

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Biorredução de compostos carbonílicos α,β -insaturados visando à
síntese de substâncias opticamente ativas

Rafaela Marcucci Silva

Ribeirão Preto

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Biorredução de compostos carbonílicos α,β -insaturados visando à síntese de substâncias opticamente ativas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientada: Rafaela Marcucci Silva

Orientador: Prof. Dr. Giuliano Cesar Clososki

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 27/04/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2015

RESUMO

SILVA, R. M. **Biorredução de compostos carbonílicos α,β -insaturados visando à síntese de substâncias opticamente ativas.** 2015. 162f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Nos últimos anos, a preparação de substâncias enantiomericamente puras tornou-se uma preocupação constante e um desafio para a indústria. Tal fato é consequência da relação tênue entre a estrutura espacial das substâncias e os diferentes sabores, odores, processos farmacocinéticos e farmacodinâmicos e toxicidade que elas desempenham no organismo. Nesse contexto, a síntese assimétrica de compostos carbonílicos α -alquil substituídos opticamente ativos tem recebido grande atenção já que estes são importantes blocos de construção na síntese de fármacos quirais e produtos naturais. Assim, o presente trabalho buscou o desenvolvimento de metodologias que permitissem a preparação desses compostos enantiomericamente puros através do controle na formação de centros estereogênicos usando a biocatálise. Para isso, foram preparadas diversas olefinas ativadas por grupos retiradores de elétrons (carbonila) utilizando dois procedimentos, a saber, reações de condensação aldólica e esterificação. Esses compostos carbonílicos α,β -insaturados foram obtidos com bons rendimentos (48-94%) e foram submetidos à reduções biocatalíticas mediadas por células íntegras de micro-organismos. Inicialmente, utilizou-se a olefina (*E*)-4-fenil-3-metil-3-buten-2-ona (**51a**) como substrato modelo para a otimização das condições experimentais e determinação daquela que fornecesse o produto biorreduzido com a melhor conversão e pureza enantiomérica. Nesses testes, avaliaram-se diversos parâmetros reacionais, tais como, composição do meio reacional (aquoso, bifásico e tamponante), presença de aditivos (glicose e catalisador de transferência de fase), diferentes micro-organismos e efeito do uso de resina adsorvente Amberlite XAD-7. Dessa forma, a biorredução em meio aquoso, sem aditivos, mediada pela levedura LSC-II e com a utilização da resina Amberlite XAD-7 foi a condição reacional que apresentou o melhor excesso enantiomérico (81%) e foi a selecionada para um estudo metodológico que avaliou os efeitos estérico e eletrônico dos substituintes. Observou-se que a posição do substituinte no β -aril, o alongamento do α -substituinte e a adição de um grupamento éster apresentaram um importante papel na estereosseletividade da reação. Por fim, avaliou-se a aplicação da metodologia na síntese enantiosseletiva da muguesia, uma fragrância floral. Os resultados obtidos revelaram o grande potencial da metodologia na biorredução quimiosseletiva de compostos carbonílicos α,β -insaturados e preparação de substâncias opticamente ativas.

Palavras-chave: Biorredução, compostos carbonílicos α,β -insaturados, micro-organismo, *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

SILVA, R. M. **Bioreduction of α,β -unsaturated carbonyl compounds toward the synthesis of optically active substances**. 2015. 162f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

In recent years, the preparation of enantiomerically pure compounds has become a concern and a challenge to the industry. This fact is a consequence of the tenuous relationship between the spatial structure of substances and the different flavors, odors, pharmacokinetic and pharmacodynamic processes and toxicity that they play in the body. In this context, the asymmetric synthesis of α -alkyl substituted optically active carbonyl compounds has received great attention because they are important building blocks in the synthesis of chiral drugs and natural products. Thus, this study aimed to develop methodologies that allow the preparation of this enantiomerically pure compounds by controlling the formation of stereogenic centers using biocatalysis. To this end, various activated olefins substituted with electron withdrawing groups (carbonyl) were synthesized using two procedures, aldol condensation and esterification reactions. These α,β -unsaturated carbonyl compounds were obtained in good yields (48-94%) and subjected to the biocatalytic reduction mediated by whole cells of microorganisms. Initially, we used the olefin (*E*)-3-methyl-4-phenyl-3-buten-2-one (**51a**) as a model substrate for the optimization of the experimental conditions and determine which one provide the product with better conversion and enantiomeric purity. In these tests, we evaluated various reaction parameters such as the composition of the reaction medium (aqueous, biphasic and buffer), the presence of additives (glucose and phase transfer catalyst), different microorganisms and adsorbing effect of using Amberlite XAD-7. Thus, the bioreduction in aqueous medium, without additives, mediated by LSC-II yeast and with the application of Amberlite XAD-7 was the reaction condition that presented the best enantiomeric excess (81%) and was selected for a methodological study that evaluated the steric and electronic effects of the substituents. It was observed that the substituent in the β -position of the aryl group, the size increase of the α -substituent and the presence of an ester group had an important role in the stereoselectivity of the reaction. Finally, application of the methodology on muguesia enantioselective synthesis, a floral fragrance, was evaluated. The results obtained showed the high potential of the methodology in chemoselective bioreduction of α,β -unsaturated carbonyl compounds and preparation of optically active substances.

Keywords: Bioreduction, α,β -unsaturated carbonyl compounds, micro-organism, *Saccharomyces cerevisiae*.

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. A quiralidade e sua importância

O desenvolvimento de técnicas de síntese assimétrica para a preparação de compostos enantiomericamente enriquecidos destaca-se como uma das vertentes da síntese orgânica que mais despertaram interesse nos últimos anos (BLASER; SPINDLER; STUDER, 2001; LOHRAY, 2001; NOYORI, 2003; PINHEIRO; FERREIRA, 1998). Sabendo da importância dos centros quirais na atividade biológica de muitas substâncias, as indústrias farmacêutica (BLASER; SPINDLER; STUDER, 2001; HAWKINS; WATSON, 2004; POLLARD, WOODLEY, 2007; SOLANO et al., 2012), agroquímica (LIU et al., 2005), alimentícia e de fragrância (SERRA; FUGANTI; BRENNAN, 2005) estão cada vez mais empenhadas no controle estereoquímico e na síntese de compostos opticamente puros (BARREIRO; FERREIRA; COSTA, 1997; CROSBY, 1991; MANNSCHRECK; KIESSWETTER, 2007; SMITH, 2009; ZHENG; XU, 2011).

O estudo da quiralidade e simetria é bastante amplo e envolve áreas de química, física e biologia. No início do século XIX, as primeiras contribuições sobre o assunto foram feitas por Arago e Biot quando demonstraram o efeito que pedaços de cristais exerciam frente ao plano de luz polarizada, ou seja, diferentes cristais desviavam a luz para a direita ou para a esquerda. Em 1848, Louis Pasteur, cientista francês, aprofundou os estudos sobre a quiralidade. A separação feita por ele de cristais do sal de tartarato de amônio e sódio e a observação do diferente efeito rotacional dos cristais, o levou a ser considerado o descobridor do fenômeno da quiralidade e o fundador da base para o desenvolvimento da estereoquímica (BLASER; SPINDLER; STUDER, 2001; COELHO, 2001; SMITH, 2009; SOLOMONS; FRYHLE, 2001).

Nos últimos anos, esta área tem se tornando cada vez mais atrativa e diversos avanços tecnológicos vêm possibilitando o seu desenvolvimento. Em 2001, os pesquisadores William S. Knowles e K. Barry Sharpless nos Estados Unidos e Ryoji Noyori no Japão foram homenageados com o prêmio Nobel de Química por suas importantes contribuições no aperfeiçoamento e ampliação de técnicas de síntese assimétrica usando catalisadores quirais na produção de fármacos ou produtos químicos de maneira enantiosseletiva (LOHRAY, 2001; NOYORI, 2003; NGUYEN; HE; PHAM-HUY, 2006).

Dados referentes aos fármacos aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) de 1992 a 2008 (Figura 1) refletem o aumento de interesse na produção de substâncias

enantiopuras tanto pela comunidade científica quanto pela indústria farmacêutica. Enquanto em 1992 cerca de 21% dos fármacos eram aprovados em sua forma racêmica, em 2008 esse número reduziu-se para 5%. Por outro lado, no mesmo período, a aprovação de fármacos quirais opticamente puros aumentou de 44% em 1992 para 63% em 2008 (LIN; YOU; CHENG, 2011; MURAKAMI, 2007).

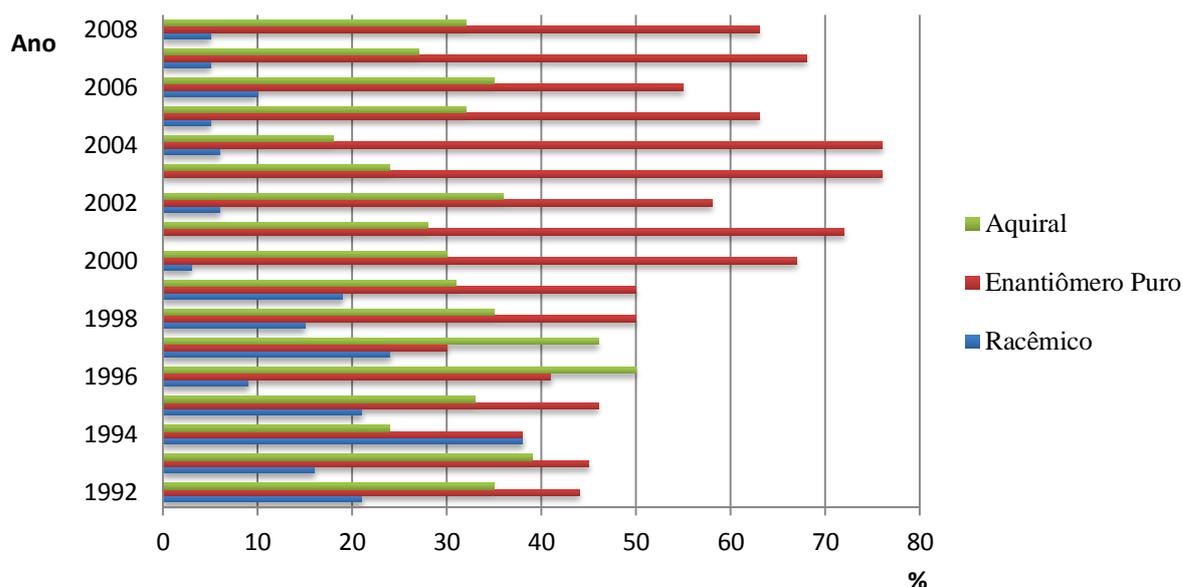


Figura 1. Distribuição anual de fármacos aprovados pelo FDA de 1992 a 2008. Fonte: LIN; YOU; CHENG, 2011.

Nesse sentido, informações publicadas recentemente por Bronson et al. (2013) confirmam o empenho na produção de compostos opticamente ativos. Pode-se observar que cerca de 57% dos fármacos aprovados pelo FDA em 2012 foram enantiômeros puros e apenas 3% na forma de racemato (Figura 2).

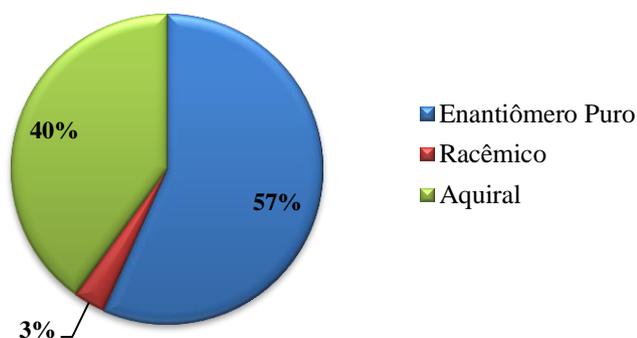


Figura 2. Fármacos aprovados pelo FDA em 2012. Fonte: BRONSON et al., 2013.

A Figura 3 abaixo ilustra uma comparação entre a atividade biológica e a configuração absoluta de três compostos quirais. O enantiômero *S*-(-) do β -bloqueador propranolol, utilizado, principalmente, como anti-hipertensivo, se liga mais efetivamente aos receptores β -adrenérgicos do que a sua forma *R*-(+), sendo assim, é o enantiômero terapeuticamente útil (CROSBY, 1991; TRIGGLE, 1997). De modo semelhante, o enantiômero *R,R*-(-) do cloranfenicol é indicado para o tratamento antibacteriano, em contrapartida, o enantiômero *S,S*-(+) é inativo (CROSBY, 1991). Outro exemplo é o fármaco quiral etambutol, sua forma *S,S*-(+) é a responsável pela atividade tuberculástica e o enantiômero *R,R*-(-) causa cegueira (CROSBY, 1991, MANNSCHRECK; KIESSWETTER, 2007). Dessa forma, pares enantioméricos podem interagir de uma maneira diferenciada no organismo, ou seja, enquanto um enantiômero pode apresentar ação benéfica, o outro pode ser inócuo ou prejudicial e causar efeitos teratogênicos ou toxicidade.

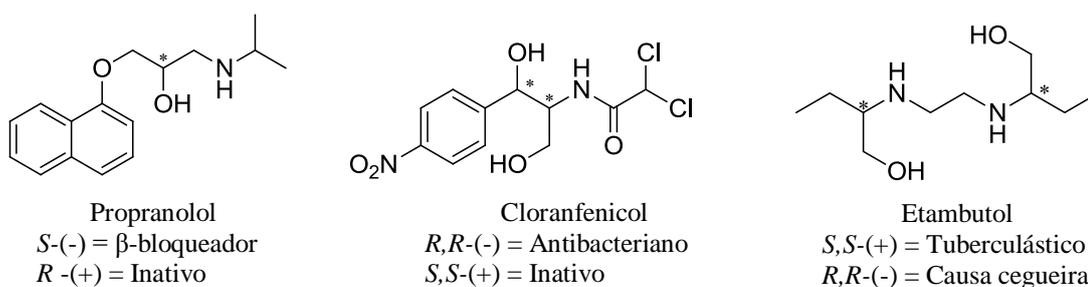


Figura 3. Exemplos do efeito da quiralidade na atividade biológica de fármacos.

É relevante citar que as propriedades organolépticas das substâncias também são influenciadas pela sua orientação espacial. A Figura 4 ilustra alguns exemplos de compostos que apresentam diferentes sabores e odores em função da sua configuração absoluta. Dessa forma, a produção de moléculas enantiomericamente puras não é só uma preocupação da indústria farmacêutica, ela também se estende aos demais campos industriais (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012; CROSBY, 1991).

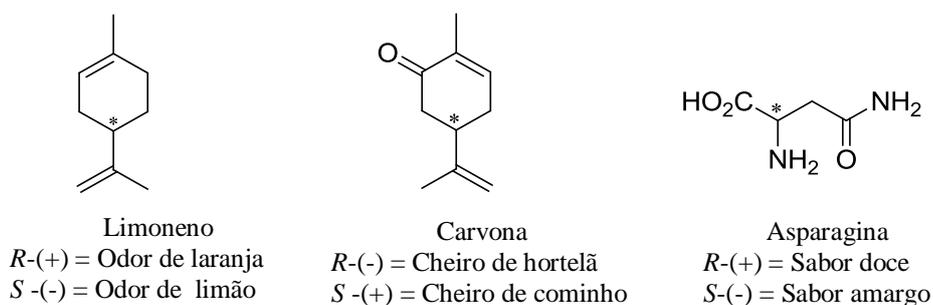


Figura 4. Exemplos do efeito da quiralidade nas propriedades organolépticas de alguns compostos.

