisms was obtained from soil samples and culture medium at neutral pH. The culture medium MCFE7 chemical composition was aimed to induce the isolation of fungi. The minimal medium culture MCBE7 was chosen to induce the isolation of yeasts and bacteria. Despite the pH difference between the culture media, it was possible to observe bacteria and fungi growth in both media.

2.2. Evaluation of the Enzyme Activity of Microorganisms

Enantioselective oxidations of alcohols, *para*-substituted (*RS*)-1-phenylethanols, were used to evaluate the enzyme activity (oxidoreductases, OXRED) of 232 microorganisms psychrophile/psychrotroph previously isolated (Scheme 1).

Scheme 1. Enantioselective oxidation of (*RS*)-1-phenylethanol and its derivatives.

From this study, 15 microorganisms presented oxidoreductases that catalyzed the oxidation of the (*S*)-enantiomer of racemic alcohols to their corresponding ketones. Therefore, the (*R*)-alcohols remained intact with high enantiomeric excesses (up to >99%). It was considered as good enzyme activity (OXRED), conversions of alcohol to ketone > 10% and enantiomeric excess >60%. Some of the results are shown in Table 2.

As shown in Table 2, the enzyme activities of the microorganisms were very high when the R substituent in alcohols (1–6) was a methoxy group. In these cases, considering a kinetic resolution process, the alcohols conversions to their corresponding ketones were excellent (Entries 3, 9, 21 and 33), and in some cases the enantiomeric excesses were higher than 99% (Entries 3, 9 and 21). It is noteworthy that, in a reaction of kinetic resolution the maximum conversion is 50%.

In reactions mediated by bacterium HK1D10 cells, in which the R substituent was halogen, low conversions (~1%) and no selectivity were observed (Entries 34 and 35). In general, all microorganisms produce oxidoreductases with preferential oxidation for the (*S*)-enantiomer from the (*RS*)-alcohols (1–6)

Table 2. Evaluation of the enzymatic activity of microorganisms isolated from soil/sediment samples collected in the Antarctic.

Entry	Microorganism	R	Ketone/Alcohol ^a	Alcohol e.e. (%) ^a
1	MPS8D3	H	11/89	25 (<i>R</i>)
2		Me	22/78	92 (<i>R</i>)
3		MeO	46/54	>99 (<i>R</i>)
4		Cl	21/79	89 (<i>R</i>)
5		Br	23/77	96 (<i>R</i>)
6		NO ₂	43/57	57 (<i>R</i>)
7	HK1D9	H	16/84	22 (<i>R</i>)
8		Me	27/73	97 (<i>R</i>)
9		MeO	47/53	>99 (<i>R</i>)
10		Cl	25/75	95 (<i>R</i>)
11		Br	4/96	17 (<i>R</i>)
12		NO ₂	34/66	33 (<i>R</i>)
13	HK2D2	H	6/94	10 (<i>R</i>)
14		Me	17/83	57 (<i>R</i>)
15		MeO	25/75	45 (<i>R</i>)
16		Cl	16/84	52 (<i>R</i>)
17		Br	21/79	61 (<i>R</i>)
18		NO ₂	7/93	6 (<i>R</i>)
19	MPS4D2	H	8/92	22 (<i>R</i>)
20		Me	17/83	93 (<i>R</i>)
21		MeO	44/56	>99 (<i>R</i>)
22		Cl	15/85	69 (<i>R</i>)
23		Br	19/81	87 (<i>R</i>)
24		NO ₂	21/79	22 (<i>R</i>)
25	HK1D8	H	2/98	3
26		Me	5/95	17 (<i>R</i>)
27		MeO	15/85	22 (<i>R</i>)
28		Cl	5/95	15 (<i>R</i>)
29		Br	5/95	15 (<i>R</i>)
30		NO ₂	5/95	15 (<i>R</i>)
31	HK1D10	H	11/89	17 (<i>R</i>)
32		Me	9/91	24 (<i>R</i>)
33		MeO	41/59	79 (<i>R</i>)
34		Cl	1/99	1
35		Br	1/99	2
36		NO ₂	4/96	2

Reaction conditions: (*RS*)-alcohols 1–6 (0.75 mmol), culture medium MCBE7 (pH 7.0, 2 mL), 20 °C, 160 rpm, 72 h. ^a Determined by GC using a chiral column Chiral-Dex-CB; e.e.: enantiomeric excess.

Based on these results we decided to perform only the identification of microorganisms that showed excellent enzyme activity. For this purpose *Flavobacterium* sp. (HK1D9) and *Arthrobacter* sp. (MPS8D3) were selected. These bacteria were isolated from soil and sediment samples, respectively.

The chromatograms from oxidation reaction of the compound (*RS*)-**3** mediated by cells of *Flavobacterium* sp. and *Arthrobacter* sp. (Table 2, Entries 3 and 9) are shown in Figure 1, as an example of the chiral analysis using GC employed for this enzyme evaluation step.

Figure 1. Analysis using GC. (a) Sample containing a mixture of (*RS*)-1-(4-methoxyphenyl)ethanol and 4-methoxyacetophenone. (b) Sample from oxidation reaction of (*RS*)-**3** mediated by *Arthrobacter* sp. (c) Sample from oxidation reaction of (*RS*)-**3** mediated by *Flavobacterium* sp.

According to the chromatogram obtained from oxidation reaction of the (*RS*)-**3** mediated by *Arthrobacter* sp. (Figure 1b) and *Flavobacterium* sp. (Figure 1c), it can be seen that the (*S*)-enantiomer was oxidized, leaving the unreacted alcohol (*R*)-**3** with high enantiomeric excess.

2.3. Optimization of the Enantioselective Oxidation Reaction Using *Flavobacterium* sp. and *Arthrobacter* sp.

Flavobacterium sp. and *Arthrobacter* sp. were selected to be applied in the optimization study due to their high enantioselective performance in the oxidation reaction of the alcohols (*RS*)-**1**–**6**. Based on the good results presented in Table 2 (Entries 2, 8, 14, 20) and by the fast GC analysis using a chiral column, we selected (*RS*)-**1**-(4-methylphenyl)ethanol as model substrate for this optimization study.

A survey in the literature indicated that psychrophile/psychrotroph microorganisms tolerate temperatures between 0 and 40 °C [17–22]. The temperature corresponds to one of the major environmental factors that can influence the bacterial growth, when the temperature is increased, the chemical and enzymatic reactions in cells tend to become faster, thus accelerating the growth rate [23].

In order to determine the ideal reaction conditions for achieving an excellent kinetic resolution process mediated by *Flavobacterium* sp. (HK1D9) and *Arthrobacter* sp. (MPS8D3), the bacterial cells were resuspended in phosphate buffer solution (Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7.0, 0.1 mol/L).

The selected temperatures were 5, 10, 15, 20, 25 and 30 °C (each one is tolerated by psychrotroph microorganisms) [18]. These temperatures were used for both bacterial growth and alcohol oxidation reaction. The results are shown in Table 3.

When the bacterial growing and reactions were performed at 15 °C and 25 °C (*Flavobacterium* sp.) excellent oxidoreductase activities were observed. The best conversion of the (*RS*)-alcohol **2** to ketone (45%) was obtained after 24 h reaction at 25 °C (Table 3, Entry 13.). Along the reaction, there was a few decrease in ketone concentration and an increase in (*R*)-**1**-(4-methylphenyl)ethanol concentration and, consequently its enantiomeric excess (Table 3, Entries 13–15). In an oxidative kinetic resolution process, the ratio of the ketone and a single alcohol enantiomer concentration should be 1:1. The above mentioned behavior indicates the presence of ketoreductase that catalyzes enantioselectively the reduction of the produced 4-methylacetophenone to the (*R*)-**1**-(4-methylphenyl)ethanol, resulting in a higher (*R*)-alcohol concentration than 50%. This process can be called as deracemisation (Scheme 2).