As divergências comportamentais dos enantiômeros de uma mistura racêmica no organismo são consequência do reconhecimento enantioespecífico dos pares enantioméricos pelas enzimas e receptores, os quais possuem afinidades heterogêneas por cada um dos enantiômeros. Sendo assim, são capazes de discriminá-los e por meio de interações estereosseletivas produzirem respostas biológicas distintas. Dessa forma, o enantiômero bioativo mais potente é denominado eutômero e aquele que possui menor atividade ou é inativo ou até tóxico é conhecido por distômero (CALDWELL, 1995; EICHELBAUM; GROSS, 1996; FABER, 2011; LIMA, 1997; NGUYEN; HE; PHAM-HUY, 2006; SMITH, 2009).

1.2. Procedimentos para obtenção de moléculas enantiomericamente enriquecidas

Nos últimos anos, buscando a síntese de fármacos e produtos naturais quirais, houve um acentuado desenvolvimento e avanço das técnicas de síntese enantiosseletiva. Os principais métodos para a obtenção de compostos opticamente ativos são (BARREIRO; FERREIRA; COSTA, 1997; BLASER; PUGIN; SPINDLER, 2005; BLASER, SPINDLER; STUDER, 2001; CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012; CONSTANTINO, 2012; CROSBY, 1991; NGUYEN; HE; PHAM-HUY, 2006; PINHEIRO; FERREIRA, 1998; STRAATHOF; PANKE; SCHMID, 2002):

- *Chiral pool*- É uma técnica relativamente econômica, pois utiliza blocos de construção quirais provenientes de produtos naturais, tais como aminoácidos, carboidratos, terpenos e alcalóides, para a construção do produto final. Esses são incorporados na estrutura da moléculas alvo e são realizadas as modificações necessárias para alcançar as características quirais desejadas. Muitas vezes esse método é selecionado para as fases iniciais de desenvolvimento de fármacos. Dependendo da disponibilidade comercial do substrato, pode também ser utilizado em larga escala. Através de reações químicas, pode ocorrer a formação de novos centros quirais ou apenas a manutenção da estereoquímica daqueles existentes bem como a inversão das suas configurações absolutas. Frequentemente, esses materiais de partida já apresentam naturalmente alta pureza enantiomérica, dessa forma, não é necessário etapas adicionais para o enriquecimento enantiomérico.
- Separação de enantiômeros- Esse processo pode ser feito por meio da interação de um racemato com um composto com configuração absoluta definida, também conhecido por agente de resolução, que não é consumido na reação. Ocorre a formação de pares

diastereoisoméricos, os quais possuem propriedades químicas e físicas diferentes. Sendo assim, torna-se possível sua separação, a qual pode ser feita por meio de cristalização, filtração, cromatografia e destilação. A resolução cinética (química ou enzimática), que está relacionada com as diferentes velocidades de reação dos enantiômeros, também é utilizada para separação de misturas racêmicas. Nessas técnicas, geralmente, o enantiômero almejado é isolado com alta pureza enantiomérica. Todavia, ao longo desses processos, pelo menos 50% do material com a configuração absoluta não desejada são reciclados por meio de racemização ou descartados.

- Síntese assimétrica- Nesse caso, a aquisição dos compostos enantiomericamente puros ocorre por meio de transformações no substrato pró-quiral auxiliado por métodos sintéticos, tal como, substratos quirais, auxiliares quirais, reagentes quirais e metais e ligantes quirais (catalisadores químicos convencionais) ou de origem natural (biocatalisadores), por exemplo, enzimas isoladas ou contidas em micro-organismos. Pode ser chamada também de síntese enantiosseletiva, pois os enantiômeros dos produtos são obtidos desproporcionalmente no final, ou seja, a produção de um dos enantiômeros é superior ao outro.

Entre esses métodos a utilização de enzimas isoladas ou contidas em micro-organismos para a produção de substâncias opticamente puras vem se destacando e tornando-se uma eficiente ferramenta para as indústrias (SOLANO et al., 2012; STRAATHOF; PANKE; SCHMID, 2002).

1.3. Enzimas

Quase todas as enzimas são proteínas e capazes de catalisar reações químicas com alta especificidade. Elas são formadas por resíduos de aminoácidos que se unem por ligações peptídicas e, algumas vezes, ligações dissulfeto, formando uma cadeia polipeptídica (CAMPBELL, 2000; NELSON; COX, 2011). Apresentam grupos hidrofílicos polares, tais como, $-\text{COO}^-$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_3^+$, $-\text{SH}$ e $-\text{CONH}_2$, que devido ao ambiente natural aquoso, são localizados, principalmente, na sua superfície externa para mantê-las hidratadas. Já os resíduos hidrofóbicos, como cadeias alquílicas e arilas, permanecem no interior da proteína. Dessa forma, a superfície de uma enzima é recoberta fortemente por uma camada de água e um arranjo de ligação de hidrogênio, altamente estruturados, formando a camada de solvatação. Estas ligações de hidrogênio na superfície da enzima são fundamentais para a

manutenção do seu arranjo tridimensional e da sua atividade catalítica (FABER, 2011; NELSON; COX, 2011).

Em torno de 3700 enzimas já são reconhecidas e catalogadas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) (FABER, 2011). Elas são classificadas em seis classes (Tabela 1), de acordo com o tipo de transformação que catalisam (FABER, 2011; NELSON; COX, 2011; SANTANIELLO et al., 1992):

Tabela 1. Classificação das enzimas. Fonte: Adaptada de FABER, 2011; NELSON; COX, 2011 e SANTANIELLO et al., 1992

Nº da classe e nome das enzimas	Tipo de reação catalisada
1. Oxidorredutases	Reações de oxidação-redução, ou seja, oxidação de C-H, C-C, C=C, ou remoção ou adição de hidrogênios.
2. Transferases	Reações de transferência de grupos, como aldeído, cetona, acila, açúcar, fosforil, metil e NH ₃ . A-(B) + C = A-C + (B)
3. Hidrolases	Hidratação, condensação, formação e hidrólise de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilas, anidridos, glicosídeos.
4. Liases	Adição de grupos a ligações duplas, ou formação de ligações duplas por remoção de grupos como C=C, C=N e C=O.
5. Isomerases	Transferência de grupo dentro de uma mesma molécula através de racemização, epimerização e rearranjo, produzindo formas isoméricas.
6. Ligases	Formação por condensação e clivagem de ligações C-O, C-S, C-N e C-C acopladas à hidrólise de trifosfato (ATP).

Algumas classes de enzimas não são dependentes de outros componentes, apenas os aminoácidos, já presentes em sua estrutura, são suficientes para sua ação catalítica. Em contrapartida, outras, como as oxidorredutases, requerem a presença de um grupo químico adicional, o qual é conhecido como cofator. Os cofatores são substâncias não protéicas e são divididos em duas classes: íons metálicos como Fe²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Ca²⁺, K⁺ ou uma molécula orgânica, denominada de coenzima. A maioria das coenzimas são vitaminas ou produtos derivados do seu metabolismo, tais como, NADH, NADPH, coenzima A, biotina, ATP e FMN (CAMPBELL, 2000; FABER, 2011; NELSON; COX, 2011; SILVERMAN, 1992). A enzima e o cofator se unem para realizarem suas funções. Em uma reação de redução, por exemplo, primeiramente, o substrato e o cofator ligam-se à enzima, ocorre uma redução do substrato e uma oxidação do cofator e por fim, o cofator e o produto se dissociam da enzima (MATSUDA; YAMANAKA; NAKAMURA, 2009).

Existem ainda coenzimas que se ligam fortemente a uma enzima, muitas vezes por ligações covalentes, e não se dissociam após a reação. Essas são chamadas de grupos prostéticos e podem ser flavinas ou íons metálicos, por exemplo (MATSUDA; YAMANAKA; NAKAMURA, 2009; NELSON; COX, 2011). Alguns cofatores são muito sensíveis e são destruídos ao longo da reação devido às reações secundárias. No entanto, seu alto custo impossibilita seu uso em quantidades estequiométricas (FABER, 2011; MATSUDA; YAMANAKA; NAKAMURA, 2009; UPPADA; BHADURI; NORONHA, 2014). Dessa forma, métodos para reciclagem do cofator são essenciais para que o processo seja econômico e industrialmente viável. Além disso, a ausência de um sistema que traga o cofator pra seu estado original acarreta a perda da eficiência catalítica da enzima e a reação pode não alcançar seu máximo rendimento (UPPADA; BHADURI; NORONHA, 2014).

Em comparação com as reações não catalisadas, as enzimas apresentam um alto potencial catalítico e são capazes de aumentar a velocidade da reação por um fator da ordem de $10^8 - 10^{14}$. Em algumas condições, pode exceder o fator de 10^{17} . Já os catalisadores sintéticos aceleram a reação por um fator de $10^2 - 10^4$. Além disso, a quantidade requerida destes catalisadores é maior, geralmente, são empregados em concentrações de 0,1 a 1 mol%, enquanto que a maioria das reações enzimáticas são eficientes com uma quantidade de 10^{-3} a 10^{-4} mol% do biocatalisador (CAMPBELL, 2000; FABER, 2011; SILVERMAN, 2002).

Pode-se dizer também que as reações enzimáticas são menos agressivas ao meio ambiente, pois, por exemplo, há uma substituição dos reagentes de hidreto e metais pesados potencialmente perigosos utilizados em sínteses assimétricas clássicas. Além disso, frequentemente, as reações são realizadas em água e, nesses casos, tanto as enzimas como os resíduos são degradados pelo meio ambiente e não apresentam alta toxicidade como aqueles produzidos em reações utilizando catalisadores sintéticos. Assim, os procedimentos mediados por enzimas são adequados e muito atrativos para os processos industriais, pois provocam menores prejuízos ambientais, sendo uma das ações mais importantes para o desenvolvimento e expansão de uma metodologia química sustentável e mais verde (DUNN, 2012; FABER, 2011; ROZZELL, 1999; UPPADA; BHADURI; NORONHA, 2014; WOODLEY, 2008).

Além disso, as condições reacionais empregadas em reações enzimáticas são suaves: as enzimas efetuam catálise na faixa de pH 5 - 8, em temperaturas no intervalo de 20 °C a 40 °C e sob pressão atmosférica. Assim, há uma redução considerável da formação de subprodutos resultantes de reações laterais indesejáveis, como, isomerização, racemização, decomposição e rearranjos (FABER, 2011; YAMADA; SHIMIZU, 1988).

Outra qualidade das enzimas é a sua versatilidade, ou seja, elas não se restringem apenas aos seus substratos naturais, são altamente tolerantes, capazes de aceitar uma grande diversidade de substratos que não são naturais e exibirem especificidades tão elevada para estes quanto para os seus equivalentes naturais (FABER, 2011; YAMADA; SHIMIZU, 1988). Além disso, caso seja benéfico para o procedimento, o meio aquoso pode ser substituído, por exemplo, por um solvente orgânico, líquido iônico ou fluído supercrítico (FABER, 2011).

Todas essas propriedades apresentadas já fazem das enzimas catalisadores peculiares, entretanto, a precisão química apresentada por elas, provavelmente, é a vantagem mais importante. Nesse sentido, produtos secundários e múltiplos isômeros, que, são comuns em reações com catalisadores químicos, são minimizados nas transformações com catalisadores biológicos, facilitando o procedimento de purificação. Geralmente, não são necessárias etapas de proteção e desproteção que muitas vezes são exigidas na catálise clássica. Portanto, é possível a obtenção do produto desejado com alta seletividade e economia significativa nos custos energéticos (ROZZELL, 1999; UPPADA; BHADURI; NORONHA, 2014; WOODLEY, 2008).

As enzimas apresentam quimiosseletividade, isto é, atuam seletivamente em um único grupamento funcional, preservando outros grupos funcionais quimicamente sensíveis e até mesmo mais reativos, que certamente reagiriam sob a catálise tradicional (FABER, 2011; ROZZELL, 1999; UPPADA; BHADURI; NORONHA, 2014). Além disso, as enzimas são altamente regioseletivas, visto que são formadas por uma complexa estrutura tridimensional, elas são capazes de reconhecer e discriminar grupamentos com as mesmas funcionalizações químicas e reatividade similares que estão localizados em regiões diferentes no mesmo compostos (FABER, 2011; ROZZELL, 1999).

A estereosseletividade é outra característica fundamental das enzimas, assim, possuem uma capacidade intrínseca de agir com alta seletividade em um único enantiômero ou diastereoisômero. Em outras palavras, toda enzima é quiral e qualquer elemento de assimetria encontrado no substrato influencia na formação do complexo enzima-substrato [ES]. Dessa maneira, um material de partida pró-quiral pode ser transformado em um produto enantiomericamente enriquecido e um par enantiomérico de um racemato pode ser separado por meio de uma resolução cinética, na qual os enantiômeros reagem com velocidades diferentes (FABER, 2011; ROZZELL, 1999).

As seletividades, em conjunto, representam as características e capacidades mais importantes das enzimas para a exploração da síntese assimétrica e tornam-nas potentes catalisadores de compostos opticamente ativos, o que é de grande interesse das indústrias

tanto para a produção de intermediários quanto dos produtos finais (FABER, 2011; SOLANO et al., 2012; UPPADA; BHADURI; NORONHA, 2014).

No entanto, uma das desvantagens das enzimas é a não disponibilidade na natureza do seu par enantiomérico, ou seja, elas existem em apenas uma forma enantiomérica, assim, não é possível inverter a indução de um centro estereogênico em uma catálise enzimática apenas selecionando o enantiômero da enzima com a estereoquímica oposta. Para a obtenção do outro enantiômero do produto, deve-se buscar um catalisador biológico com a estereosseletividade contrária (FABER, 2011).

Muitas enzimas também estão sujeitas a fenômenos de inibição pelo substrato e pelo produto. A alta concentração de ambos é um fator que prejudica a eficiência do processo. Uma alternativa é controlar a concentração do substrato através da adição contínua e remover gradualmente o produto *in situ* (FABER, 2011).

Outro inconveniente em relação ao uso de enzimas é que, apesar delas serem bastante flexíveis e aceitarem uma diversidade de substratos não naturais, aquelas que necessitam de cofatores se ligam apenas aos seus cofatores naturais. Dessa forma, já que estes não podem ser substituídos por equivalentes sintéticos menos dispendiosos, em muitos casos, é necessário um eficiente sistema de regeneração (FABER, 2011).

A vantagem da utilização de condições suaves citada anteriormente, pode tornar-se um problema quando a velocidade da reação enzimática é baixa. Nesses casos, são necessários ajustes nos parâmetros operacionais de pH e temperatura, porém elevadas temperaturas e pH extremos podem levar a desativação da enzima. A estreita faixa de temperatura e pH para a atividade enzimática impede algumas mudanças bruscas nas condições experimentais e, conseqüentemente, pode limitar algumas reações (FABER, 2011).

Além de ser o solvente mais recomendável em relação ao meio ambiente, as enzimas apresentam sua atividade catalítica mais potente em água. No entanto, devido ao seu elevado calor de vaporização e ponto de ebulição, o meio aquoso é o menos adequado para a maioria das reações orgânicas. Adicionalmente, muitos compostos orgânicos são pouco solúveis ou insolúveis em água. Assim, seria interessante que as transformações com catalisadores biológicos ocorressem em meio orgânico, porém a presença do solvente orgânico pode provocar a perda da atividade da enzima e comprometer o processo (FABER, 2011).

Com a evolução das pesquisas, houve a criação e o desenvolvimento de novos procedimentos para as transformações utilizando enzimas como catalisadores, como também o aprimoramento daqueles já existentes e conseqüentemente, essas possíveis desvantagens

têm sido atenuadas. Muitas vezes, pequenas alterações nas condições reacionais são capazes de melhorar significativamente os resultados.

1.3.1. A catálise enzimática

As enzimas (E) são catalisadores biológicos e, de um modo geral, aumentam a velocidade da reação por meio da diminuição da barreira de energia (energia de ativação- E_a) entre o substrato (S) e o produto (P). A função da enzima é acelerar a reação de conversão do S no P. A catálise de uma reação sempre inicia-se pela formação do [ES] em uma cavidade ou bolsão na superfície da enzima denominado de sítio ativo, o qual é constituído por aminoácidos que se ligam ao substrato, catalisam sua transformação e liberam o produto. A formação do [ES] específico é essencial para a atividade enzimática e é o que efetivamente diferencia as enzimas de outros catalisadores químicos tradicionais (CAMPBELL, 2000; FABER, 2011; NELSON; COX, 2011; SILVERMAN, 2002).

Como pode-se observar na Figura 5, os processos catalisados por enzimas apresentam uma barreira energética menor do que aqueles na ausência do catalisador, sendo assim, a velocidade de uma reação catalisada é mais elevada. Pode-se dizer que as mesmas forças que estabilizam a estrutura conformacional das proteínas assistem à interação entre o substrato e a enzima no [ES]. São elas: ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações iônicas e interações de van der Waals. Com menor frequência, ligações covalentes transitórias também podem ocorrer. Concomitantemente à formação de cada interação no [ES], uma quantidade pequena de energia livre é liberada estabilizando a interação (ALEDO; LOBO; VALLE, 2003; FABER, 2011; NELSON; COX, 2011; SILVERMAN, 2002).

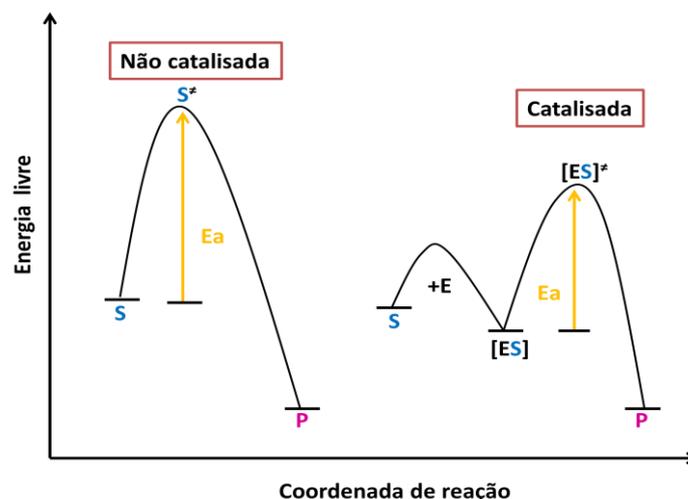


Figura 5. Diagrama de energia comparando uma reação catalisada enzimaticamente com uma não catalisada. Fonte: Adaptada de FABER, 2011.

De um modo geral, a estereosseletividade das enzimas está relacionada com a sua especificidade e baseia-se na diferença de energia dos complexos enzima-substrato no estado de transição $[ES]^\ddagger$. Em uma reação enantiosseletiva ambos os substratos enantioméricos S_1 e S_2 de um mistura racêmica, por exemplo, competem pelo sítio ativo da enzima. Como este fornece um ambiente quiral, a estereoquímica da reação será determinada pela quiralidade da enzima, e assim, são formados dois complexos diastereoisoméricos enzima-substrato $[ES_1]$ e $[ES_2]$, os quais apresentam valores distintos de energia livre (ΔG) para os seus estados de transição $[ES_1]^\ddagger$ e $[ES_2]^\ddagger$, respectivamente (Figura 6). A energia de ativação é diferente para os enantiômeros S_1 e S_2 e, por conseguinte, um enantiômero, nesse caso o S_1 , reagirá com maior velocidade do que o outro. Portanto, o ΔG^\ddagger está diretamente relacionado com a seletividade, ou seja, quanto maior for a sua medida, maior será o excesso enantiomérico (*ee*) do produto. Esse processo é denominado de reconhecimento quiral (FABER, 2011; SILVERMAN, 2002).

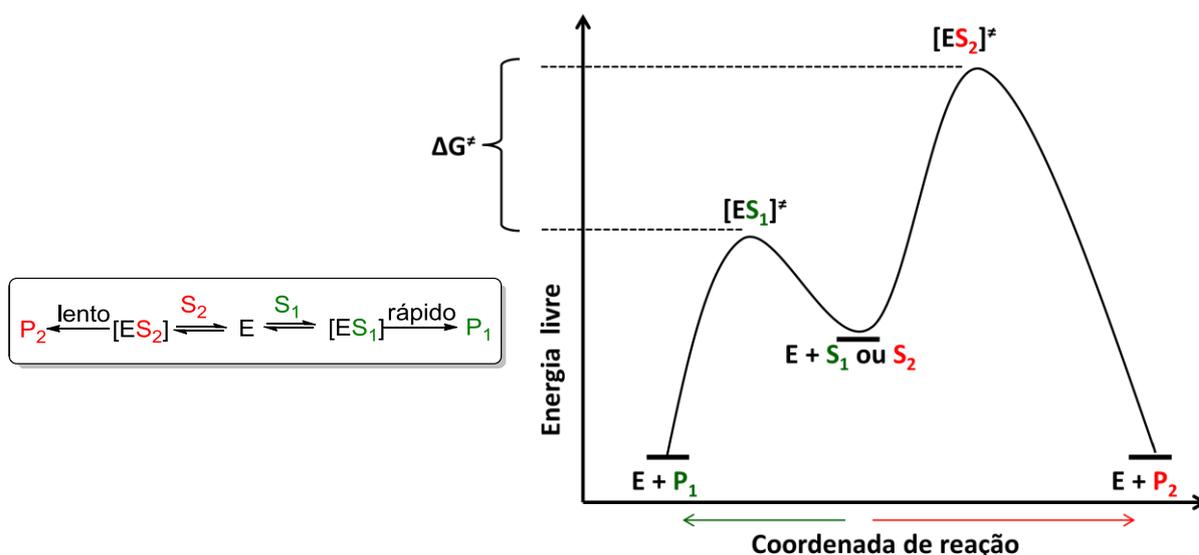


Figura 6. Diagrama de energia de uma reação enantiosseletiva catalisada por enzima comparando a ΔG dos estados de transição dos enantiômeros. Fonte: Adaptada de FABER, 2011.

Nesse sentido, para explicar a enantiosseletividade das reações enzimáticas, foi proposta a "teoria dos três pontos". Segundo esta, um substrato deve estar posicionado firmemente em três dimensões dentro da enzima para assegurar o reconhecimento estérico, alcançar um alto grau de enantiodiferenciação e a efetiva formação do $[ES]$. Como pode-se observar na Figura 7, são necessários pelo menos três pontos de ligação do substrato com o sítio ativo, assim, o enantiômero S que tem maior afinidade com a enzima, se ajusta melhor e é o mais ativo, já o enantiômero R é incapaz de se ligar efetivamente à enzima, o que pode

provocar diminuição ou alteração na sua atividade (FABER, 2011; MANNSCHRECK; KIESSWETTER, 2007; OGSTON, 1948, NGUYEN; HE; PHAM-HUY, 2006).¹

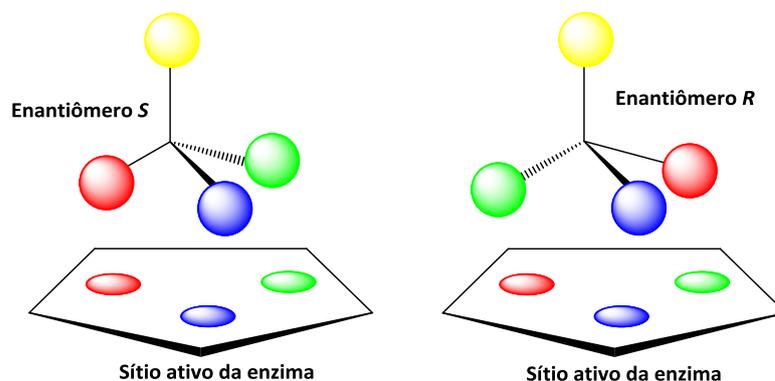


Figura 7. Representação esquemática da teoria dos três pontos. Fonte: Adaptada de MANNSCHRECK; KIESSWETTER, 2007 e OGSTON, 1948 .

Dessa forma, o arranjo estereoquímico é importante para a discriminação dos enantiômeros, a formação do [ES] e a catálise, ou seja, quanto maior a quantidade de interações e quanto melhor for o encaixe do substrato no sítio ativo da enzima, mais efetiva é sua ação.

1.4. Biocatálise

A busca por metodologias eficientes e economicamente viáveis, que permitissem a preparação de substâncias com um elevado grau de pureza enantiomérica e que favorecessem a substituição dos processos químicos convencionais por outros, menos agressivos ao meio ambiente, resultou em um grande desenvolvimento dos estudos e investimentos na área da biocatálise (PATEL, 2008; SCHMID et al. 2001; SCHOEMAKER et al., 1997; WANDREY; LIESE; KIHUMBU, 2000; ZAKS, 2001). A biocatálise é a aplicação de enzimas isoladas ou contidas em células íntegras de micro-organismos (TORRELO; HANEFELD; HOLLMAN, 2015; UPPADA; BHADURI; NORONHA, 2014), plantas e animais. Estas podem ser usadas em sua forma livre (ISHIGE.; HONDA; SHIMIZU, 2001; NAKAMURA, 2003) ou imobilizadas (SHELDON, 2013), abrangendo todos os processos em que os sistemas enzimáticos são os responsáveis pelas transformações químicas de uma maneira mais simples, seletiva e sustentável (DUNN, 2012; WOODLEY, 2008).

A biocatálise já vem sendo utilizada há séculos, principalmente, para a produção de alimentos e bebidas, tais como vinhos, queijos e cervejas (ROBERTS, 2004). De acordo com Wackett e Hershberger (2001), biocatálise e biotransformação são termos equivalentes,

entretanto, biotransformação é um termo mais abrangente, utilizado para qualquer transformação biológica nos substratos. Já a biocatálise é normalmente relacionada a processos realizados com o propósito de sintetizar um produto de utilidade sintética, como fármacos e intermediários. Dessa forma, em síntese orgânica, a biocatálise é frequentemente relacionada à substituição de um reagente químico por uma enzima.

Entre as possíveis fontes de biocatalisadores, os micro-organismos são de grande importância e apresentam algumas particularidades, tais como, curto período de crescimento; há uma grande diversidade da microbiota existente na natureza, a qual é composta por espécies detentoras de características e atividades distintas e peculiares e o grande arsenal enzimático que eles possuem e que os tornam capazes de catalisar diversos tipos de reações (CONTI; RODRIGUES; MORAN, 2001; ISHIGE.; HONDA; SHIMIZU, 2001)

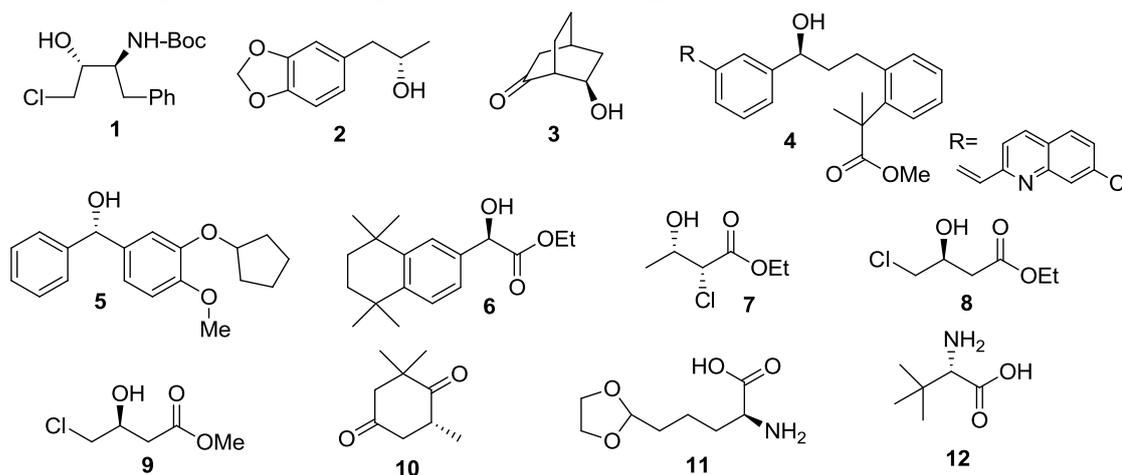
Além disso, com a utilização de células íntegras não é necessário a adição de cofatores exógenos de alto custo (NAD(P)H e NAD(P)⁺) (MONTI et al., 2011; SILVA; STAMBUK; NASCIMENTO, 2012), bem como de um sistema para sua regeneração *in situ*, pois elas já possuem seus cofatores e um sistema de reciclagem próprio e eficiente através de suas vias metabólicas (FABER, 2011; HOLLMANN, ARENDS, HOLTSMANN, 2011; HOUNG et al., 2003; WANG; ZONG; LOU, 2009; ZHANG; PIONNIER, 2003).

No entanto, como os cofatores estão presentes em quantidades catalíticas nos micro-organismos, fontes de carbono não dispendiosas como carboidratos, especialmente sacarose e glicose, assim como outras moléculas orgânicas, como o etanol, podem ser usadas como substratos auxiliares para a reciclagem dos cofatores (ZHANG; PIONNIER, 2003). Na ausência de substratos auxiliares, as células íntegras podem usar os elétrons doadores armazenados em suas próprias células, como também a água, que, nesse caso, é a principal fonte de hidrogênio para a reciclagem do cofator (CHU et al., 2006; ZHANG et al., 2001; ZHANG; PIONNIER, 2003). Adicionalmente, a utilização de células íntegras evita os processos de isolamento e purificação da enzima, os quais podem ter um alto custo e como as enzimas dentro das células estão protegidas do ambiente externo, na maioria das vezes, são mais estáveis a longo prazo do que quando isoladas (CARBALLEIRA et al., 2009; HOUNG et al., 2003; ISHIGE; HONDA; SHIMIZU, 2001). A biotransformação, então, pode ser realizada com a adição do substrato ao meio biocatalítico, o qual fornecerá as enzimas, os cofatores e o sistema de regeneração necessários para a formação do produto.

As maiores aplicações da biocatálise concentram-se na síntese assimétrica, na qual os catalisadores químicos clássicos vêm sendo substituídos pelas enzimas para preparação de compostos quirais (PANKE; HELD; WUBBOLTS, 2004; SOLANO et al., 2012;

WOODLEY, 2008). Recentemente, Solano e colaboradores (2012) relataram processos de biocatálise usados em escala industrial ou preparativa para a síntese de blocos de construção biologicamente ativos. Na Tabela 2, por exemplo, pode-se observar a síntese de precursores quirais biorreduzidos utilizando células íntegras de micro-organismo.