Table 3. Oxidation of the (*RS*)-**1**-(4-methylphenyl)ethanol (**2**) mediated by *Flavobacterium* sp. and *Arthrobacter* sp. at different temperatures for bacterial growth and oxidation reaction.

Entry	Temp. (°C) ^a	Time (h)	<i>Flavobacterium</i> sp. (HK1D9)	
			Ketone/Alcohol ^b	Alcohol e.e. (%) ^b
1	5	24	nd	nd
2		48	nd	nd
3		72	nd	nd
4	10	24	5/95	10 (<i>R</i>)
5		48	14/86	21 (<i>R</i>)
6		72	14/86	24 (<i>R</i>)
7	15	24	32/68	42 (<i>R</i>)
8		48	46/54	78 (<i>R</i>)
9		72	48/52	91 (<i>R</i>)

Table 3. Cont.

10		24	42/58	76 (<i>R</i>)
11	20	48	41/59	83 (<i>R</i>)
12		72	49/51	96 (<i>R</i>)
13		24	45/55	89 (<i>R</i>)
14	25	48	40/60	93 (<i>R</i>)
15		72	33/67	95 (<i>R</i>)
16		24	nd	nd
17	30	48	nd	nd
18		72	nd	nd
<i>Arthrobacter</i> sp. (MPS8D3)				
19		24	-	-
20	5	48	-	-
21		72	1/99	-
22		24	1/99	1
23	10	48	2/98	1
24		72	5/95	11 (<i>R</i>)
25		24	40/60	94 (<i>R</i>)
26	15	48	37/63	96 (<i>R</i>)
27		72	34/66	96 (<i>R</i>)
28		24	40/60	95 (<i>R</i>)
29	20	48	36/64	95 (<i>R</i>)
30		72	30/70	96 (<i>R</i>)
31		24	38/62	96 (<i>R</i>)
32	25	48	34/66	95 (<i>R</i>)
33		72	30/70	95 (<i>R</i>)
34		24	-	-
35	30	48	1/99	-
36		72	2/98	4

Reaction conditions: (*RS*)-alcohol **2** (0.75 mmol), cells harvested from culture medium (100 mL) and resuspended in phosphate buffer solution (0.1 mol/L, pH 7.0, 10 mL), 5–30 °C, 160 rpm, 24–72 h;

^a Temperature for bacterial growth and oxidation reaction; ^b Determined by GC using a chiral column Chiral-Dex-CB; nd = not carried out due to very low biomass concentration.

Scheme 2. Deracemisation process mediated by *Flavobacterium* sp. (HK1D9).

The *Arthrobacter* sp. (MPS8D3) showed good enzyme activity at 15, 20 and 25 °C (24 h), since under these temperatures, the highest enantiomeric excess and concentration of the (*R*)-1-(4-methylphenyl)ethanol were obtained (Table 3, Entries 25, 28 and 31). On the other hand, it was observed that *Flavobacterium* sp. and *Arthrobacter* sp. exhibited very low enzyme activity at 10 °C, since the values of ketone conversions and alcohol e.e. were very low (Table 3, Entries 4–6 and 22–24).

It is noteworthy to mention that there is few deracemisation process described in the literature performed by a single microorganism [3,24–28] or without the aid of chemical agents [29,30]. This phenomenon is extremely interesting to be pursued in bioprospecting process.

We decided to study the oxidation of (*RS*)-1-(4-methylphenyl)ethanol at different temperatures (5, 10, 15, 20, 25, 30 °C) after growthing the *Flavobacterium* sp. and *Arthrobacter* sp. at a specific temperature, 15 or 25 °C. The bacterial growth temperatures were selected due to the good results of conversions and enantioselectivities of the alcohol oxidation (Table 3, Entries 7–9, 13–17 and 31–33). The main goal of this study was to evaluate the enantioselectivity of oxidoreductases produced by bacterial growth at 15 and 25 °C in the oxidation reaction carried out at different temperatures (Tables 4 and 5).

Table 4. Growth of *Flavobacterium* sp. and *Arthrobacter* sp. at 25 °C and oxidation of (*RS*)-1-(4-methylphenyl)ethanol (**2**) at different reaction temperature.

Flavobacterium sp. (HK1D9)				
Entry	Temp. (°C) ^a	Time (h)	Ketone/Alcohol ^b	Alcohol e.e. (%) ^b
1	5	24	39/61	39 (R)
2		48	39/61	79 (R)
3		72	45/55	95 (R)
4	10	24	35/65	62 (R)
5		48	44/56	95 (R)
6		72	51/49	>99 (R)
7	15	24	25/75	36 (R)
8		48	43/57	83 (R)
9		72	43/57	95 (R)
10	20	24	28/72	49 (R)
11		48	35/65	80 (R)
12		72	38/62	83 (R)
13	25	24	45/55	89 (R)
14		48	40/60	93 (R)
15		72	33/67	95 (R)
16	30	24	7/93	6 (R)
17		48	6/94	9 (R)
18		72	7/93	18 (R)
Arthrobacter sp. (MPS8D3)				
19	5	24	40/60	88 (R)
20		48	44/56	96 (R)
21		72	43/57	96 (R)

Table 4. Cont.

22		24	40/60	94 (R)
23	10	48	46/54	97 (R)
24		72	41/59	96 (R)
25		24	41/59	>99 (R)
26	15	48	37/63	>99 (R)
27		72	36/64	>99 (R)
28		24	43/57	98 (R)
29	20	48	38/63	98 (R)
30		72	36/64	>99 (R)
31		24	45/55	89 (R)
32	25	48	40/60	93 (R)
33		72	33/67	95 (R)
34		24	42/58	97 (R)
35	30	48	33/67	97 (R)
36		72	27/73	97 (R)

Reaction conditions: (R,S)-alcohol **2** (0.75 mmol), cells harvested from culture medium (100 mL) and resuspended in phosphate buffer solution (0.1 mol/L, pH 7.0, 10 mL), 5–30 °C, 160 rpm, 24–72 h; Temperature for bacterial growth = 25 °C; ^a Temperature for oxidation reaction; ^b Determined by GC using a chiral column Chiral-Dex-CB.

Analyzing the data in Table 4, in which *Flavobacterium* sp. grew at 25 °C, we found low enzyme activity for the oxidation of (R,S)-1-(4-methylphenyl) ethanol at 30 °C leading to low ketone conversion and enantioselectivity (Entries 16–18). However, this bacterium showed good enzyme activity in other temperatures (Entries 1–15). In general there was an increase in conversion and enantioselectivity with increasing reaction time. However, the best oxidation performance was observed at 10 °C and 72 h of reaction (Table 4, Entry 6). In this case, a perfect kinetic resolution process was achieved, ketone conversion 50% and alcohol e.e. > 99%.

Table 5. Growth of the *Flavobacterium* sp. and *Arthrobacter* sp. at 15 °C and oxidation reaction of the (R,S)-1-(4-methylphenyl)ethanol (**2**) at different reaction temperatures.

<i>Flavobacterium</i> sp. (HK1D9)				
Entry	Temp. (°C) ^a	Time (h)	Ketone/Alcohol ^b	Alcohol e.e. (%) ^b
1		24	5/95	15 (R)
2	5	48	16/84	30 (R)
3		72	21/79	43 (R)
4		24	19/81	21 (R)
5	10	48	34/66	65 (R)
6		72	42/58	89 (R)
7		24	25/75	36 (R)
8	15	48	43/57	83 (R)
9		72	43/57	95 (R)
10		24	16/84	44 (R)
11	20	48	34/66	73 (R)
12		72	41/59	96 (R)

Table 5. Cont.