Tabela 2. Exemplos de compostos químicos sintetizados por meio de biorredução catalisada por células íntegras de micro-organismos. Fonte: Adaptada de SOLANO et al., 2012



Produto	Biocatalisador	Produtor	Fármaco
(2S,3R)-1	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Bristol-Myers Squibb	Atazanavir (inibidor da HIV endopeptidase)
(S)-2	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Eli-Lilly and Company	Talampanel™ (benzodiazepínicos)
(R)-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Johanson y cols.	Derivados do anti-tumoral taxano
(S)-4	<i>Microbacterium campoquemadoensis</i>	Merck & Co. Inc.	Montelukast (anti-asmático)
(S)-5	<i>Rhodotorula pilimanae</i>	Merck & Co. Inc.	Inibidor da fosfodiesterase (tratamento da asma)
(R)-6	<i>Aureobasidium pullulans</i> SC 13849	Bristol-Myers Squibb	Moduladores dos receptores do ácido retinóico
(2R,3S)-7	Rec. <i>E. coli</i> expressando enzima de <i>P.finlandica</i>	Lonza	Fármacos para o tratamento do colesterol
(S)-8	<i>Escherichia coli</i>	Kaneka Co	Atorvastatina (cadeia lateral)
(S)-9	<i>Geotrichum candidum</i> SC 5469	Bristol-Myers Squibb	Atorvastatina (cadeia lateral)
(R)-10	Rec. <i>E. coli</i> expressando enzima de <i>C. macedoniensi</i>	Hoffmann-LaRoche	Carotenóides e vitaminas
(S)-11	Rec. <i>E. coli</i> expressando enzima de <i>Sporosarcina</i> sp.	Bristol-Myers Squibb	Omapatrilat (anti-hipertensivo)
(S)-12	Rec. <i>E. coli</i> expressando enzima de <i>T. intermedius</i>	Degussa AG	Agentes anti-tumorais e inibidores da HIV endopeptidase

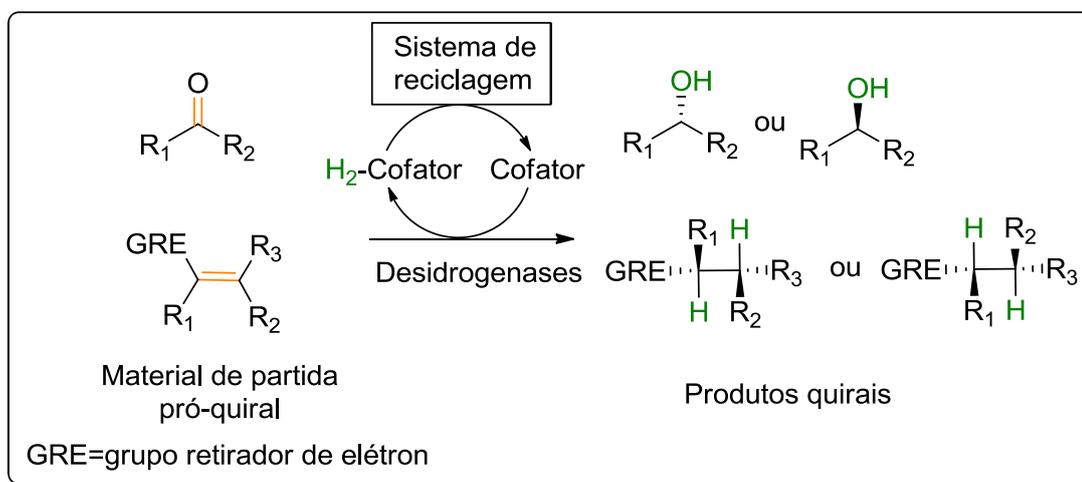
É relevante citar que nos últimos anos, elevou-se a utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, também conhecida como fermento de pão (FP), como biocatalisador para a preparação de compostos opticamente ativos (CLOSOSKI et al., 2007; LUO; WANG; GONG, 2010; PEREIRA, 1995a; RODRIGUES; MORAN, 2001; RODRIGUES et al. 2004; SCHAEFER et al., 2013; SERVI, 1990). Muitas são as vantagens na utilização desse micro-organismo, tais como versatilidade; baixo custo; alta enantiosseletividade; rendimentos químicos satisfatórios; grande disponibilidade, facilitando sua aquisição; não é patogênico e tóxico; fácil manipulação, não exigindo, assim, o conhecimento e aplicação de técnicas bioquímicas e microbiológicas complexas (PEREIRA, 1995a; RODRIGUES; MORAN, 2001; SERVI, 1990).

Além disso, o *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de catalisar diversas reações de síntese assimétrica, tais como, redução, ciclização, condensação e resolução cinética (FABER, 2011; PEREIRA, 1995a; SERVI, 1990).

1.4.1. Biorredução dos compostos carbonílicos α,β -insaturados mediada por micro-organismos

As enzimas empregadas em reações redox são conhecidas como oxidorredutases e de um modo geral, são classificadas em três categorias: desidrogenases, oxigenases e oxidases (FABER, 2011). Podem ser encontradas isoladas (MONTI et al., 2011) ou contidas em células íntegras de micro-organismos (BRENNAN et al., 2012; CARBALLEIRA et al., 2009; FABER, 2011; HALL; BOMMARIUS, 2011; WINKLER et al., 2012). Entre elas, as desidrogenases destacam-se pelo seu amplo uso em reações de biorredução de substratos pró-quirais para a produção de compostos opticamente ativos (Esquema 1) (CARBALLEIRA et al., 2009; FABER, 2011; HALL; BOMMARIUS, 2011). A álcool desidrogenase (ADH), também conhecida por carbonila redutase, tem sido comumente utilizada para a preparação de álcoois enriquecidos enantiomericamente por meio da redução de grupos carbonilas (CARBALLEIRA et al., 2009; FABER, 2011; MILAGRE et al., 2009; MONTI et al., 2011; NAKAMURA et al., 2003). Já a ene redutase (ER) tem sido bastante empregada e demonstrado grande eficiência na redução de ligações C=C de moléculas α,β -insaturadas cujas ligações duplas são ativadas por conjugação com grupos retiradores de elétrons (GRE), como carbonila (BRENNAN et al., 2012; CARBALLEIRA et al., 2009; HALL et al., 2006; HUANG; ZHANG; GONG, 2005; KAWAI, et al., 1996, KAWAI; HAYASHI; TOKITOH, 2001; TORRELO; HANEFELD; HOLLMAN, 2015) e nitro (KAWAI et al., 2001), os quais

aumentam a susceptibilidade a um ataque nucleofílico por um hidreto, assim, alcenos isolados não reagem (FABER, 2011; WINKLER et al., 2012).



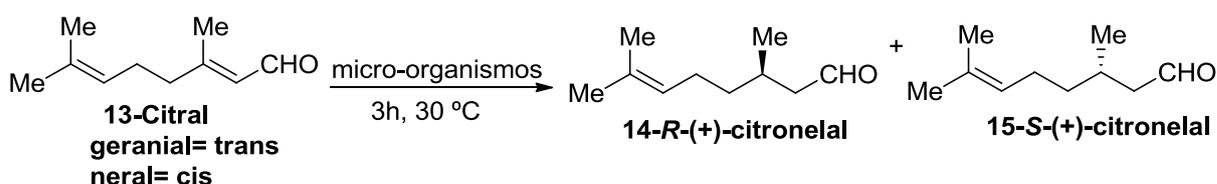
Esquema 1. Representação geral das reações de redução catalisadas por álcool desidrogenase e ene redutase. Fonte: Adaptado de FABER, 2011.

A redução assimétrica de ligações duplas C=C é uma das estratégias mais utilizadas para a obtenção de compostos quirais. As enzimas ene redutases, responsáveis por essa redução biocatalítica, contém o mononucleotídeo de flavina (FMN), são dependentes do NAD(P)H e são membros da família das *Old Yellow Enzyme* (OYE). A primeira ene redutase foi descoberta na década de 30, sendo estas amplamente distribuídas em micro-organismos e plantas (FABER, 2011; SHIMODA; KUBOTA; HAMADA, 2004; STUERMER et al. 2007; TOOGOOD; GARDINER; SCRUTTON, 2010; TOOGOOD; SCRUTTON, 2014; WINKLER et al., 2012). A ER pode ser aplicada na biorredução assimétrica de alcenos para a obtenção de compostos carbonílicos α -alquil substituídos opticamente ativos, os quais são importantes blocos de construção na síntese de fármacos quirais (BACH et al. 1998; COLOMBO et al., 1991; SHIN et al., 2007; SMITH; FREEZE, 2008) e produtos naturais, especialmente, feromônios (MORI; MASUDA; SUGURO, 1981; RILEY; SILVERSTEIN; MOSER, 1974; SINHA; KEINAN, 1995) e fragrâncias (ABATE et al., 2005; WINKLER et al., 2012).

Muller, Hauer e Rosche (2006) investigaram a biorredução assimétrica do citral para a obtenção do citronelal mediado por células íntegras de fungos e bactérias. Eles descobriram que diferentes micro-organismos podem apresentar atividades biocatalíticas com estereoespecificidades opostas para redução do citral em seus produtos *R*- ou *S*-citronelal (Tabela 3). As bactérias produziram preferencialmente o enantiômero *S*, já os fungos geraram

o enantiômero *R*. Assim, para futuros processos de bioconversão, é possível a preparação de ambos seletivamente por meio da escolha do micro-organismo adequado. Observou-se também que, como esperado, a ligação dupla isolada e não ativada permaneceu inalterada durante as reações de biorredução.

Tabela 3. Biorredução do citral mediado por micro-organismos. Fonte: Adaptada MULLER; HAUER; ROSCHE, 2006.



Micro-organismo	Configuração	ee(%)
<i>Zymomonas mobilis</i>	<i>S</i>	>99
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>S</i>	75
<i>Candida rugosa</i>	<i>R</i>	>98
<i>Saccharomyces bayanus</i>	<i>R</i>	>97
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>R</i>	>96
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>R</i>	>95
<i>Candida utilis</i>	<i>R</i>	>94
<i>Issatchenkia orientalis</i>	<i>R</i>	64
<i>Rhizopus javanicus</i>	<i>R</i>	>94

Entre os diversos micro-organismos que apresentam a ene redutase e, conseqüentemente, a capacidade de reduzir assimetricamente a ligação dupla (MULLER; HAUER; ROSCHE, 2006; WINKLER et al., 2012), o *Saccharomyces cerevisiae* ocupa um lugar especial, pois historicamente, ele foi o primeiro biocatalisador adotado para sínteses assimétricas e gerou compostos quirais com alto *ee* (BRENNAN et al., 2012; SERVI, 1990). Além disso, a maioria das reduções biocatalíticas assimétricas têm sido mediadas por células íntegras de micro-organismos, principalmente, de *Saccharomyces cerevisiae*, a fim de evitar a adição de um sistema de reciclagem do cofator externo e os dispendiosos e complicados processos de isolamento da enzima (HALL et al., 2006; SERVI, 1990; STUERMER et al., 2007).

Embora as estereosseletividades das biorreduções mediadas por células íntegras muitas vezes sejam excelentes, a quimiosseletividade é frequentemente insatisfatória devido à presença de competitivas desidrogenases (HALL et al., 2006). A taxa relativa da redução C=C *versus* C=O depende das enzimas e dos compostos envolvidos (KERGOMARD; RENARD;

VESCHAMBRE, 1982; STUERMER et al., 2007). Por exemplo, a competitiva redução da carbonila em olefinas ativadas é menor em cetonas do que em aldeídos e a distribuição do produto está relacionada com a quantidade e velocidade relativa de redução de cada uma dessas enzimas presentes nos micro-organismos (FABER, 2011; STUERMER et al., 2007; WINKLER et al., 2012).

Nesse sentido, Zagozda e Plenkiewicz (2006) empregaram três micro-organismos, *Mortierella isabellina*, *Geotrichum candidum* e *Rhodotorula rubra*, para a redução do composto 4-fenil-3-metil-3-buten-2-ona e dos seus derivados com substituintes no anel aromático. Eles observaram que enquanto a linhagem de *Rhodotorula rubra* converteu os compostos nas cetonas opticamente ativas **17** com moderadas enantiosseletividades e com apenas traços dos correspondentes álcoois insaturados **18** e saturados **19** (Tabela 4), as linhagens de *Mortierella isabellina* e *Geotrichum candidum* reduziram as cetonas α,β -insaturadas no correspondente álcool secundário **20** com elevado *ee* (Tabela 5). Dessa maneira, uma cuidadosa seleção do micro-organismo poderá direcionar a reação no sentido da redução de um centro quiral ou de outro e na obtenção do produto almejado.

Tabela 4. Biorredução das cetonas α,β -insaturadas mediada por *Rhodotorula rubra*. Fonte: Adaptado de ZAGOZDA; PLENKIEWICZ, 2006.

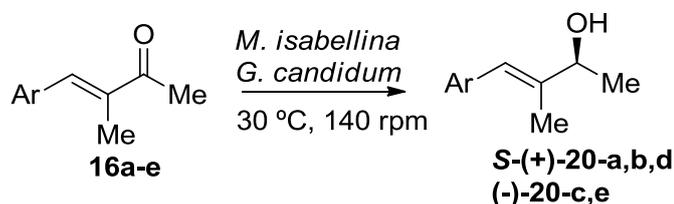
Produto	Ar	Tempo(h)	Conversão ^a /Rendimento ^b (%)	<i>ee</i> (%) ^c
17a	H-Ph	22	64/44	46
17b	<i>m</i> -OMe-Ph	23	66/49	71
17c	<i>p</i> -OMe-Ph	24	55/32	38
17d	<i>m</i> -Me-Ph	24	61/41	65
17e	<i>p</i> -NMe ₂	120	-	-

^a Conversão da cetona saturada foi determinada por análise no CG.

^b Rendimento isolado.

^c Determinado por CLAE usando a coluna Chiracel OD-H.

Tabela 5. Biorredução das cetonas α,β -insaturadas mediada por *Mortierella isabellina* (Mi) e *Geotrichum candidum* (Gc). Fonte: Adaptada de ZAGOZDA; PLENKIEWICZ, 2006.



Produto	Ar	Micro-organismo	Tempo (h)	Conversão ^a /	ee(%) ^c
				Rendimento ^b (%)	
20a	H-Ph	Mi	6	81/65	97
20b	<i>m</i> -OMe-Ph	Mi	24	59/35	94
20c	<i>p</i> -OMe-Ph	Mi	24	51/23	77
20d	<i>m</i> -Me-Ph	Mi	24	56/31	94
20e	<i>p</i> -NMe ₂	Mi	48	65/12	43
20a	H-Ph	Gc	2	47/24	98
20b	<i>m</i> -OMe-Ph	Gc	3	18/16	99
20c	<i>p</i> -OMe-Ph	Gc	48	-	-
20d	<i>m</i> -Me-Ph	Gc	3	25/19	98
20e	<i>p</i> -NMe ₂	Gc	48	-	-

^a Conversão da cetona saturada foi determinada por análise no CG.

^b Rendimento isolado.

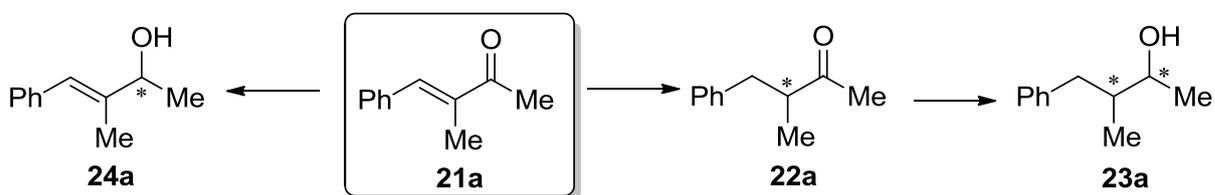
^c Determinado por CLAE usando a coluna Chiracel OD-H.

A existência de dois caminhos diferentes na biorredução de enonas já havia sido reportada por van Deursen e colaboradores em 2004. De acordo com esses pesquisadores, a existência de duas classes de oxidoredutases pode direcionar a biotransformação para caminhos distintos. Por um lado, a ADH exclusivamente reduz o grupamento cetona e mantém a ligação C=C inalterada. Por outro lado, a ene redutase apresenta quimiosseletividade e, frequentemente, boa estereosseletividade na biorredução da ligação C=C e mantém a função carbonila intacta. O caminho a ser seguido está relacionado tanto com os micro-organismos quanto com os substratos empregados.