13		24	27/73	53 (<i>R</i>)
14	25	48	33/67	77 (<i>R</i>)
15		72	34/66	87 (<i>R</i>)
16		24	9/91	9 (<i>R</i>)
17	30	48	9/91	10 (<i>R</i>)
18		72	6/94	12 (<i>R</i>)
<i>Arthrobacter</i> sp. (MPS8D3)				
19		24	42/58	90 (<i>R</i>)
20	5	48	42/58	>99 (<i>R</i>)
21		72	45/55	>99 (<i>R</i>)
22		24	41/59	95 (<i>R</i>)
23	10	48	41/59	97 (<i>R</i>)
24		72	43/47	97 (<i>R</i>)
25		24	35/65	89 (<i>R</i>)
26	15	48	34/66	97 (<i>R</i>)
27		72	31/69	98 (<i>R</i>)
28		24	42/58	98 (<i>R</i>)
29	20	48	36/64	98 (<i>R</i>)
30		72	33/67	98 (<i>R</i>)
31		24	43/57	>99 (<i>R</i>)
32	25	48	36/64	>99 (<i>R</i>)
33		72	32/68	>99 (<i>R</i>)
34		24	37/63	96 (<i>R</i>)
35	30	48	33/67	97 (<i>R</i>)
36		72	25/75	97 (<i>R</i>)

Reaction conditions: (*RS*)-alcohol **2** (0.75 mmol), cells harvested from culture medium (100 mL) and resuspended in phosphate buffer solution (0.1 mol/L, pH 7.0, 10 mL), 5–30 °C, 160 rpm, 24–72 h; Temperature for bacterial growth = 15 °C; ^aTemperature for oxidation reaction; ^bDetermined by GC using a chiral column Chiral-Dex-CB.

The reactions carried out under several temperatures and mediated by cells of *Arthrobacter* sp. resulted in moderate to excellent alcohol e.e. and ketone conversion (Table 4, Entries 19–36). For example, oxidation reactions carried out at 15 to 30 °C, there was a decrease in ketone concentration and an increase in alcohol e.e. over the reaction time (Table 4, Entries 25–36). The *Flavobacterium* sp. has oxidoreductase with high activity at 10 °C and *Arthrobacter* sp. at 15 and 20 °C.

When the microbial growing temperature was 15 °C (*Flavobacterium* sp.) a low enzyme activity was observed at 5 and 30 °C. These reactions afforded low values of ketone concentration and enantioselectivities (Table 5, Entries 1–3 and 16–18). However, the best ketone concentration and enantioselectivity were observed for reactions carried out at 15 and 20 °C (Table 5, Entries 9 and 12).

On the other hand, *Arthrobacter* sp. showed good enzyme activity at 5 and 10 °C after 48 and 72 hours, since it was obtained high enantiomeric excess for the alcohol (*R*)-**2**, up to >99% (Table 5, Entries 20, 21, 23 and 24). We also can see that *Arthrobacter* sp. showed good enzymatic activity at reaction temperatures of 15–30 °C, in which ketone conversions and e.e. for the alcohol (*R*)-**2** were

moderate to excellent (Table 5, Entries 25–36). At these temperatures, the value of (*R*)-alcohol concentration is higher than 50% with increasing the reaction time. As observed for *Flavobacterium* sp. (Table 3 and Scheme 2), this process indicates the presence of ketoreductase that catalyzes enantioselectively the reduction of the produced 4-methylacetophenone to the (*R*)-1-(4-methylphenyl)ethanol, resulting a high (*R*)-alcohol concentration.

In general, it was observed that *Arthrobacter* sp. and *Flavobacterium* sp. had excellent enzyme activity with growth temperature at 25 °C.

Therefore, we decided to determine the growth curves of *Flavobacterium* sp. and *Arthrobacter* sp. at 15, 20 and 25 °C (Figure 2). By spectrophotometric analysis of optical density (OD) of bacterial culture it was evaluated the turbidity and estimated the relative concentration cell.

Figure 2. Spectrophotometric analysis of optical density (OD) of the culture of *Flavobacterium* sp. (A) and *Arthrobacter* sp. (B). Culture medium (600 mL), (*RS*)-1-(phenyl)ethanol (1 mmol/L), 160 rpm.

According to the Figure 2, it was noted that *Flavobacterium* sp. and *Arthrobacter* sp. grew well at 25 °C and exhibited excellent enzyme activity at this temperature (Table 4, Entries 13–15 and 31–33). Then, it was concluded that these bacteria are psychrotroph since it excludes the possibility of psychrophile, in which the maximum temperature for growth is 20 °C. This conclusion was based on literature data about the identification of psychrotroph microorganism [17,31,32].

3. Experimental Section

3.1. General Methods

Acetophenone, 1-(4-methylphenyl)ethanone, 1-(4-methoxyphenyl)ethanone, 1-(4-bromophenyl)ethanone, 1-(4-chlorophenyl)ethanone and 1-(4-nitrophenyl)ethanone were purchased from Aldrich and used without further purification. Thin-layer chromatography (TLC) was performed using pre-coated plates (Aluminum foil, silica gel 60 F₂₅₄ Merck, 0.25 mm). Silica gel (Acros Organics, 0.035–0.070 mm, 240–400 mesh) was used for flash chromatography. Low Resolution Mass Spectra (LRMS) were recorded on a Shimadzu GCMS P5050A (70 eV) spectrometer and GC capillary column used was a DB-5-MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm, J&W Scientific), carrier gas-He, 100 kPa; injector 270 °C; detector 270 °C. Temperature program 100–250 °C, rate 10 °C/min. GC analyses were performed in a Shimadzu GC-17A instrument with a FID detector using hydrogen as carrier gas (100 kPa), autosampler AOC20i. It was used a GC chiral capillary column, Chirasil-Dex CB β-cyclodextrin (25 m × 0.25 mm, Varian), for determination of the conversion and enantiomeric excesses. Sterile materials were used to perform the experiments and the microorganisms were handled in a laminar flow cabinet Fisher Hamilton *Class II Biological Safety Cabinet*.

3.2. Preparation of the (RS)-1-(Phenyl)ethanols (1–6) [33]

To a solution of acetophenones (7–12) (10 mmol) in methanol (20 mL) was added NaBH₄ (11.1 mmol, 420 mg), and the mixture was stirred at room temperature for 4 h. The methanol was removed by vacuum evaporation. Distilled water (20 mL) was added into the reaction mixture and the pH adjusted to 6 with aqueous solution of HCl (1 mmol/L), then the aqueous layer was extracted with methylene dichloride (3 × 30 mL). The organic phases were combined and dried over MgSO₄. The solvent was removed in vacuum and the residue was purified by silica gel column chromatography eluting with a mixture of hexane and ethyl acetate (4:1) to afford compounds (RS)-1–6. The ¹H NMR and ¹³C NMR spectra of these compounds were in agreement with those reported in the literature [34,35].

3.3. Procedures for Bioprospection

3.3.1. Soil and Sediment Sampling Procedure

Soil and sediment samples were collected from environmental preservation area in Antarctic Peninsula (Admiralty Bay, King George Island, Antarctic in 2008): Peninsula Keller (21 E 427302, UTM 3115830); (21 E 425986, UTM 3117583); (21 E 426110, UTM 3118275); Machu Picchu (21 E 423394, UTM 3114505); Ponta Hennequin (21 E 427680, UTM 3111880); Arctowski (21 E 423807, UTM 3106862); Ponta Demay (21 E 425211, UTM 3100473); Ponta Botany (21 E 424432, UTM 3092107); Ponta Steinhouse (21 E 425419, UTM 3110733); The samples were collected under clean, sterile conditions and kept frozen in polyethylene tubes at −20 °C.

3.3.2. Culture Media

The culture media were (amount of the ingredients are indicated per liter):

-MCFE7 (pH = 5.6) = (*RS*)-1-(phenyl)ethanol–1 mmol, 0.122 g, 122 μ L), KH_2PO_4 (0.1%; 1.0 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.04%; 0.4 g), NH_4Cl (0.04%; 0.4 g), Dextrose (Oxoid) (0.025%; 0.25 g), Peptone (Oxoid) (0.025%; 0.25 g), agar (Oxoid) (2.0%; 20.0 g; when needed).

-MCBE7 (pH = 7.0) = (*RS*)-1-(phenyl)ethanol–1 mmol, 0.122 g, 122 μ L), K_2HPO_4 (0.2%; 2.0 g), KH_2PO_4 (0.1%; 1.0 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.04%; 0.4 g), NH_4Cl (0.04%; 0.4 g), Meat Extract (Oxoid) (0.025%; 0.25 g), Peptone (Oxoid) (0.025%; 0.25 g), agar (Oxoid) (2.0%; 20.0 g; when needed).

3.3.3. Isolation and Growth of Microorganisms

A soil suspension was prepared by adding 20 mL of sterile phosphate buffer solution (pH 7.0, 0.1 mol/L) to 2.0 g of the soil or sediments sample. It was stirred, the solution resting for about 1 minute for sedimentation and 200 μ L of the supernatant were incubated (in duplicate) in a polypropylene microtiter plate (each well consisting of a 10 mL total volume capacity; Whatman) containing 2 mL of the appropriate culture media:

a-One microtiter plate contains MCFE7 culture medium;

b-One microtiter plate contains MCBE7 culture medium;

After 4 days of incubation for MCFE7-containing microtiter plate and 2 days of incubation for MCBE7-containing microtiter plate at 20 °C, aliquots of 100 μ L of microorganisms culture from each well was sprayed onto the culture medium agar plates to microorganisms isolation step.

From each microorganism culture sample (100 μ L) that was plated onto solid culture medium, individual colonies appeared. Each colony was inoculated separately into 20 mL of appropriate culture media in Erlenmeyer flasks (125 mL) and incubated in an orbital shaker during 2 or 4 days (160 rpm, 20 °C).

3.4. Enzyme Assays

From each pre-culture obtained previously, a 750 μ L aliquot was transferred to microtubes containing 250 μ L of glycerol for cryo-preservation (−20 °C). Another 200 μ L were transferred to inoculate in a sterile polypropylene microtiter plate containing 2 mL of culture media per well. The plates were kept at 20 °C in an orbital shaker (160 rpm) during 2 or 4 days and then 40 μ L of a solution of each alcohol (1–6, 5 mmol/L) in dimethylformamide were added to each well of the plate. The microtiter plates were returned to the same incubation condition as described above for 72 hour. Each well content was extracted by stirring with *tert*-butyl methyl ether (2.0 mL) followed by centrifugation (6000 rpm, 1 min.). The organic phase was analyzed by GC using a chiral capillary column (see Section 3.5).

3.5. GC Analysis

GC conditions (carrier gas- H_2 , 100 kPa): injector 220 °C; detector 220 °C. Isotherm and t_R (min): retention time of chiral compounds: (*RS*)-phenyl-ethanol: 107 °C, *R*-enantiomer 6.22 min, *S*-enantiomer 6.87 min; (*RS*)-1-(4-methyl-phenyl)-ethanol: 113 °C, *R*-enantiomer 6.79 min,

S-enantiomer 7.71 min; (*RS*)-1-(4-methoxy-phenyl)-ethanol: 119 °C, *R*-enantiomer 6.22 min, *S*-enantiomer 6.87 min; (*RS*)-1-(4-chloro-phenyl)-ethanol: 130 °C, *R*-enantiomer 7.33 min, *S*-enantiomer 8.19 min; (*RS*)-1-(4-bromo-phenyl)-ethanol: 135 °C, *R*-enantiomer 9.54 min, *S*-enantiomer 10.52 min; (*RS*)-1-(4-nitro-phenyl)-ethanol: 150 °C, *R*-enantiomer 19.92 min, *S*-enantiomer 20.30 min. The enantiomeric excess (ee) was defined as the ratio of $\{([R] - [S])/([R] + [S])\} \times 100\%$, where [R] and [S] are the concentrations of (*R*) and (*S*) enantiomers, respectively.

3.6. Microorganisms Library and Preservation

The microorganism strains with the best performance in enzyme assays were stored in a freezer at −20 °C. They were preserved as suspensions in glycerol solution (20%) using two different culture media described in Section 3.3.2.

3.7. Bacteria Identification

The bacteria with the best performance in enzyme assays were identified using 16S rDNA sequencing analysis and comparison with GenBank top hits after a BLAST search [36].

3.8. Effect of Temperature and Reaction Time on the Oxidation Reactions Using *Flavobacterium* sp. and *Arthrobacter* sp.

Cultures of *Flavobacterium* sp. and *Arthrobacter* sp. were separately inoculated under sterile conditions into 20 mL of appropriate culture media in Erlenmeyer flasks (125 mL) and incubated in an orbital shaker during 2 days (160 rpm, 20 °C). After that, the cultures were transferred separately to two Erlenmeyer flasks (2000 mL) containing 600 mL of sterilized culture media and incubated again. Then the cells were harvested by centrifugation at 20 °C on Sorvall RC-5B (Plus rotor) for 15 min at 5000 rpm. The harvested cells were resuspended in 60 mL of sterile phosphate buffer solution (Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7.0, 0.1 mol/L), divided equally in 6 Erlenmeyer flasks (125 mL) and an aliquot (200 µL) of substrate solution (*RS*)-1-(4-methylphenyl)ethanol (1 mmol/L) was added to each flask. The mixture was kept at different temperatures (5, 10, 15, 20, 25 and 30 °C) in an orbital shaker (160 rpm) during 1, 2 or 3 days. The products of the total reaction volume (10 mL) were extracted by stirring with *tert*-butyl methyl ether (2.0 mL) followed by centrifugation (6000 rpm, 1 min.). The organic phase was analyzed by GC using a chiral capillary column (see Section 3.5).

3.9. Growth Measurements

Growth curve experiments were performed with Erlenmeyer flasks (2000 mL) containing 1000 mL of sterilized culture media and 100 mL of inoculated cultures. The mixture was incubated in an orbital shaker (160 rpm, 15, 20 and 25 °C). Samples of culture (1 mL) were periodically removed at 120 min intervals and the growth was estimated spectrophotometrically (and expressed as optical density [O.D.]) at 600 nm with a Biospectro model sp-220 spectrophotometer using cells with a 1 cm light path.

The replicate values were averaged and the O.D. was plotted against time on linear coordinates.

3.10. Absolute Configuration

The absolute configurations of all compounds were determined by comparison of the sign of the measured specific rotation with those in the literature [37–39].

4. Conclusions

In summary, the enrichment technique using (*RS*)-1-(phenyl)ethanol, as a carbon source, was a very important tool for the selection of microorganisms producing cold-active oxidoreductases. Samples of soil and sediment from the Antarctic provided 232 microorganisms. The enzyme activity (oxidoreductase) of these microorganisms was evaluated in the oxidation of racemic alcohols. Fifteen microorganisms presented oxidoreductases which catalyzed the oxidation of the (*S*)-enantiomer from racemic alcohol to its corresponding ketone. Therefore, the (*R*)-alcohol remained intact and with high enantiomeric excess (up to >99%). After the optimization study, *Flavobacterium* sp. showed excellent enzyme activity with temperature of growth and oxidation reaction at 25 °C and 10 °C, respectively. However, *Arthrobacter* sp. presented excellent enzyme activity with temperature of growth and oxidation reaction at 25 °C. After the determination of growth curves for *Flavobacterium* sp. and *Arthrobacter* sp., it was possible to classify them as psychrotroph, since the best temperature for bacterial growth was 25 °C and 20 °C, respectively. Further studies regarding enzyme purification are in progress in our laboratory.

Acknowledgments

We thank CNPq, CAPES and FAPESP for their financial support. The authors also would like to thank Priscila I. Ushimaru for helping us in the bacteria identification.