Dessa forma, como a ligação C=C não ativada por GRE não é reativa (FABER, 2011; MULLER; HAUER; ROSCHE, 2006; WINKLER et al., 2012), provavelmente, a redução da ligação do grupo carbonila pela desidrogenase ocorre como um segundo plano (ZAGOZDA; PLENKIEWICZ, 2006). O FP, por exemplo, primeiramente reduz a ligação C=C de enonas,

por meio da ação da ene redutase, gerando cetonas saturadas, as quais podem ser reduzidas à álcoois saturados em um processo lento através da ADH (van Deursen et al., 2004)

Kawai e colaboradores (1996) buscaram a elucidação do caminho reacional na biorredução do composto carbonílico α -alquil- α,β -insaturado **21a** mediada por FP, pois em seus experimentos eles detectaram 3% do álcool insaturado **24a** e 9% do álcool saturado **23a** quando submeteram a cetona **21a** às reações de biorredução. Para isso, prepararam uma cetona racêmica saturada **22a** e um álcool alílico racêmico **24a** e submeteram-nos ao sistema biocatalítico. A cetona saturada **22a** gerou o álcool saturado **23a** lentamente enquanto o álcool alílico **24a** foi recuperado inalterado (Esquema 2).

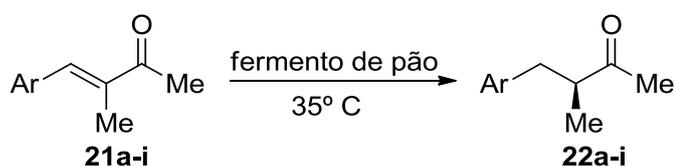


Esquema 2. Possível caminho reacional da biorredução de cetonas α,β -insaturadas. Fonte: Adaptado de KAWAI et al, 1996.

Tais resultados sugerem que o álcool saturado **23a** é produzido através da cetona saturada **22a** depois de um prolongado tempo reacional ou sob drásticas condições reacionais, já o composto **24a** possivelmente é um produto final formado através de um segundo caminho a partir da cetona **21a**. Dessa forma, eles concluíram que a redução da ligação C=C é predominante em olefinas ativadas e que seus resultados eram semelhantes àqueles já relatados por Sakai et al. (1991).

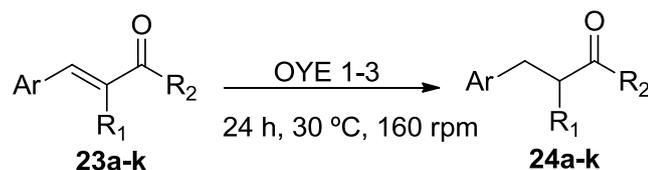
Dando continuidade aos estudos, Kawai e colaboradores (1996), visando melhorar a enantiosseletividade na redução assimétrica de cetonas α,β -insaturadas, avaliaram o efeito dos substituintes (Tabela 6). Eles observaram que a estereosseletividade da redução é fortemente influenciada pelos substituintes no anel aromático assim como pela suas posições (*orto*, *meta* e *para*). A presença dos substituintes em *orto* **22b** e *meta* **22c**, por exemplo, melhoraram drasticamente a estereosseletividade da reação.

Tabela 6. Redução assimétrica de enonas **21** com fermento de pão. Fonte: Adaptada de KAWAI et al, 1996.



Produto	Ar	Tempo(h)	Rendimento(%)	ee(%)
22a	Ph	30	42	71
22b	2-MeO-Ph	48	13	>95
22c	3-MeO-Ph	48	72	>95
22d	4-MeO-Ph	20	73	61
22e	3,4- <i>di</i> -MeO-Ph	60	59	>95
22f	4-OH-Ph	76	20	58
22g	3-Cl-Ph	24	91	96
22h	3-NO ₂ -Ph	48	49	>95
22i	2-Py	50	59	65

Recentemente, Brenna et al. (2013) também estudaram os efeitos estéricos e eletrônicos na biorredução de α,β -insaturada- α -alquil- β -aril cetonas (Tabela 7). Sabendo da possibilidade de competição entre enzimas com diferentes quimiosseletividades existentes em células íntegras e buscando evitar qualquer inconveniente que pudesse impedir a alta seletividade e rendimento das biotransformações, esses pesquisadores optaram pela utilização de enzimas isoladas OYE1-3. Os resultados indicaram que a conversão é maior quando os substituintes na posição α e adjacentes à carbonila são pequenos. Em decorrência do aumento do efeito estérico na presença de substituintes mais volumosos, há uma diminuição da conversão e, às vezes, como pode-se verificar com os substratos **23f**, **23i** e **23k**, a reação não ocorre. Similarmente a Kawai e colaboradores (1996), eles verificaram que os substituintes no anel aromático na posição *orto* **23b** e *meta* **23c** geraram produtos com maiores enantiosseletividades do que aqueles na posição *para* **23d**. Além disso, as ene redutases OYE1-3 demonstraram comportamentos enantiodivergentes e permitiram o acesso a ambos enantiômeros (*R* ou *S*) dos produtos por meio do emprego de diferentes biocatalisadores.

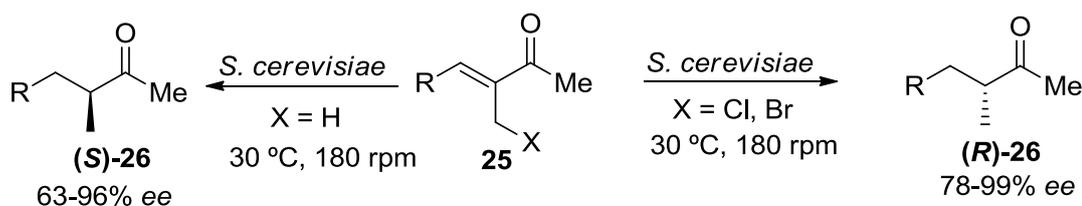
Tabela 7. Biorredução de α -alquil- β -aril enonas mediada por OYE1-3. Fonte: Adaptada de BRENNNA et al., 2013.

Substrato	R ₁	R ₂	Ar	OYE1		OYE2		OYE3	
				Conv. ^a (%)	ee ^b (%)	Conv. ^a (%)	ee ^b (%)	Conv. ^a (%)	ee ^b (%)
23									
a	Me	Me	Ph	>99	56(<i>S</i>)	>99	61(<i>S</i>)	>99	98(<i>S</i>)
b	Me	Me	2-MeO-Ph	>99	97(<i>S</i>)	61	95(<i>S</i>)	46	96(<i>S</i>)
c	Me	Me	3-MeO-Ph	>99	95(<i>S</i>)	>99	97(<i>S</i>)	>99	99(<i>S</i>)
d	Me	Me	4-MeO-Ph	92	42(<i>S</i>)	64	59(<i>S</i>)	45	97(<i>S</i>)
e	Me	Et	Ph	67	59(<i>R</i>)	9	76(<i>R</i>)	14	89(<i>S</i>)
f	Me	Et	2-MeO-Ph	3	n.d.	<1	n.d.	<1	n.d.
g	Me	Et	3-MeO-Ph	53	20(<i>R</i>)	11	42(<i>R</i>)	8	95(<i>S</i>)
h	Me	Et	4-MeO-Ph	41	60(<i>R</i>)	26	69(<i>R</i>)	7	81(<i>S</i>)
i	Me	<i>i</i> -Pr	Ph	<1	n.d.	<1	n.d.	<1	n.d.
j	Et	Me	Ph	>99	99(<i>S</i>)	52	99(<i>S</i>)	>99	99(<i>S</i>)
k	<i>n</i> -Bu	Me	Ph	16	98(<i>S</i>)	3	n.d.	6	n.d.

^a Conversão foi determinada por análise no CG-EM.

^b Determinada por CG acoplado com coluna quiral.

Paula e colaboradores (2013) também observaram a enantiodivergência na redução de α -metil e α -halometil enonas mediada por *S. cerevisiae* (Esquema 3). Quando as α -halometil enonas foram submetidas ao sistema de biorredução, a sequência redução-eliminação-redução gerou os produtos (**R**)-**26** com *ee* de 78 a 99%. Em contrapartida, a redução das α -metil enonas produziu as α -metil cetonas (**S**)-**26** com 63 a 96% de *ee*. Dessa forma, a substituição de uma ligação C-H por uma C-halogênio na posição β -carbonila pode ser usada como uma estratégia para controlar a estereoquímica na biorredução da ligação C=C.



R = Ph, 2-Cl-Ph, 4-Cl-Ph, 3-NO₂-Ph, 4-NO₂-Ph, 4-MeO-Ph, *n*-C₅H₁₁

Esquema 3. Biorredução de enonas mediada por *S. cerevisiae*. Fonte: Adaptada de Paula et al. 2013.

Embora complexos de metais de transição tenham sido empregados com sucesso na hidrogenação assimétrica de compostos α,β -insaturados (BLASER; SPINDLER; STUDER, 2001; LU; BOLM, 2008; MAURER et al., 2012), as condições experimentais mais prejudiciais, como o uso de solventes orgânicos, o acúmulo de metais tóxicos, gás hidrogênio sob altas pressões, o custo elevado e a indisponibilidade comercial de muitos ligantes quirais, assim como os resíduos químicos gerados no decorrer do processo, incentivam o uso de biocatalisadores (DUNN, 2012; WOODLEY, 2008; NAKAMURA et al., 2003).

1.4.2. Resina adsorvente Amberlite

A fim de melhorar a enantiosseletividade dos produtos e o rendimento das reações biocatalíticas, uma técnica promissora é o emprego de resinas adsorventes.

Em 1962, a indústria "Rohm and Haas", atualmente conhecida por "Dow Chemical Company", iniciou a preparação de uma resina macrorreticular por meio de técnicas de polimerização (HUBBARD; FINCH; DARLING, 1998; KUNIN; MEITZNER; BORTNICK; 1962). Em 1967, a primeira resina adsorvente, chamada de Amberlite, tornou-se comercialmente disponível (HUBBARD; FINCH; DARLING, 1998).

As resinas Amberlite XAD são esferas brancas, às vezes, levemente amareladas, porosas, adsorventes e poliméricas. Atualmente, são fabricadas diversos tipos de resinas Amberlite, tais como, XAD-2, XAD-4, XAD-16, XAD-1180, XAD-7, entre outras, as quais apresentam diferenças em relação à natureza química, grau de polaridade, momento dipolo, tamanho do poro e área superficial (SIGMA ALDRICH, 2015; VOLPÉ; MALLET, 1979). Adicionalmente, o material a ser adsorvido pela resina deve ser capaz de migrar através dos poros para a superfície do adsorvente (SIGMA ALDRICH, 2015).

O termo adsorção se refere ao processo em que moléculas se aglomeram em uma camada interfacial, já a dessorção é o movimento inverso. A substância a ser adsorvida é definida como adsorbato e o sólido no qual ocorre a adsorção é o adsorvente (DABROWSKI, 2001). A classificação do processo de adsorção é resultante da força de interação entre o adsorvente e o adsorbato e, dessa forma, pode ser proveniente de interações de Van der Waals (adsorção física) ou envolver interações químicas específicas mais fortes como forças eletrostáticas e ligações covalentes (adsorção química). Casos as condições permitam, ambos os processos podem ocorrer simultaneamente ou alternadamente (DABROWSKI, 2001; TEIXEIRA; COUTINHO; GOMES, 2001).

A capacidade de dessorção do material de partida da resina para a fase aquosa e de adsorção do produto da fase aquosa para a resina são características importantes e que devem ser consideradas para a escolha de uma resina eficiente (YANG; YAO; GUAN, 2005). Os materiais orgânicos adsorvidos nas resinas podem ser dessorvidos utilizando diversos solventes orgânicos, por exemplo, éter etílico, acetona, acetato de etila, diclorometano e metanol (ANDERSSON; ANDERSSON, 1982).

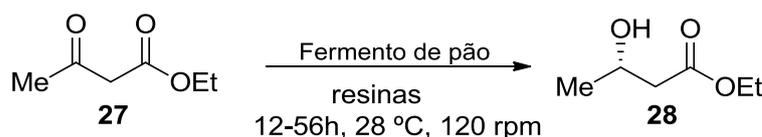
Inicialmente, as resinas Amberlite XAD foram empregadas na análise de pequenas quantidades de compostos orgânicos na água (ANDERSSON; ANDERSSON, 1982; JUNK et al. 1974; VOLPÉ; MALLET, 1979). Um outro campo de aplicação desses adsorventes é na análise de compostos orgânicos presentes no ar (ANDERSSON; LEVIN; NILSSON, 1981; ANDERSSON et al., 1981), em materiais biológicos (IBRAHIM; ANDRYAUSKAS; BASTOS, 1975) e extratos de plantas (ANDERSSON; ANDERSSON, 1982).

Nos últimos anos, segundo dados da literatura, (ARRIGO et al., 1998; CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003a; CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003b; YANG; YAO; GUAN, 2005; NAKAMURA; FUJII; IDA, 2000) a resina polimérica hidrofóbica também tem sido utilizada como uma ferramenta para contornar o problema da baixa estereosseletividade em reações de biocatálise utilizando micro-organismos. Nessa técnica, o substrato orgânico hidrofóbico é adsorvido na resina e, quando adicionado ao sistema reacional, fica particionado entre a fase sólida orgânica e a fase aquosa (CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003b).

De um modo geral, as resinas Amberlite apresentam afinidade semelhante tanto pelo substrato quanto pelo produto, controlando a concentração de ambos na fase aquosa. Dessa forma, o polímero age como um reservatório do substrato, controlando a massa do substrato que é consumida pelo biocatalisador na fase aquosa e ao longo da reação, o produto liberado pelo biocatalisador é extraído *in situ* pela resina (ARRIGO et al., 1998; CHAVES; MORAN; RODRIGUES, 2013; CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003a; CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003b; YANG; YAO; GUAN, 2005) Evita-se, assim, o acúmulo de ambos na fase aquosa e na superfície celular, que pode causar a inibição enzimática, toxicidade e levar a morte celular (ANDERSON et al., 1995; ARRIGO et al., 1998; CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003a; CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003b; ROFFLER; BLANCH; WILKE, 1984; YANG; YAO; GUAN, 2005).

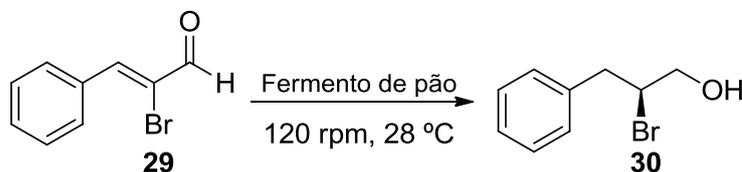
Uma aplicação dessa metodologia foi reportada por Arrigo et al. (1997), que estudaram a correlação entre o *ee* do *S*-(+)-3-hidroxibutanoato de etila, obtido na biorredução do acetoacetato de etila mediada por FP, e a concentração do substrato no meio reacional

utilizando resinas adsorventes (Esquema 4). Esses pesquisadores realizaram um estudo comparativo com diferentes resinas (XAD-1, XAD-7, XAD-1180, Dow 24D) e na ausência das mesmas. Os resultados demonstraram uma elevação da enantiosseletividade do produto de 78% no experimento branco para 89-94% com o emprego dos adsorventes, que foi relacionada à diminuição da concentração do substrato na fase aquosa.



Esquema 4. Biorredução do acetoacetato de etila. Fonte: Adaptado de ARRIGO et al. 1997.

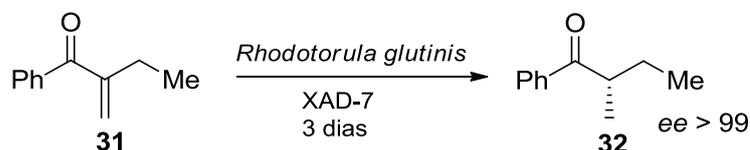
Dando continuidade aos estudos com a resina Amberlite, Arrigo e colaboradores (1998) confirmaram que o controle da concentração do substrato na fase aquosa é uma poderosa estratégia para alcançar alta seletividade nas reações de redução. Eles testaram diferentes concentrações do substrato **29** (Esquema 5) e relacionaram-nas com os *ee* obtidos. Observou-se que o aumento da concentração do substrato causou uma queda na enantioseletividade do produto, ou seja, o *ee* que era de 91,8% com a concentração de 0,1 g/L, diminuiu para 62,7% com a elevação da concentração para 5 g/L. A enantiosseletividade insatisfatória foi consequência da presença de múltiplas enzimas com diferentes enantiopreferências. Já com a presença de resina XAD-1180 e concentração de 2 g/L do substrato, o *ee* obtido foi maior que 95% em detrimento das biorreduções na ausência de resina, cujo *ee* foi de 68,2%. Tais estudos demonstraram que o controle dos parâmetros experimentais foi capaz de favorecer a atividade da enzima desejada e suprimir a ação das demais.