References

1. Soni, P.; Banerjee, U.C. Enantioselective reduction of acetophenone and its derivatives with a new yeast isolate *Candida tropicalis* PBR-2 MTCC 5158. *Biotechnol. J.* **2006**, *1*, 80–85.
2. Matsuda, T.; Yamanaka, R.; Nakamura, K. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 513–557.
3. Voss, C.V.; Gruber, C.C.; Kroutil, W. Deracemisation of secondary alcohols via biocatalytic stereoinversion. *Synlett* **2010**, *7*, 991–998.
4. Ishige, T.; Honda, K.; Shimizu, S. Whole organism biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 174–180.
5. Cardenas, F.; Alvarez, E.; de Castro-Alvarez, M.S.; Sanchez-Montero, J.M.; Valmaseda, M.; Elson, S.W.; Sinisterra, J.V. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *14*, 111–123.
6. Andrade, L.H.; Comasseto, J.V.; Rodrigues, D.F.; Pellizari, V.H.; Porto, A.L.M. Enantioselective reduction of *ortho*-substituted acetophenones by bacterial strains isolated from medium enriched with biphenyl or diesel fuel. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2005**, *33*, 73–79.

7. Yoon, J.; Miwa, H.; Ahmed, I.; Yokota, A.; Fujiwara, T. *Rhodococcus baikonurensis* BTM4c, a boron-tolerant actinobacterial strain isolated from soil. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2010**, *74*, 178–181.
8. Lo Giudice, A.; Bruni, V.; Michaud, L. Characterization of Antarctic psychrotrophic bacteria with antibacterial activities against terrestrial microorganisms. *J. Basic Microb.* **2007**, *47*, 496–505.
9. Marx, J.C.; Collins, T.; D'Amico, S.; Feller, G.; Gerday, C. Cold-adapted enzymes from marine antarctic microorganisms. *Mar. Biotechnol.* **2007**, *9*, 293–304.
10. Cavicchioli, R.; Siddiqui, K.S.; Andrews, D.; Sowers, K.R. Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr. Opin. Biotech.* **2002**, *13*, 253–261.
11. Russell, N.J. Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophiles* **2000**, *4*, 83–90.
12. Kazuoka, T.; Oikawa, T.; Kuroda, I.M.S.; Soda, K. Cold-active and thermostable alcohol dehydrogenase of a psychrotolerant from Antarctic seawater, *Flavobacterium frigidimaris* KUC-1. *Extremophiles* **2007**, *11*, 257–267.
13. Feller, G.; Arpigny, J.L.; Narinx, E.; Gerday, C. Molecular adaptations of enzymes from psychrophilic organisms. *Comp. Biochem. Physiol.* **1997**, *118A*, 495–499.
14. Velonia, K.; Tsigos, I.; Bouriotis, V.; Smonou, I. Stereospecificity of hydrogen transfer by the NAD⁺-linked alcohol dehydrogenase from the antarctic psychrophile *Moraxella* sp. TAE123. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 65–68.
15. D'Amico, S.; Marx, J.C.; Gerday, C.; Feller, G. Activity stability relationships in extremophilic enzymes. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 7891–7896.
16. Cripps, R.E.; Trudgill, P.W.; Whateley, J.G. The metabolism of 1-phenylethanol and acetophenone by *Nocardia* T5 and an *Arthrobacter* species. *Eur. J. Biochem.* **1978**, *86*, 175–186.
17. Morita, R.Y. Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **1975**, *39*, 144–167.
18. Feller, G.; D'Amico, D.; Gerday, C. Thermodynamic stability of a cold-active α -amylase from the Antarctic bacterium *Alteromonas haloplanktis*. *Biochemistry* **1999**, *38*, 4613–4619.
19. Rashid, N.; Kikuchi, H.; Ezaki, S.; Atomi, H.; Imanaka, T. Isolation and characterization of psychrotrophs from subterranean environments. *J. Biosci. Bioeng.* **1999**, *87*, 746–751.
20. Connaughton, S.; Collins, G.; O'Flaherty, V. Psychrophilic and mesophilic anaerobic digestion of brewery effluent: A comparative study. *Water Res.* **2006**, *40*, 2503–2510.
21. Hoover, R.B.; Pikuta, E.V. Psychrophilic and psychrotolerant microbial extremophiles in polar environments. *Polar Microbiol.* **2010**, *115*–156.
22. Irwin, J.A. Extremophiles and their application to veterinary medicine. *Environ. Technol.* **2010**, *31*, 857–869.
23. Cavicchioli, R.; Thomas, T.; Curni, P.M.G. Cold stress response in *Archaea*. *Extremophiles* **2000**, *4*, 321–331.
24. Kroutil, W.; Mischitz, M.; Faber, K. Deracemization of ($\pm$)-2,3-disubstituted oxiranes via biocatalytic hydrolysis using bacterial epoxide hydrolases: kinetics of an enantioconvergent process. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, *24*, 3629–3636.
25. Allan, G.R.; Carnell, A.J. Microbial deracemization of 1-aryl and 1-heteroaryl secondary alcohols. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6495–6497.

26. Gareth, C.J.; Andrew C.J.; Harald, T.; Thomas, R. Microbial deracemisation of *N*-(1-hydroxy-1-phenylethyl)benzamide. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 239–243.
27. Demir, A.S.; Hamamci, H.; Sesenoglu, O.; Neslihanoglu, R.; Asikoglu, B.; Capanoglu, D. Fungal deracemization of benzoin. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6447–6449.
28. 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.
29. Orri, R.V.A.; Kroutil, W.; Faber, K. Deracemization of ($\pm$)-2,2-disubstituted epoxides via enantioconvergent chemoenzymatic hydrolysis using *Nocardia* EH1 epoxide hydrolase and sulfuric acid. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1753–1754.
30. 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.
31. Russell, N.J. Cold adaptation of microorganisms. *Phil. Trans. R. Soc. B* **1990**, *326*, 595–611.
32. Feller, G.; Arpigny, J.L.; Narinx, E.; Gerday, C. Molecular adaptations of enzymes from psychrophilic organisms. *Comp. Biochem. Physiol.* **1997**, *118*, 495–499.
33. Andrade, L.H.; Polak, R.; Porto, A.L.M.; Schoenlein-Crusius, I.H.; Comasseto, J.V. Application of bioreduction by microorganisms in the enantioselective synthesis of α -substituted-1-phenylethanol. *Lett. Org. Chem.* **2006**, *3*, 613–618.
34. Nakamura, K.; Matsuda, T. Asymmetric reduction of ketones by the acetone powder of *Geotrichum candidum*. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8957–8964.
35. Salvi, N.A.; Chattopadhyay, S. Studies on *Rhizopus arrhizus* mediated enantioselective reduction of arylalkanones. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 2833–2839.
36. Nogales, B.; Moore, E.R.B.; Brossa, E.L.; Mora, R.R.; Amann, R.; Timmis, K.N. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 1874–1884.
37. 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.
38. Yadav, J.S.; Nanda, S.; Reddy, T.P.; Rao, A.B. Efficient enantioselective reduction of ketones with *Daucus carota* Root. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3900–3903.
39. Kim, M.J.; Kim, H.M.; Kim, D.; Ahn, Y.; Park, J. Dynamic kinetic resolution of secondary alcohols by enzyme-metal combinations in ionic liquid. *Green Chem.* **2004**, *6*, 471–474.

Samples Availability: Available from the authors.

© 2011 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Exploiting the enzymatic machinery of *Arthrobacter atrocyaneus* for oxidative kinetic resolution of secondary alcohols

Camila R. Silva^a, Juliana C. Souza^b, Lidiane S. Araújo^a, Edna Kagohara^a, Thaís P. Garcia^a, Vivian H. Pelizzari^b, Leandro H. Andrade^{a,*}

^a Institute of Chemistry, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 748, SP 05508-900 São Paulo, Brazil

^b Institute of Oceanography, University of São Paulo, Praça do Oceanográfico 191, SP 05508-120 São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 March 2012

Received in revised form 11 June 2012

Accepted 24 June 2012

Available online 13 July 2012

Keywords:

Arthrobacter atrocyaneus

Oxidoreductases

Alcohol dehydrogenase

Chiral alcohols

ABSTRACT

We evaluated *Arthrobacter atrocyaneus* (R1AF57) as producer of oxidoreductases for oxidative kinetic resolution of racemic secondary alcohols via oxidation reaction. This bacterium was isolated from Amazon soil samples using medium enriched with (R,S)-1-(4-methylphenyl)ethanol as a carbon source. The kinetic resolution of several secondary alcohols through enantioselective oxidation mediated by resting cells and growing cells of *A. atrocyaneus* was efficiently achieved for the most alcohols. In general, it was possible to obtain only the (S)-enantiomer from (R,S)-1-arylethanol.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Biooxidations of alcohols to ketones mediated by isolated oxidoreductases and whole cell systems are well established [1–4]. However, a literature survey revealed that there are fewer reports on enantioselective enzymatic oxidation of alcohols than enantioselective reduction of ketones to achieve chiral alcohols. These compounds are interesting chiral building blocks for the synthesis of natural products, pharmaceutical, and agriculture chemicals [1,5–9].