Esquema 5. Biorredução do composto carbonílico α,β -insaturado **29**. Fonte: Adaptado de ARRIGO et al. 1998.

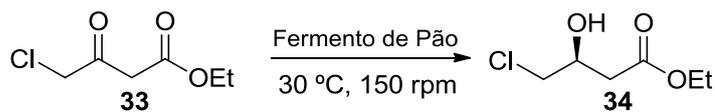
Conceição, Moran e Rodrigues (2003a), afim de obterem alto rendimento e *ee* também exploraram o uso da resina Amberlite em seus experimentos utilizando a levedura *Rhodotorula glutinis* para a redução da ligação C=C da enona 2-etil-1-fenil-pro-2-en-1-ona (Esquema 6). Devido a adsorção do substrato hidrofóbico na resina XAD-7, houve uma

diminuição da sua concentração na fase aquosa, já que a sua liberação foi controlada pela resina, o que foi crucial para garantir a redução eficiente e a obtenção do produto com alta enantiosseletividade. Nesses experimentos, o *ee* observado foi maior que 99%.



Esquema 6. Biorredução da cetona 2-etil-1-fenil-pro-2-en-1-ona. Fonte: Adaptado de CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003a.

Outro exemplo do emprego de resina na biorredução de compostos carbonílicos é apresentado nos trabalhos de Yang e colaboradores (2005). Esse trabalho tinha como objetivo aumentar a concentração inicial do substrato 4-cloro-3-oxobutanoato de etila e melhorar a estereosseletividade da sua redução assimétrica mediada por FP (Esquema 7).



Esquema 7. Biorredução do 4-cloro-3-oxobutanoato de etila. Fonte: Adaptado YANG; YAO; GUAN, 2005.

Primeiramente, eles avaliaram a capacidade de adsorção e dessorção de cinco tipos de resinas. Os pesquisadores selecionaram, para a continuidade aos seus experimentos, a resina XAD-1600 que adsorveu fortemente o produto (4-cloro-3-hidroxibutanoato de etila) e dessorveu o substrato (4-cloro-3-oxobutanoato de etila) moderadamente (Tabela 8). Com essas características, a resina apresentou a capacidade máxima para controlar a concentração do substrato e produto na fase aquosa e elevar a estereosseletividade da reação.

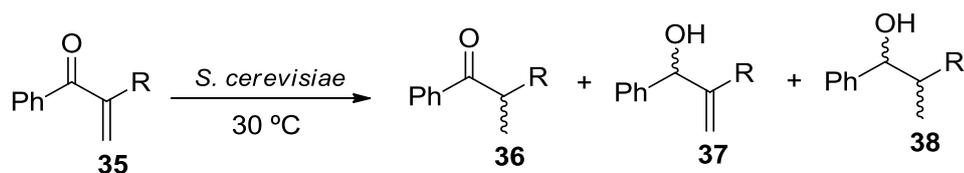
Tabela 8. Proporção de dessorção e adsorção do substrato e do produto. Fonte: Adaptada de YANG; YAO; GUAN, 2005

Resina	Dessorção(%)	Adsorção(%)
XAD-4	44,7	66,98
XAD-1180	53,36	63,45
XAD-1600	23,72	85,99
XAD-7HP	33,61	61,96
XE-749	34,65	76,36

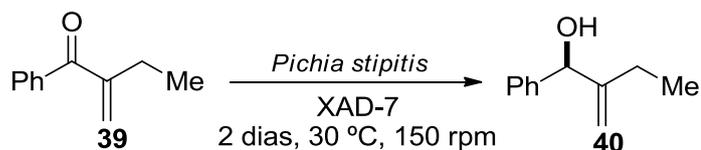
Posteriormente, os pesquisadores introduziram o substrato adsorvido na resina XAD-1600 no meio biocatalítico afim de que ele fosse liberado lentamente e, ao mesmo tempo, ocorresse a extração do produto *in situ*. Dessa forma, a concentração do substrato e do produto no sistema reacional poderia ser controlada conforme os comportamentos de adsorção de ambos. Os experimentos indicaram uma elevação da estereosseletividade de 78% para 95%, com a produção preferencial do *S*-enantiômero, e da concentração do substrato de 70 para 150 mmol/L. Os autores concluíram que essa técnica é promissora e conveniente quando comparada com outros métodos de controle da estereoquímica (YANG; YAO; GUAN, 2005).

Tanto Arrigo et al. (1997, 1998) quanto Conceição, Moran e Rodrigues (2003a) e Yang e colaboradores (2005) investigaram a influência da quantidade de resina na enantiosseletividade da biorredução. Nos experimentos de Arrigo et al. (1997), foi observado que o *ee* que era de 78,9% na ausência de resina, aumentou para 94,4% utilizando 9 g de resina. Em 1998, nos trabalhos publicados pelo mesmo grupo, o *ee* que era de 68,2% sem a resina, ascendeu para mais que 95% com o uso da resina. Resultados similares foram obtidos por Conceição, Moran e Rodrigues (2003a), o *ee* obtido com 1 g de resina que era de 85%, elevou-se para 99% na presença de 3 g. Yang e colaboradores (2005) também demonstraram que a enantiosseletividade e o rendimento aumentaram na medida em que elevou-se a quantidade de resina Amberlite, o *ee* que era de 87% com 60 g/L passou a ser de 94% com 140 g/L.

Nesse contexto, Conceição, Moran e Rodrigues (2003b), buscando alta quimio- e enantiosseletividade na preparação do produto (*S*)-2-etil-1-fenil-prop-2-en-1-ol **40**, primeiramente, realizaram uma triagem com diversos micro-organismos e os resultados que se destacaram foram aqueles obtidos com a levedura *Pichia stipitis*. Todavia, além do produto desejado ter sido obtido com rendimento e quimiosseletividade baixos, o aumento da concentração da enona também foi tóxico e prejudicou a conversão do substrato. Assim, buscando uma alternativa para superar essas limitações, os pesquisadores adicionaram o substrato adsorvido na resina polimérica hidrofóbica ao meio reacional afim de reduzir tanto a concentração do substrato quanto a do produto na fase aquosa. Eles verificaram que, diferente do trabalho reportado pelo grupo anteriormente (FILHO; RODRIGUES; MORAN, 2001), no qual para substratos semelhantes foi observado redução preferencial da ligação C=C, produto **36**, em detrimento da ligação C=O (Esquema 8), a adsorção do substrato na resina bem como a escolha da levedura *Pichia stipitis* foram determinantes para a obtenção de elevada enantio- e quimiosseletividade do produto **40** (Esquema 9).



Esquema 8. Biorredução da α -metil cetona. Fonte: Adaptado de CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003b.



Esquema 9. Biorredução do 2-etil-1-fenil-prop-2-en-1-ona. Fonte: Adaptado de CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003b.

A maioria das resinas Amberlite XAD são apolares, em contrapartida, a XAD-7 é considerada de polaridade intermediária, já que é um polímero de éster acrílico, alifático, insolúvel e não iônico (Figura 8). As capacidade de adsorção da XAD-7 provém da sua estrutura macrorreticular, grande área superficial e composição química alifática. Essa resina também apresenta grande estabilidade física e térmica resultante da sua estrutura. Devido a sua natureza alifática, ela é capaz de adsorver tanto compostos não polares de sistemas aquosos como também compostos relativamente polares de solventes apolares (SIGMA ALDRICH, 2015; ROHM AND HASS, 2003; VOLPÉ; MALLET, 1979).

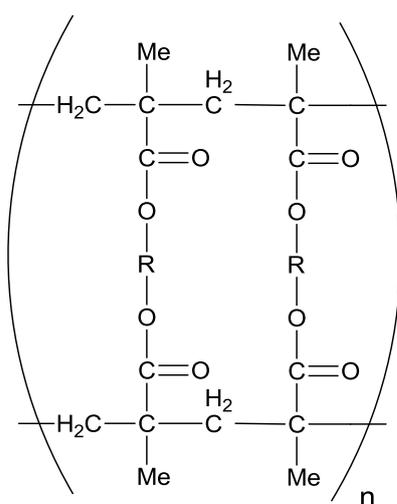
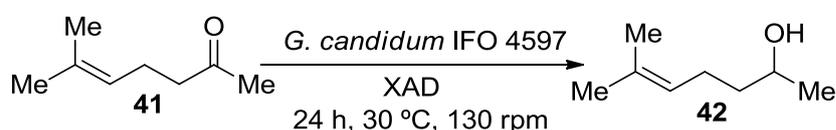


Figura 8. Estrutura química da resina adsorvente XAD-7. Fonte: Adaptada de ROHM AND HASS, 2003.

Em 2000, Nakamura, Fujii e Ida, visando controlar a estereoquímica das reduções de cetonas, testaram diversas resinas adsorventes poliméricas na redução do substrato 6-metil-hept-5-en-2-ona (Tabela 9). Os pesquisadores verificaram que a resina adsorvente XAD-7 apresentou os melhores resultados e aumentou, consideravelmente, a estereosseletividade e o rendimento da reação. O excesso enantiomérico que era de 27% na ausência de resina, elevou-se para 86% com a sua presença. Os autores relacionaram esses resultados à grande área superficial e a polaridade da resina XAD-7.

Tabela 9. Características e efeito da resina na redução de 6-metil-hept-5-en-2-ona. Fonte: Adaptada de NAKAMURA; FUJII; IDA, 2000.

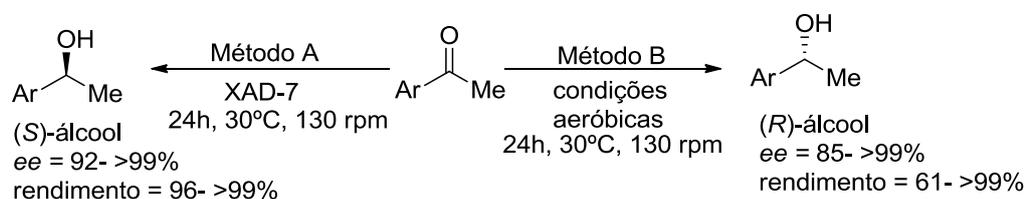


Resina	Material	Área Superficial (m ² /g)	Rendimento/ee (%)	Configuração
XAD-2	Estireno-DVB	280–320	20/50	<i>R</i>
XAD-4	Estireno-DVB	700–800	17/18	<i>R</i>
XAD-7	Éster acrílico	350–500	31/86	<i>S</i>
XAD-8	Éster acrílico	120–300	16/22	<i>S</i>
Nenhuma	-	-	28/27	<i>R</i>

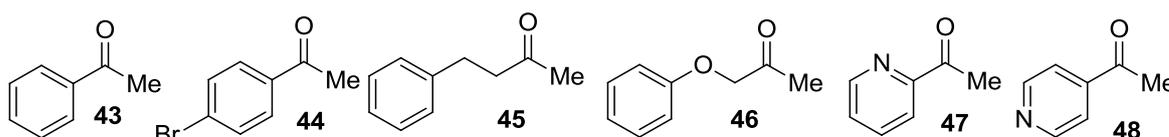
Posteriormente, Nakamura e colaboradores (2002) testaram a adição do substrato adsorvido na resina XAD-7 (método A) e condições aeróbicas (método B) para a obtenção dos enantiômeros de álcoois secundários e notaram que houve inversão da configuração absoluta, ou seja, o caminho estereoquímico para a formação dos enantiômeros foi dependente das condições reacionais empregadas (Esquema 10).

Em razão da existência de enzimas com preferência estereoquímica oposta, o uso de células íntegras de micro-organismos na biorredução de compostos carbonílicos pode resultar em produtos com baixa estereosseletividade (NAKAMURA et al., 1991). Todavia, nesses ensaios, a adição da resina Amberlite propiciou a preparação preferencial do (*S*)-álcool. Os pesquisadores (NAKAMURA et al., 2002) utilizaram a *K_m* (Constante de Michaelis-Menten) para discutir e explicar esses resultados, ou seja, com a adsorção do substrato na resina polimérica hidrofóbica, houve uma diminuição da sua concentração na fase aquosa e uma enzima com menor valor de *K_m* reage, preferencialmente, em baixas concentrações do substrato. Assim, a enzima-pró-(*S*) que, possivelmente, apresenta um menor valor de *K_m*

quando comparada a enzima-pró-(*R*), foi aquela que contribuiu predominantemente para a biorredução da cetona e obtenção do (*S*)-álcool.



Cetonas utilizadas:



Esquema 10. Redução assimétrica de cetonas com *G. candidum*. Fonte: Adaptado de NAKAMURA et al., 2002.

A aplicação da resina Amberlite é uma metodologia bastante atrativa, principalmente para a indústria, já que ela possibilita a utilização de reações de biotransformações em maiores escalas, ou seja, utilizando uma quantidade inicial maior de substrato sem comprometer o rendimento e *ee* do produto (YANG; YAO; GUAN, 2005).

4. Conclusões

4. CONCLUSÕES

De acordo com as investigações realizadas neste período e os resultados obtidos, pode-se assumir que os objetivos do presente trabalho foram alcançados.

Como apresentado, os compostos carbonílicos α,β -insaturados foram obtidos com rendimentos satisfatórios, os quais foram submetidos a reação de biorredução e geraram compostos carbonílicos α -alquil substituídos opticamente ativos. Para encontrar a condição reacional que resultasse em produtos com alta conversão e *ee*, foram avaliados diversos parâmetros experimentais.

Em relação ao meio reacional, os melhores resultados foram obtidos utilizando sistema monofásico aquoso sem aditivos mediado pela LSC-II.

Apesar do uso da *Pichia kluyveri* e de linhagens de diferentes origens ter gerado o produto esperado, este foi obtido com rendimentos e enantiosseletividades inferiores ao desejado. Dessa forma, a levedura LSC-II foi a mais adequada para a continuidade dos experimentos. Além disso, o uso da resina Amberlite XAD-7 bem como mudanças na estrutura da molécula proporcionaram o aumento da conversão e *ee* dos compostos carbonílicos α -alquil substituídos, os quais foram isolados com rendimentos moderados a bons.

Por fim, estudou-se a aplicação sintética da metodologia na preparação da muguesia. Essa substância bioativa foi produzida com sucesso e com estereosseletividade satisfatória.

Cabe salientar que a otimização das condições reacionais é fundamental nas reações catalisadas por células íntegras de micro-organismos, já que foram observadas variações significativas nos rendimentos e estereosseletividades em condições distintas.

Em uma visão geral, os resultados são bastante promissores e indicam que essa levedura é capaz de atuar seletivamente em reações de redução. Observou-se que embora houvesse dois grupamentos funcionais susceptíveis à catálise enzimática, a biorredução da ligação C=C foi predominante em relação à C=O, o que demonstra a alta quimiosseletividade do processo.

Diante do exposto, concluiu-se que devido às condições reacionais desenvolvidas usando LSC-II, água e resina XAD-7 na primeira etapa, foi possível a síntese dos isômeros desejáveis da fragrância muguesia. Tal fato confirma o grande potencial da metodologia para a preparação enantiosseletiva de substâncias bioativas de interesse sintético.

5. Referências Bibliográficas

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, A.; BRENNAN, E.; FUGANTI, C.; GATTI, F. G.; GIOVENZANA, T.; MALPEZZI, L.; SERRA, S. Chirality and Fragrance Chemistry: Stereoisomers of the Commercial Chiral Odorants Muguesia and Pamplefleure. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 1281-1290, 2005.