Enzymes such as hydrolases and oxidoreductases are generally used for kinetic resolutions, because they can transform selectively one enantiomer from a racemic mixture into a new compound, enabling physical separation after the reaction [10–12]. Oxidoreductases used in the oxidation of secondary alcohols to ketones are classified into two categories: alcohol dehydrogenase and alcohol oxidase [13].

Alcohol dehydrogenases (ADHs) are most commonly used for enantioselective alcohol oxidation and ketone reduction. These enzymes are NAD⁺-dependent or NADP⁺-dependent and can catalyze the oxidation of secondary alcohols to ketones, and primary alcohols to aldehydes [14,15]. ADHs are enzymes present in all living organisms. Microbial cells contain multiple dehydrogenases

that are able to accept non-natural substrates, and also contain an appropriate cofactor for the oxidoreduction reaction [16]. Therefore, the use of an external system for cofactor regeneration may be omitted because it is automatically performed by cell. In addition, enzymes and cofactors are well protected inside cell [17].

This work aims at the use of *Arthrobacter atrocyaneus* (R1AF57) in oxidative kinetic resolution (OKR) of racemic secondary alcohols to achieve optically pure compounds. This bacterium was isolated by enrichment technique using soil collected from the environmental conservation area (Amazon forest, Brazil).

2. Experimental

2.1. General methods

Chemicals were purchased from Aldrich and used without further purification. Gas chromatography (GC) analyses were performed on a Shimadzu GC-17A instrument equipped with a flame ionization detector. High performance liquid chromatography (HPLC) analyses were performed on a Shimadzu, LC-10AD liquid chromatography equipped with a variable wavelength UV–VIS detector (SPD-10AV). HPLC grade solvents, i-PrOH and hexane (60% n-hexane), were purchased from J.T. Baker. Sterile materials were used to perform the experiments involving microorganisms. A laminar flow cabinet Fisher Hamilton (Class II Biological Safety Cabinet) was used to handle microorganisms.

* Corresponding author.
E-mail address: leandroh@iq.usp.br (L.H. Andrade).

2.2. Synthesis of the racemic alcohols 1–26 [18]

The preparation of alcohols 1–26 was according to the methodology previously established [19].

2.3. General procedure for prospection of oxidoreductases-producing microorganisms

Soil samples were collected from environmental preservation area in Monte Negro city (Amazon forest located in Rondônia State, Brazil). The samples were collected under clean, sterile conditions and kept frozen in polyethylene tubes at -20°C . Twenty bacterial strains were isolated after applying enrichment technique using a minimal salt medium and 1-(4-methyl-phenyl)ethanol as carbon source (0.5 mmol/L) according to the method described in the literature [20–26].

Enzyme activity for all these bacterial strains were evaluated according to methodology described by us [27]. The best performance for the oxidative kinetic resolution of secondary alcohols was observed by *A. atrocyaneus* (R1AF57).

2.4. Culture medium

The bacteria *A. atrocyaneus* (R1AF57) was grown in Erlenmeyer flasks containing culture medium (nutrient broth, NB medium = beef extract 5 g/L; peptone 3 g/L) supplemented with (RS)-1-(4-methyl-phenyl)-ethanol (0.5 mmol/L). The culture was incubated in an orbital shaker (160 rpm) at 30°C .

2.5. Growing cells assays

A. atrocyaneus was inoculated in 50 mL of appropriate culture medium in Erlenmeyer flasks (125 mL) and incubated in an orbital shaker for 2 days (160 rpm, 32°C). After that, each substrate (1–28, 20 mg diluted in 100 μL of dimethylformamide) was added under sterile conditions in the flasks and kept at 32°C in an orbital shaker (160 rpm) for different reaction time (Tables 2 and 5). The reaction content (10 mL) was treated with ethyl acetate (2 mL) followed by centrifugation (6000 rpm, 1 min). The organic phase was analyzed by GC or HPLC (see Section 2.7 or Section 2.8).

2.6. Resting cells assays

A. atrocyaneus was inoculated in 50 mL of appropriate culture medium in Erlenmeyer flasks (125 mL) and incubated in an orbital shaker for 2 days (160 rpm, 32°C). Bacterial cells were harvested by centrifugation at 4°C (5000 rpm) and resuspended in phosphate buffer solution (50 mL, pH 7.0, 100 mmol/L). After that, each substrate (1–28, 20 mg diluted in 100 μL of dimethylformamide) was added under sterile conditions in the flasks and kept at 32°C in an orbital shaker (160 rpm) for different reaction time (Tables 2 and 5). The reaction content (10 mL) was treated with ethyl acetate (2 mL) followed by centrifugation (6000 rpm, 1 min). The organic phase was analyzed by GC or HPLC (see Section 2.7 or Section 2.8).

2.7. GC analysis

The enantiomeric excesses (ee) of the chiral alcohols 1–28 were measured by chiral GC analysis [19,29–35]. The analysis was carried out on a column β -cyclodextrin (25 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25 μm , Varian CP-Chirasil-DEX CB).

GC conditions (carrier gas- H_2 , 100 kPa); injector 220°C ; detector 220°C .

Isotherm and retention time (t_R) of the enantiomers:

(RS)-1-phenyl-ethanol (1): 107°C , t_R = 6.22 min for (R) and 6.87 min for (S);
 (RS)-1-(4-methyl-phenyl)-ethanol (2): 113°C , t_R = 6.79 min for (R) and 7.71 min for (S);
 (RS)-1-(4-methoxy-phenyl)-ethanol (3): 119°C , t_R = 6.22 min for (R) and 6.87 min for (S);
 (RS)-1-(4-chloro-phenyl)-ethanol (4): 130°C , t_R = 7.73 min for (R) and 8.19 min for (S);
 (RS)-1-(4-bromo-phenyl)-ethanol (5): 135°C , t_R = 9.54 min for (R) and 10.52 min for (S);
 (RS)-1-(4-nitro-phenyl)-ethanol (6): 150°C , t_R = 19.92 min for (R) and 20.3 min for (S);
 (RS)-1-(2-methyl-phenyl)-ethanol (7): 123°C , t_R = 8.00 min for (R) and 10.0 min for (S);
 (RS)-1-(3-methyl-phenyl)-ethanol (8): 113°C , t_R = 10.73 min for (R) and 11.77 min for (S);
 (RS)-1-(2-methoxy-phenyl)-ethanol (9): 129°C , t_R = 8.85 min for (R) and 9.72 min for (S);
 (RS)-1-(3-methoxy-phenyl)-ethanol (10): 119°C , t_R = 17.93 min for (R) and 20.0 min for (S);

Oven temperature: 100 – 140°C , $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$:

(RS)-1-(2-fluor-phenyl)-ethanol (11): t_R = 6.39 min for (R) and 6.84 min for (S);
 (RS)-1-(3-fluor-phenyl)-ethanol (12): t_R = 5.83 min for (R) and 6.84 min for (S);
 (RS)-1-(4-fluor-phenyl)-ethanol (13): t_R = 5.67 min for (R) and 6.13 min for (S);
 (RS)-1-(2-chloro-phenyl)-ethanol (14): 130°C , t_R = 7.09 min for (R) and 8.92 min for (S);
 (RS)-1-(3-chloro-phenyl)-ethanol (15): 130°C , t_R = 7.76 min for (R) and 8.34 min for (S);
 (RS)-1-(2-bromo-phenyl)-ethanol (16): 145°C , t_R = 7.09 min for (R) and 9.12 min for (S);
 (RS)-1-(3-bromo-phenyl)-ethanol (17): 135°C , t_R = 11.9 min for (R) and 13.08 min for (S);
 (RS)-1-(2-nitro-phenyl)-ethanol (18): 150°C , t_R = 9.61 min for (R) and 11.43 min for (S);
 (RS)-1-(3-nitro-phenyl)-ethanol (19): 140°C , t_R = 25.28 min for (R) and 27.25 min for (S);
 (RS)-1-phenylpropan-1-ol (26): 117°C , t_R = 5.2 min for (R) and 5.73 min for (S);
 (RS)-1-phenylpropan-2-ol (27): 97°C , t_R = 17.34 min for (R) and 18.5 min for (S);

Oven temperature: 60 – 85°C , $1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, hold 3 min;

(RS)-octan-2-ol (28): retention time of enantiomers (acetylated) = 13.20 min and 16.94 min.

The enantiomeric excess was defined as the ratio of $([R] - [S])/([R] + [S]) \times 100\%$, where [R] and [S] are the concentrations of (R) and (S) enantiomers, respectively.

2.8. HPLC analysis

The enantiomeric excesses of the chiral alcohols 20–25 were measured by chiral HPLC analysis [36,37]. The analysis was carried out on a column Chiralcel® OJ-H (0.46 cm ϕ $\times$ 25 cm) or Chiralcel® OD (0.46 cm ϕ $\times$ 25 cm, Daicel Chemical).

Chiralcel® OD column, *n*-hexane/*i*-PrOH (95:5), $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 254 nm UV detector; t_R (min): retention time of chiral compounds;

(*RS*)-1-([1,1'-biphenyl]-3-yl)ethanol (**20**): t_R = 30.95 min for (*R*) and 14.68 min for (*S*);

(*RS*)-1-([1,1'-biphenyl]-4-yl)ethanol (**21**): t_R = 13.95 min for (*R*) and 12.52 min for (*S*);

(*RS*)-(4-tolyl)phenylmethanol (**22**): t_R = 12.03 min for (*R*) and 13.5 min for (*S*);

(*RS*)-(4-isopropylphenyl)(phenyl)methanol (**23**): t_R = 10.12 min and 11.14 min;

(*RS*)-(4-bromophenyl)(phenyl)methanol (**24**): t_R = 12.9 min for (*R*) and 14.53 min for (*S*);

(*RS*)-biphenyl-4-yl(phenyl)methanol (**25**): t_R = 19.36 min for (*R*) and 20.8 min for (*S*).

2.9. Bacteria identification

The bacteria with the best performance in enzyme assays were identified using 16S rDNA sequencing analysis and comparison with GenBank top hits after a BLAST search [28].

3. Results and discussion

3.1. Isolation of oxidoreductase-producing microorganisms

Twenty microorganisms from soil samples were isolated using the enrichment technique. This technique consisted of using (*RS*)-1-(4-methylphenyl)ethanol (0.5 mM) as a carbon source in the culture medium [26,27]. The employment of this chiral alcohol can result in the isolation of microorganisms containing new oxidoreductases. The enzymatic system is able to perform the alcohol oxidation, which can consist of a dehydrogenase or an oxidase. However, after the enzyme purification, we will be able to elucidate the enzyme responsible for the alcohol oxidation reaction.

3.2. Evaluation of the enzyme activity of microorganisms

Enantioselective oxidations of *para*-substituted (*RS*)-1-phenylethanol (**1–6**) were used to evaluate the enzyme activity (oxidoreductase, OXRED) of the 20 microorganisms [27].

We obtained an excellent enzyme activity when we employed R1AF57 (*A. atrocyaneus*) in the oxidative kinetic resolution process. The oxidation reaction with this bacterium yielded (*S*)-alcohols in up to 50% (maximum value for a kinetic resolution process) and enantiomeric excess in up to >99%.

Based on these results we decided to evaluate the enantioselective oxidation mediated by *A. atrocyaneus* using different reaction conditions. Initially (*RS*)-1-phenylethanol was selected as a model substrate and the ratio of bacterial cells versus substrate concentration was evaluated (Table 1). This study was performed for achieving efficient process using a minimal amount of enzymes.

The bacterial growth was initially performed in an appropriate culture medium. Next, different volumes of medium containing the growing cells were used in the oxidation reaction of (*RS*)-1.

The results presented in Table 1 show that the appropriate ratio between culture broth and substrate is 20 mL/20 mg. In this case, *A. atrocyaneus* had the ideal performance for oxidative kinetic resolution, as the *R*-enantiomer was oxidized to the corresponding ketone leaving the *S*-enantiomer unreacted with enantiomeric

Table 1

Enantioselective oxidation of (*RS*)-1-(phenyl)ethanol (**1**) mediated by growing cells of *A. atrocyaneus* using different amount of culture broth.

Culture broth (mL) ^a	Alcohol (%) ^b	ee (%) ^b
10	56	97 (<i>S</i>)
20	56	>99 (<i>S</i>)
40	49	>99 (<i>S</i>)
60	48	>99 (<i>S</i>)
80	46	>99 (<i>S</i>)
100	45	>99 (<i>S</i>)

Reaction conditions: (*RS*)-alcohol **1** (20 mg/100 μ L DMF), 32 °C, 160 rpm, 72 h.

^a Culture broth containing growing cells of *A. atrocyaneus*.

^b Determined by GC analysis.

Table 2

Enantioselective oxidation of (*RS*)-1-(phenyl)ethanol **1** mediated by growing cells of *A. atrocyaneus* at different reaction time.

Entry	Time (h)	Alcohol (%) ^a	ee (%) ^a
1	1	84	24 (<i>S</i>)
2	6	58	67 (<i>S</i>)
3	12	59	67 (<i>S</i>)
4	24	54	88 (<i>S</i>)
5	48	47	>99 (<i>S</i>)
6	72	49	>99 (<i>S</i>)

Reaction conditions: (*RS*)-alcohol **1** (20 mg/100 μ L DMF), growing cells of *A. atrocyaneus* (20 mL), 32 °C, 160 rpm, 1–72 h.

^a Determined by GC analysis.

excess >99%. Another set of reaction was performed in order to have the appropriate time for the kinetic resolution of (*RS*)-1-phenylethanol **1** (Table 2).

According to the results in Table 2, after 48 h the (*R*)-alcohol **1** was transformed to the corresponding ketone and leaving the (*S*)-alcohol **1** unreacted with enantiomeric excess >99% (entry 5). From these results we can assume that the (*R*)-enantiomer reacts faster with an appropriate oxidoreductase from *A. atrocyaneus* than the (*S*)-enantiomer.

3.3. Application of the *A. atrocyaneus* in the oxidative kinetic resolution of secondary alcohols (**1–28**)

Enantioselective oxidations of *rac*-**1–6** and additional *ortho*-, *meta*- and *para*-substituted (*RS*)-1-(phenyl)ethanols (**7–21**, Scheme 1 and Fig. 1) were used to evaluate the broad spectrum of oxidoreductase activity from *A. atrocyaneus*. For this study, we employed growing cells (Table 3) and resting cells (Table 4).

In general, the growth of *A. atrocyaneus* cells promoted the oxidation of (*R*)-1-phenylethanol and its derivatives to their corresponding ketones in high conversion leaving the (*S*)-enantiomer intact and more efficient than reactions with resting cells. As presented in Table 3 *meta*- and *para*-substituted alcohols (**1–6**, **8**, **10**, **12**, **13**, **15**, **17** and **19–21**, entries 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 18 and 19) were transformed to corresponding ketones with 50%

Scheme 1. Enantioselective oxidation of secondary alcohols (*RS*)-**1–28**.