ALEDO, J. C.; LOBO, L.; VALLE, A. E. Energy diagrams for enzyme-catalyzed reactions. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 31, n. 4, p. 234-236, 2003.

ANDERSON, B. A.; HANSEN, M. M.; HARKNESS, A. R.; HENRY, C. L.; VICENZI, J. T.; ZMIJEWSKI, M. J. Application of a Practical Biocatalytic Reduction to an Enantioselective Synthesis of the 5*H*-2,3-Benzodiazepine LY300164. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 49, p. 12358-12359, 1995.

ANDERSSON, K.; LEVIN, J.-O.; NILSSON C.-A. Sampling of polychlorinated aromatics in workroom air using amberlite XAD-2 resin. **Chemosphere**, v. 10, n. 2, p. 137-142, 1981.

ANDERSSON, K.; LEVIN, J.-O.; LINDAHL, R.; NILSSON C.-A. Sampling of epichlorohydrin and ethylene chlorohydrin in workroom air using Amberlite XAD-7 resin. **Chemosphere**, v. 10, n. 2, p.143-146, 1981.

ANDERSSON, B.; ANDERSSON, K. Use of Amberlite XAD-7 as a concentrator column in the analysis of endogenous plant growth hormones. **Journal of Chromatography A**, v. 242, n. 2, p. 353-358, 1982.

ARRIGO, P. D.; FANTONI, G. P.; SERVI, S.; STRINI, A. The effect of absorbing resins on substrate concentration and enantiomeric excess in yeast reduction. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 8, n. 14, p. 2375-2379, 1997.

ARRIGO, P. D.; FUGANTI, C.; FANTONI, G. P.; SERVI, S. Extractive biocatalysis: a powerful tool in selectivity control in yeast biotransformations. **Tetrahedron**, v. 54, n. 49, p. 15017-15026, 1998.

BACH, J.; , M.; GARCIA, J.; ROMEA, P.; TEY, C.; URPI, F.; VILARRASA, J. Syntheses of the C-1 alkyl side chains of Zaragozaic acids A and C. **Tetrahedron Letters**, v. 39, n. 37, p. 6765-6768, 1998.

BARREIRO, E. J.; FERREIRA, V. F.; COSTA, P. R. R. Substâncias enantiomericamente puras (SEP): a questão dos fármacos quirais. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 647-656, 1997.

BEROVA, N.; BARI, L. D.; PESCIPELLI, G. Application of electronic circular dichroism in configurational and conformational analysis of organic compounds. **Chemical Society Reviews**, v. 36, n. 6, p. 914-931, 2007.

BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; WOODY R.W., **Circular Dichroism Principles and Applications**. New York: John Wiley & Sons, 2.ed., 2000.

BHALERAO, U. T.; CHANDRAPRAKASH Y.; BABU, R. L.; FADNAVIS, N.W. β -Ketoester reduction by baker's yeast immobilized in calcium alginate: an examination of ph effects on enantiospecificity. **Synthetic Communications**, v. 23, n. 9, p. 1201-1208, 1993.

BLASER, H. U.; SPINDLER, F.; STUDER, M. Enantioselective catalysis in fine chemicals production. **Applied Catalysis A: General**, v. 221, n. 1-2, p. 119-143, 2001.

BLASER, H. U.; PUGIN, B.; SPINDLER, F. Progress in enantioselective catalysis assessed from an industrial point of view. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 231, n. 1-2, p. 1-20, 2005.

BRENNA, E.; FUGANTI, C.; GATTI, F. G.; SERRA, S. Biocatalytic methods for the synthesis of enantioenriched odor active compounds. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 7, p. 4036-4072, 2011.

BRENNA, E.; GATTI, F. G.; MONTI, D.; PARMEGGIANI, F.; SACCHETTI, A. Cascade coupling of ene reductases with alcohol dehydrogenases: enantioselective reduction of prochiral unsaturated aldehydes. **ChemCatChem**, v. 4, n. 5, p. 653-659, 2012.

BRENNA, E.; COSI, S. L.; FERRANDI, E. E.; GATTI, F. G.; MONTI, D.; PARMEGGIANI, F.; SACCHETTI, A. Substrate scope and synthetic applications of the enantioselective reduction of α -alkyl- β -arylenones mediated by Old Yellow Enzymes. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, n. 18, p. 2988-2996, 2013.

BRENNA, E.; CROTTI, M.; GATTI, F. G.; MONTI, D.; PARMEGGIANI, F.; PUGLIESE, A.; SANTANGELO, S. Multi-enzyme cascade synthesis of the most odorous stereoisomers of the commercial odorant Muguesia[®]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.10.006>.

BRONSON, J.; BLACK, A.; DHAR, T. G. M.; ELLSWORTH, B. A.; MERRITT, J. R. To Market, To Market—2012. **Annual Report in Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 471-546, 2013.

CALDWELL, J. Stereochemical determinants of the nature and consequences of drug metabolism. **Journal of Chromatography A**, v. 694, n. 1, p. 39-48, 1995.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**, Porto Alegre: Artmed, 3. ed., 2000.

CARBALLEIRA, J. D.; QUEZADA, M. A.; HOYOS, P.; SIMEÓ, Y.; HERNAIZ, M. J.; ALCANTARA, A. R.; SINISTERRA, J. V. Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 686-714, 2009.

CHAVES, M. R. B.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R. Regio- and enantioselective bioreduction of methyleneketoesters using both polymeric resin and cellulose matrix. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 98, p. 73-77, 2013.

CHU, Y.; ZHANG B. L.; SILVESTRE, V.; CHENG, J. P. Hydrogen transfer pathways of the asymmetric reduction of α,β -unsaturated ketone mediated by baker's yeast. **Bioorganic Chemistry**, v. 34, n. 3, p. 158–166, 2006.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**, New York: Oxford University Press, 2.ed., 2012.

CLOSOSKI, G. C.; MILAGRE, C.D.F.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. Regio- and enantioselective of methyleneketoesters mediated by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 48, n. 3-4, p. 70-76, 2007.

COELHO, F. A. S. Fármacos e quiralidade. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 3, p. 23-32, 2001.

COLOMBO, M.; AMICI, M.; MICHELI, C.; PITRÉ, D.; CARREA, G.; RIVA, S. Chemoenzymatic synthesis of the enantiomers of iopanoic acid. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 2, n. 10, p. 1021-1030, 1991.

CONCEIÇÃO, G. J. A.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R. Regio- and enantioselective reduction of a α -methylene ketone by *Rhodotorula glutinis*. **Archive for Organic Chemistry**, v. x, n. 10, p. 500-506, 2003a.

CONCEIÇÃO, G. J. A.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R. Highly efficient extractive biocatalysis in the asymmetric reduction of an acyclic enone by the yeast *Pichia stipitis*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, n. 1, p. 43-45, 2003b.

CONSTANTINO, M. G. **Química Orgânica curso básico universitário**, Rio de Janeiro: LTC, v. 2, 2012.

CONTI, R.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. Biocatálise: avanços recentes. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 672-675, 2001.

CRABBÉ, P. **ORD and CD in chemistry and biochemistry: an introduction**, London: Academic Press Inc, 1972.

CROSBY, J. Synthesis of optically active compounds: a large scale perspective. **Tetrahedron**, v. 47, n. 27, p. 4789-4846, 1991.

DABROWSKI, A. Adsorption - from theory to practice. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 93, n. 1-3, p. 135-224, 2001.

DUNN, P. J. The importance of green chemistry in process research and development. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 4, p. 1452-1461, 2012.

EICHELBAUM, M.; GROSS, A. S. Stereochemical aspects of drug action and disposition. **Advances in drug research**, v. 28, p. 1-64, 1996.

FABER, K. **Biotransformation in Organic Chemistry**, Berlin: Springer-Verlag, 6.ed., 2011.

FADNAVIS, N. W.; VADIVEL, S. K.; BHALERAO, U. T. Biotransformations with baker's yeast: pH effects on diastereoselectivity during α -hydroxy- β -ketoester reductions and carbon-carbon bond cleavages. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 8, n. 14, p. 2355-2359, 1997.

FILHO, E. P. S.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. Baker's yeast reduction of α -methyleneketones. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 12, n. 6, p. 847-852, 2001.

GORTHEY, L. A.; VAIRAMANI, M.; DJERASSI, C. Optical rotatory dispersion studies. 137. Synthesis and chiroptical properties of α - and β -deuterium substituted aliphatic aldehydes and ketones. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 1511-1517, 1984.

HALL, M.; HAUER, B.; STUERMER, R.; KROUTIL, W.; FABER, K. Asymmetric whole-cell bioreduction of α,β -unsaturated aldehyde (citral): competing *prim*-alcohol dehydrogenase and C-C lyase activities. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 17, n. 21, p. 3058-3062, 2006.

HALL, M.; BOMMARIUS, A. S. Enantioenriched compounds via enzyme-catalyzed redox reactions. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 7, p. 4088-4110, 2011.

HANSCH, C.; LEO, A.; HOEKMAN, D. **Exploring QSAR: Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants**, Washington D.C.: ACS Professional Reference Book, 1995.

HAWKINS, J. M.; WATSON, T. J. N. Asymmetric Catalysis in the Pharmaceutical Industry. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 43, n. 25, p. 3224-3228, 2004.

HOLLMANN, F.; ARENDS, I. W. C. E.; HOLTSMANN, D. Enzymatic reductions for the chemist. **Green Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 2285-2314, 2011.

HOUNG, J.-Y., HSU, H.-F., LIU, Y.-H., WU, J.-Y. Applying the Taguchi robust design to the optimization of the asymmetric reduction of ethyl 4-chloro acetoacetate by baker's yeast. **Journal of Biotechnology**, v. 100, n. 3, p. 239-250, 2003.

HUANG, Y.; ZHANG, F.; GONG, Y. A convenient approach to (S)-2-ethylhexan-1-ol mediated by baker's yeast. **Tetrahedron Letters**, v. 46, n. 42, p. 7217-7219, 2005.

HUBBARD, K. L.; FINCH, J. A.; DARLING, G. D. Polymers with pendant vinyl groups, including poly (divinylbenzene-co-ethylvinylbenzene). **Reactive & Functional Polymers**, v. 36, n. 1, p. 1-16, 1998.

IBRAHIM, G.; ANDRYAUSKAS, S.; BASTOS, M. L. Application of amberlite XAD-2 resin for general toxicological analysis. **Journal of Chromatography**, v. 108, n. 1, p. 107-116, 1975.

ISHIGE, T.; HONDA, K.; SHIMIZU, S. Whole organism biocatalysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, n. 2, p. 174-180, 2005.

JUNK, G. A.; RICHARD, J. J.; GRIESER, M. D.; WITIAK, D.; WITIAK, J. L.; ARGUELLO, M. D.; VICK, R.; SVEC, H. J.; FRITZ, J. S.; CALDER, G. V. Use of macroreticular resins in the analysis of water for trace organic contaminants. **Journal of Chromatography A**, v. 99, p. 745-762, 1974.

KAWAI, Y.; SAITOU, K.; HIDA, K.; OHNO, A. Asymmetric reduction of α,β -unsaturated ketones with baker's yeast. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 6, n. 9, p. 2143-2144, 1995.

KAWAI, Y.; SAITOU, K.; HIDA, K.; DAO, D. H.; OHNO, A. Stereochemical control in microbial reduction. XVIII. asymmetric reduction of α,β -unsaturated ketones with baker's yeast. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 69, n. 9, p. 2633-2638, 1996.

KAWAI, Y.; HAYASHI, M.; INABA, Y.; SAITOU, K.; OHNO, A. Asymmetric reduction of α,β -unsaturated ketones with a carbon-carbon double-bond reductase from baker's yeast. **Tetrahedron Letters**, v. 39, n. 19, p. 5225-5228, 1998.

KAWAI, Y.; HAYASHI, M.; TOKITOH, N. Asymmetric synthesis of α -chiral ketones by the reduction of enones with baker's yeast. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 12, n. 21, p. 3007-3013, 2001.

KAWAI, Y.; INABA, Y.; HAYASHI, M.; TOKITOH, N. Asymmetric synthesis of a nitroalkane by the use of novel nitroalkene reductases from baker's yeast. **Tetrahedron Letters**, v. 42, n. 19, p. 3367-3368, 2001.

KERGOMARD, A.; RENARD, M. F.; VESCHAMBRE, H. Microbiological reduction of α,β -unsaturated ketones by *Beauveria sulfurescens*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 47, n. 5, p. 792-798, 1982.

KHMELNITSKY, Y. L.; MOZHAEV, V. V.; BELOVA, A. B.; SERGEEVA, M. V.; MARTINEK, K. Denaturation capacity: a new quantitative criterion for selection of organic solvents as reaction media in biocatalysis. **European Journal of Biochemistry**, v. 198, n. 1, p. 31-41, 1991.

KUNIN, R.; MEITZSER, E.; BORTNICK, N. Macroreticular ion exchange resins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 84, n. 2, p. 305-306, 1962.

LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for the optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 1, p. 81-87, 1987.

LANG, E. S.; COMASSETO, J. V. Catálise por transferência de fase. **Química Nova**, v. 11, n. 2, p. 238-257, 1988.

LEÓN, R.; FERNANDES, P.; PINHEIRO, H. M.; CABRAL, J. M. S. Whole-cell biocatalysis in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 7-8, p. 483-500, 1998.

LI, J.-Q.; QUAN, X.; ANDERSSON, P. G. Highly enantioselective iridium-catalyzed hydrogenation of α,β -unsaturated esters. **Chemistry - A European Journal**, v. 18, n. 34, p. 10609-10616, 2012.

LI, Y.-N.; SHI, X.-A.; ZONG, M.-H.; MENG, C.; DONG, Y.-Q.; GUO, Y.-H. Asymmetric reduction of 2-octanone in water/organic solvent biphasic system with baker's yeast FD-12. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1305-1311, 2007.

LIMA, V. L. E. Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 657-663, 1997

LIN, G.-Q.; YOU, Q.-D.; CHENG, J.-F. **Chiral Drugs: Chemistry and Biological Action**, New Jersey: John Wiley & Sons, 1.ed, 2011.

LIU, W.; GAN, J.; SCHLENK, D.; JURY, W. A. Enantioselectivity in environmental safety of current chiral insecticides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 3, 701-706, 2005.

LOHRAY, B. B. Asymmetric catalysis – A novel chemistry to win the Nobel Prize – 2001. **Current Science**, v. 81, n. 12, 1519-1525, 2001.

LOU, W.-Y.; ZONG, M.-H.; ZHANG, Y.-Y.; WU, H. Efficient synthesis of optically active organosilyl alcohol via asymmetric reduction of acyl silane with immobilized yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 190-196, 2004.

LU, S. M.; BOLM, C. Highly Enantioselective Synthesis of Optically Active Ketones by Iridium-Catalyzed Asymmetric Hydrogenation, **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 47, n. 46, p. 8920-8923, 2008.

LUCCHESI, A. M.; MARZORATI L. Catálise de transferência de fase. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 641-652, 2000.

LUO, F.; WANG, P.; GONG, Y. Highly enantioselective bioreduction of 2-fluorocinnamyl alcohols mediated by *Saccharomyces cerevisiae*. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 13, p. 1693-1695, 2010.

MANNSCHRECK, A.; KIESSWETTER, R. Unequal Activities of Enantiomers via Biological Receptors: Examples of Chiral Drug, Pesticide, and Fragrance Molecules. **Journal of Chemical Education**, v. 84, n. 12, p. 2012-2018, 2007.

MATSUDA, T.; YAMANAKA, R.; NAKAMURA, K. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction, **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, n. 5, p.513-557, 2009.

MAURER, F.; HUCH, V.; ULLRICH, A.; KAZMAIER, U. Development of catalysts for the stereoselective hydrogenation of α,β -unsaturated ketones. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 77, n. 11, p. 5139-5143, 2012.