Fig. 1. Secondary alcohols 1–28 selected as substrates for oxidative kinetic resolution mediated by *A. oryzae*.

conversion and >99% *ee* for the (*S*)-enantiomer, except for compound 20 that showed low conversion and *ee* (Table 3, entry 20).

The oxidation reactions of fluorine-, chlorine- and bromine-substituted-1-(phenyl)ethanols mediated by resting cells exhibited low ketone concentrations (up to 40%) and alcohol *ee* (up to 93%, Table 4, entries 8–16). The additional time, 72 and 96 h, did not improve the conversions or alcohol *ee* (data not demonstrated). On the other hand, the reactions with growing cells gave better results (up to 50% ketone yield and in up to >99% *ee* for the (*S*)-alcohol, Table 3, entries 8–10, 12, 13 and 15), which indicated a good oxidative kinetic resolution process. Reactions of *meta*- and *para*-substituted compounds, such as methyl, methoxy, nitro and phenyl, by resting cells afforded the corresponding ketones

with high concentration, which is similar to those obtained from growing cells (Tables 3 and 4, entries 3–4, 6–7, 18–19 and 20–21).

The oxidation of alcohol (*R*)-1, which has no substituent at the aromatic ring, by growing cells showed high conversion to ketone (51%) and excellent enantiomeric excess (>99%) for the remaining alcohol enantiomer-(*S*), while resting cells gave moderate ketone concentration (39%) and good enantiomeric excess (85%). Both methodologies showed low product concentration (ketone) for the *ortho*-substituted compounds (Tables 3 and 4, entries 2, 5, 8, 11, 14 and 17). A possible steric hindrance caused by these groups to the hydroxyl moiety can be the reason for low or none alcohol oxidation.

We also employed alcohols with two aromatic rings on carbon that has the hydroxyl group (compounds 22–25). However,

Table 3

OKR of substituted (RS)-1-(phenyl)ethanols (1–21) mediated by growing cells of *A. atrocyaneus*.

Entry	R	Alcohol (%) ^a	ee (%) ^a
1	H (1)	49	>99 (S)
2	2-Me (7)	99	<1
3	3-Me (8)	56	>99 (S)
4	4-Me (2)	50	>99 (S)
5	2-OMe (9)	94	8
6	3-OMe (10)	49	>99 (S)
7	4-OMe (3)	50	>99 (S)
8	2-F (11)	97	4
9	3-F (12)	52	>99 (S)
10	4-F (13)	47	>99 (S)
11	2-Cl (14)	99	<1
12	3-Cl (15)	51	>99 (S)
13	4-Cl (4)	51	>99 (S)
14	2-Br (16)	99	<1
15	3-Br (17)	55	>99 (S)
16	4-Br (5)	49	>99 (S)
17	2-NO ₂ (18)	99	<1
18	3-NO ₂ (19)	46	>99 (S)
19	4-NO ₂ (6)	50	>99 (S)
20	3-Ph (20)	69	13 (S)
21	4-Ph (21)	46	>99 (S)

Reaction conditions: (RS)-alcohol 1–21 (20 mg/100 µL DMF), growing cells of *A. atrocyaneus* (20 mL), 32 °C, 160 rpm, 48 h.^a Determined by GC analysis.

Table 4

OKR of substituted (RS)-1-(phenyl)ethanols (1–21) mediated by resting cells of *A. atrocyaneus* in phosphate buffer.

Entry	R	Alcohol (%) ^a	ee (%) ^a
1	H (1)	61	85 (S)
2	2-Me (7)	99	<1
3	3-Me (8)	53	>99 (S)
4	4-Me (2)	51	>99 (S)
5	2-OMe (9)	97	4
6	3-OMe (10)	53	>99 (S)
7	4-OMe (3)	56	>99 (S)
8	2-F (11)	99	<1
9	3-F (12)	60	88 (S)
10	4-F (13)	63	93 (S)
11	2-Cl (14)	99	<1
12	3-Cl (15)	82	22 (S)
13	4-Cl (4)	87	24 (S)
14	2-Br (16)	99	<1
15	3-Br (17)	86	23 (S)
16	4-Br (5)	86	23 (S)
17	2-NO ₂ (18)	99	<1
18	3-NO ₂ (19)	48	>99 (S)
19	4-NO ₂ (6)	48	>99 (S)
20	3-Ph (20)	63	21 (S)
21	4-Ph (21)	47	>99 (S)

Reaction conditions: (RS)-alcohol 1–21 (20 mg/100 µL DMF), cells were harvested from culture broth (20 mL) and resuspended in phosphate buffer solution (100 mmol/L, pH 7.0, 20 mL), 32 °C, 160 rpm, 72 h.

^a Determined by GC analysis.

we did not observe any oxidation product (Table 5). This difficulty has already been described in the literature [38]. Unfortunately, we have not overcome.

Then, we decided to study the influence of the hydroxyl group position at the phenyl-propanol. The compound 26

Table 5

OKR of secondary alcohols (RS)-22–28 mediated by *A. atrocyaneus*.

Entry	Substrate	Time (h)	Alcohol (%) ^a	ee (%) ^a	Enzyme source
1	22	48	>99	0	Growing cells ^b
		72	>99	0	
2	23	48	>99	0	
		72	>99	0	
3	24	48	>99	0	
		72	>99	0	Growing cells ^b
4	25	48	>99	0	
		72	>99	0	
5	26	48	59	82 (S)	
		72	53	95 (S)	
6	27	48	45	>99 (S)	Resting cells ^c
		72	50	>99 (S)	
7	28	48	>99	20 (S)	
		72	>99	20 (S)	
8	22	48	>99	0	
		72	>99	0	Resting cells ^c
9	23	48	>99	0	
		72	>99	0	
10	24	48	>99	0	
		72	>99	0	Resting cells ^c
11	25	48	>99	0	
		72	>99	0	
12	26	48	54	81 (S)	
		72	55	93 (S)	
13	27	48	52	92 (S)	Resting cells ^c
		72	52	>99 (S)	
14	28	48	94	46 (S)	Resting cells ^c

Reaction conditions: (RS)-alcohol 22–28 (20 mg/100 µL DMF), 32 °C, 160 rpm.

^a Determined by GC analysis.^b Culture broth (20 mL).^c Cells were harvested from culture broth (20 mL) and resuspended in phosphate buffer solution (100 mmol/L, pH 7.0, 20 mL).

(1-phenyl-1-propanol) has hydroxyl and ethyl groups attached to the benzylic carbon while the alcohol 27 (1-phenyl-2-propanol) has one more carbon between the functional group alcohol and the aromatic ring. These compounds enabled to evaluate the need for the presence of the aromatic ring attached to the carbon that has the hydroxyl group.

The oxidation reaction of the compounds 26 and 27 mediated by resting cells and growing cells afforded their corresponding ketones, all in high conversion (~47–50%) and high enantiomeric excess (~95–99%) after 72 h (Table 5). In spite of the different position of the hydroxyl group, the conversion values and enantiomeric excess were closer to the ideal conditions for kinetic resolution of alcohols.

Finally, we have decided to study the oxidation reaction of an aliphatic compound 28. In this case, the enantioselective oxidation reactions mediated by resting cells were more efficient than growing cells (Table 5, entries 8–14). It is noteworthy that in the reaction with growing cells the 2-octanone was not detected, even though the remaining alcohol presented 20% enantiomeric excess. Based on this result we may have an alcohol oxidation followed by ketone oxidation (Baeyer–Villiger reaction) or an alcohol oxidation followed by ketone reduction, resulting in a deracemization process.

4. Conclusion

We have isolated the *A. atrocyaneus* from medium enriched with (RS)-1-(4-methylphenyl)ethanol as a carbon source. The oxidative kinetic resolution of several secondary alcohols through enantioselective oxidation mediated by resting cells and growing cells of *A. atrocyaneus* was efficiently achieved for most of the alcohols. In general, we were able to obtain only the (S)-enantiomer from (RS)-1-phenylethanols and its derivatives with high conversion values to corresponding ketones (~50%). We are currently studying the