MILAGRE, C. D. F.; MILAGRE, H. M. S.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R. Screening and reaction for the bioreduction of ethyl benzoylacetate and its analogue **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 1, p. 55-60, 2009.

MISLOW, K.; GLASS, M. A. W.; MOSCOWITZ, A.; DJERASSI, C.; Generalization of octant rule. **Journal of the American Chemical Society**, v. 83, n. 12, p. 2771-2772, 1961.

MOFFITT, W.; WOODWARD, R. B.; MOSCOWITZ, A.; KLYNE, W.; DJERASSI, C. Structure and optical rotatory dispersion of saturated ketones. **Journal of the American Chemical Society**, v. 83, n. 19, p. 4013-4018, 1961.

MONTI, D.; OTTOLINA, G.; GIACOMO, C.; RIVA, S. Redox Reactions Catalyzed by Isolated Enzymes. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 7, p. 4111-4140, 2011.

MORI, K.; MASUDA S.; SUGURO, T. Stereocontrolled synthesis of all of the possible stereoisomers of 3,1 l-dimethylnonacosan-2-one and 29-hydroxy-3,1 l-dimethylnonacosan-2-one. **Tetrahedron**, v. 37, n. 7, p. 1329-1340, 1981.

MULLER, A.; HAUER, B.; ROSCHE, B. Enzymatic reduction of the α,β -unsaturated carbon bond in citral. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 38, n. 3-6, p.126-130, 2006.

MURAKAMI, H. From Racemates to Single Enantiomers – Chiral Synthetic Drugs over the last 20 Years. **Topics in Current Chemistry**, v. 269, p. 273-299, 2007.

NAKAMURA, K.; KAWAI, Y.; NAKAJIMA, N.; OHNO, A. Stereochemical control of microbial reduction. 17. A method for controlling the enantioselectivity of reductions with bakers' yeast. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 56, n. 15, p. 4778-4783, 1991.

NAKAMURA, K.; KONDO, S.; NAKAJIMA, N.; OHNO, A. Mechanistic study for stereochemical control of microbial reduction of α -keto esters in an organic solvent. **Tetrahedron**, v. 51, n. 3, p. 687-694, 1995.

NAKAMURA, K.; FUJII, M.; IDA, Y. Asymmetric reduction of ketones by *Geotrichum candidum* in the presence of Amberlite™ XAD, a solid organic solvent. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**, v. 1, n. 19, p. 3205-3211, 2000.

NAKAMURA, K.; TAKENAKA, K.; FUJII, M.; IDA, Y. Asymmetric synthesis of both enantiomers of secondary alcohols by reduction with a single microbe. **Tetrahedron Letters**, v. 43, n. 20, p. 3629-3631, 2002.

NAKAMURA, K.; YAMANAKA, R.; MATSUDA, T.; HARADA, T. Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, n. 18, p. 2659-2681, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, Porto Alegre, Artmed, 2011.

NGUYEN, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Chiral Drugs: An Overview. **International Journal of Biomedical Science**, v. 2, n. 2, p. 85-100, 2006.

NOYORI, R. Asymmetric Catalysis: Science and Opportunities (Nobel Lecture 2001). **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 345, n. 1-2, p.15-32, 2003.

OGSTON, A. G. Interpretation of experiments on metabolic processes, using isotopic tracer elements. **Nature**, v. 162, n. 4129, p. 963, 1948.

PANKE, S.; HELD, M.; WUBBOLTS, M. Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n.4, p. 272–279, 2004.

PATEL, R. N. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 252, n. 5-7, p. 659-701, 2008.

PAULA, B. R. S.; ZAMPIERI, D. S.; RODRIGUES, J. A. R. MORAN, P. J. S. Enantiodivergence in the reduction of α -methyl an α -halomethyl enones by microorganisms. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 24, n. 17, 973-981, 2013.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S., VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**, São Paulo: Cengage Learning, 4. ed., 2010.

PEREIRA, R. S. Fermento biológico de padaria (*Saccharomyces cerevisiae*) e seu uso em síntese assimétricas. **Química Nova**, v. 18, n. 5, p. 452-459, 1995a.

PEREIRA, R. S. Baker's yeast: some biochemical aspects and their influence in biotransformations. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, n.2, p.123-132, 1995b.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. ; PERRIN, D. R. **Purification of Laboratory Chemicals**, Oxford: Pergamon Press, 2.ed., 1980.

PINHEIRO, S.; FERREIRA, V. F. Abordagens em síntese assimétrica. **Química Nova**, v. 21, n. 3, p. 312-318, 1998.

POLLARD, D. J.; WOODLEY, J. M. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 66-73, 2007.

RILEY, R.G.; SILVERSTEIN, R. M.; MOSER, J. C. Biological response of *Atta texana* to its alarm pheromone and the enantiomer of the pheromone. **Science**, v. 183, n. 4126, p. 760-762, 1974.

ROBERTS, S. M. Biocatalysts in synthetic organic chemistry. **Tetrahedron**, v. 60, n. 3, p. 499-500, 2004.

RODRIGUES, J. A. R. MORAN, P. J. S. Reduções enantiosseletivas de cetonas utilizando-se fermento de pão. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 893-897, 2001.

RODRIGUES, J. A. R. MORAN, P. J. S.; CONCEIÇÃO, G. J. A.; FARDELONE, L. C. Recent advances in the biocatalytic asymmetric reduction of acetophenones and α,β -unsaturated carbonyl compounds. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 295-303, 2004.

ROFFLER, S. R.; BLANCH, H. W. ; WILKE, C. R. In situ recovery of fermentation products. **Trends in Biotechnology**, v. 2, n. 5, p. 129-136, 1984.

ROZZEL, J. D. Commercial scale biocatalysis: myths and realities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 11, p. 2253-2261, 1999.

ROHM AND HASS, **Amberlite™ XAD7HP Industrial Grade Polymeric Adsorbent**, Material Safety Data Sheets, 2003. Disponível em <http://www.dow.com/assets/attachments/business/process_chemicals/amberlite_xad/amberlite_xad7_hp/tds/amberlite_xad7hp.pdf>. Acesso em : 27 de março de 2015.

SAKAI, T.; MATSUMOTO, S.; HIDAKA, S.; IMAJO, N.; TSUBOI, S.; UTAKA, M. Asymmetric reduction of carbon-carbon double bonds of conjugated enones with fermenting bakers' yeast. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 64, n. 11, p. 3473-3475, 1991.

SANTANIELLO, E.; FERRABOSCHI, P.; GRISENTI, P.; MANZOCCHI, A. The biocatalytic approach to the preparation of enantiomerically pure chiral building blocks. **Chemical Reviews**, v. 92, n. 5, p. 1071-1140, 1992.

SCHAEFER, C. A.; SILVA, V.D.; STAMBUK, B. U.; NASCIMENTO, M. G. Use of *Saccharomyces cerevisiae* yeast in the chemoselective bioreduction of (1E, 4E)1,5-bis(4-methoxyphenyl)-1,4-pentadien-3-one in biphasic system. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 7, p. 1116-1122, 2013.

SCHMID, A.; DORDICK, J. S.; HAUER, B.; KIENER, A.; WUBBOLTS, M.; WITHOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature**, v. 409, p. 258-268, 2001.

SCHOEMAKER, H. E.; BOESTEN, W. H.J.; BROXTERMAN Q. B.; ROOS, E. C.; KAPTEIN B.; TWEEL, W. J. J.; KAMPHUIS, J.; MEIJER, E. M.; RUTJES, F. P. J. T. Application of Enzymes in Industrial Organic Synthesis. **Chimia**, v. 51, n. 6, p. 308-310, 1997.

SERRA, S.; FUGANTI, C.; BRENNA, E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 4, 194-198, 2005.

SERVI, S. Baker's yeast as a reagent in organic synthesis. **Synthesis**, v. 1, p. 1-25, 1990.

SHELDON, R. A.; PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 2013.

SHIEH, W.; GOPALAN, A. S.; SIH, C. J. Stereochemical control of yeast reductions. 5. characterization of the oxidoreductases involved in the reduction of beta-keto esters, **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 10, p. 2993-2994, 1985.

SHIMODA, K.; KUBOTA, N.; HAMADA, H. Asymmetric reduction of α,β -unsaturated carbonyl compounds with reductases from *Nicotiana tabacum*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.15, n. 15, p. 2443–2446, 2004.

SHIN, Y.; FOURNIER, J.-H., BRUCKNER, A.; MADIRAJU, C.; BALACHANDRAN, R.; RACCOR, B. S.; EDLER, M. C.; HAMEL, E.; SIKORSKI, R. P.; VOGT, A.; DAY, B. W.; CURRAN, D. P. Synthesis and biological evaluation of (–)-dictyostatin and stereoisomers. **Tetrahedron**, v. 63, n. 35, p. 8537–8562, 2007.

SIGMA ALDRICH, **Product information sheet Amberlite®XAD7HP**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/xad7?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 27 de março de 2015.

SIKKEMA, J.; WEBER, F. J.; HEIPIEPER, H. J.; BONT, J. A. M. Cellular toxicity of lipophilic compounds: mechanisms, implications, and adaptations. **Biocatalysis**, v. 10, n. 1-4, p. 113-122, 1994.

SILVA, V. D.; STAMBUK, B. U.; NASCIMENTO, M. G. Efficient chemoselective biohydrogenation of 1,3-diaryl-2-propen-1-ones catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* yeasts in biphasic system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 63, n. 3-4, p. 157-163, 2010.

SILVA, V. D.; STAMBUK, B. U.; NASCIMENTO, M. G. Asymmetric reduction of (4R)-(-)-carvone catalyzed by baker's yeast in aqueous mono- and biphasic systems. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 77, p. 98-104, 2012.

SILVERMAN, R. B. **The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action**, San Diego: Academic Press, 1992.

SILVERMAN, R. B. **The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions**, San Diego: Academic Press, 2. ed., 2002.

SIMPSON, H. D.; ALPHAND, V.; FURSTOSS, R. Microbiological transformations 49. Asymmetric biocatalysed Bayer-Villiger oxidation: improvement using a recombinant *Escherichia coli* whole cell biocatalyst in the presence of an adsorbent resin. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, n.2, p. 101-108, 2001.

SINHA, S. C.; KEINAN, E., Catalytic Antibodies in Organic Synthesis. Asymmetric Synthesis of (-)- α -Multistriatin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 12, p. 3653-3654, 1995.

SMITH, A. B.; FREEZE, S. (+)-Discodermolide: total synthesis, construction of novel analogues, and biological evaluation. **Tetrahedron**, v. 64, n. 2, p. 261-298, 2008.

SMITH, S. W. Chiral Toxicology: It's the Same Thing...Only Different. **Toxicological Science**, v. 110, n.1, p. 4-30, 2009.

SOLANO, D. M.; HOYOS, P.; HERNÁIZ, M. J.; ALCÁNTARA, A. R.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 196-207, 2012.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**, Rio de Janeiro: LTC, v. 1,7.ed., 2001.

STRAATHOF, A. J. J.; PANKE, S.; SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 548-556, 2002.

STUERMER, R.; HAUER, B.; HALL, M.; FABER, K. Asymmetric bioreduction of activated C=C bonds using enoate reductases from the old yellow enzyme family. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.11, n. 2, p. 203–213, 2007.

TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 808-818, 2001.

TOOGOOD, H. S.; GARDINER, J. M.; SCRUTTON, N. S. Biocatalytic reductions and chemical versatility of the old yellow enzyme family of flavoprotein oxidoreductases. **ChemCatChem**, v. 2, n. 8, p. 892–914, 2010.

TOOGOOD, H. S.; SCRUTTON, N. S. New developments in 'ene'-reductase catalysed biological hydrogenations. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 19, p. 107–115, 2014.

TORRELO, G.; HANEFELD, U.; HOLLMAN, F. Biocatalysis. **Catalysis Letters**, v. 145, n. 1, p. 309-345, 2015.

TRIGGLE, D. J. Stereoselectivity of drug action. **Drug Discovery Today**, v. 2, n. 4, 138-147, 1997.

UPPADA, V.; BHADURI, S.; NORONHA, S. B. Cofactor regeneration –an important aspect of biocatalysis. **Current Science**, v. 106, n. 7, p. 946-957, 2014.

van DEURSEN, R.; STAMPFER, W.; EDEGGER, K.; FABER, K.; KROUTIL, W. Chemo- and stereo-selective biocatalytic reduction of, α,β -unsaturated ketones employing a chemo-tolerant ADH from *Rhodococcus ruber* DSM 44541. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 31, n. 4-6, p. 159-163, 2004.

VERMUE, M.; SIKKEMA, J.; VERHEUL, A.; BAKKER, R.; TRAMPER, J. Toxicity of homologous series of organic solvents for the gram-positive bacteria *Arthrobacter* and *Nocardia* Sp. and the gram-negative bacteria *Acinetobacter* and *Pseudomonas* Sp. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, n. 6, p. 747-758, 1993.

VOLPÉ, G.; MALLETT, V. N. Recovery of fenitrothion from water using Amberlite resin XAD-7. **Journal of Chromatography A**, v. 177, n. 2, p. 385-389, 1979.

WACKETT, L. P.; HERSHBERGER, C. D. **Biocatalysis and Biodegradation: Microbial transformation of Organic Compounds**, Washington D. C. : ASM Press, 2001.

WANDREY, C.; LIESE, A.; KIHUMBU, D. Industrial Biocatalysis: Past, Present, and Future, **Organic Process Research & Development**, v. 4, n. 4, p. 286-290, 2000.

WANG, W.; ZONG, M.-H.; LOU, W.-Y. Use of an ionic liquid to improve asymmetric reduction of 4'-methoxyacetophenone catalyzed by immobilized *Rhodotorula* sp. AS2.2241 cells, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 1, p. 70-76, 2009.

WEIJERS, C. A. G. M.; LITJENS, M. J. J.; BONT, J. A. M. Synthesis of optically pure 1,2-epoxypropane by microbial asymmetric reduction of chloroacetone. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 297-300, 1992.

WINKLER, C. K. , TASNÁDI, G., CLAY, D., HALL, M., FABER, K. Asymmetric bioreduction of activated alkenes to industrially relevant optically active compounds. **Journal of Biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 381–389, 2012

WOODLEY, J. M. New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 321-327, 2008.

YAMADA, H.; SHIMIZU, S. Microbial and enzymatic processes for the production of biologically and chemically useful compounds. **Angewandte Chemie-International Edition in English**, v. 27, n. 5, p. 622-642, 1988.

YANG, Z.-H.; YAO, S.-J.; GUAN, Y.-X. A complex process of asymmetric synthesis of β -hydroxy ester by baker's yeast accompanied by resin adsorption. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 44, n. 15, p. 5411-5416, 2005.

ZAGOZDA, M.; PLENKIEWICZ, J. Enantioselective reduction of α,β -unsaturated ketones by *Geotrichum candidum*, *Mortierella isabellina* and *Rhodotorula rubra* yeast. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 17, n. 13, p. 1958–1962, 2006.

ZAKS, A. Industrial biocatalysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 2, p. 130–136, 2001.

ZHANG, M.; MELOUK, H. A.; CHENAULT, K.; RASSI, Z. Determination of cellular carbohydrates in peanut fungal pathogens and baker's yeast by capillary electrophoresis and electrochromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5265–5269, 2001.

ZHANG, B.-L.; PIONNIER, S. Cofactor recycling mechanism in asymmetric biocatalytic reduction of carbonyl compounds mediated by yeast: which is the efficient electron donor? **Chemistry - A European Journal**, v. 9, n. 15, p. 3604-3610, 2003.

ZHENG, G.-W.; XU, J.-H. New opportunities for biocatalysis: driving the synthesis of chiral chemicals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 784–792, 2011.