Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

**Hidrólise enzimática de nitrilas pelo
fungo de origem marinha *Aspergillus
sydowii* CBMAI 934**

Julieta Rangel de Oliveira

SÃO CARLOS
2012

Julieta Rangel de Oliveira

Hidrólise enzimática de nitrilas pelo fungo de origem marinha *Aspergillus sydowii* CBMAI 934

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

SÃO CARLOS

2012

À Deus por fazer transformações em minha vida.

Aos meus pais, Maria Marizete e Luiz Roberto e ao meu irmão, Luzardo pelo amor transmitido.

“Há duas fontes perenes de alegria pura: o bem realizado e o dever cumprido.”

E. Girão

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento incondicional a Deus, pelo dom da vida, por direcionar o caminho que nela devo percorrer e pelas imensas oportunidades surgidas na minha jornada. Agradeço a Deus pela força que recebi para não desistir nos momentos de dificuldades surgidas ao longo desta caminhada.

Aos meus pais, pela educação que me deram e por estarem sempre comigo, apoiando-me e transmitindo muito amor.

Ao meu irmão Luzardo, por sempre estar aconselhando-me, apoiando-me e transmitindo-me muita confiança.

Ao meu orientador Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto, pela oportunidade de trabalho, confiança e orientação.

Ao Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck (IQSC) por ter cedido os micro-organismos utilizados neste trabalho.

A Profa. Dra. Mirna H. R. Seleglim da UFSCar por ceder o espaço de seu laboratório para realizar um treinamento com manuseio de micro-organismos e a técnica Darci C. D. Javarotti pela dedicação em ensinar-me as técnicas de como trabalhar com micro-organismos.

A Profa. Dra. Fernanda Canduri (IQSC) e a Prof. Dra. Cíntia D. L. Milagre (IQ-UNESP) pelas contribuições e discussões no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Emanuel Carrilho por ter cedido seu laboratório para eu realizar as análises de eletroforese capilar.

Aos técnicos dos aparelhos de Infravermelho (André Luiz-IQSC), Ressonância Magnética Nuclear (Silvana -IQSC), como também a Luciana Vizotto do Laboratório de RMN (UFSCar) pela obtenção dos espectros. Em particular ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira (Giba) pela oportunidade de obter os espectros de RMN.

Aos técnicos do Laboratório de Química Orgânica e Biocatálise, Marília Peret e João Pedro, pela assistência ao laboratório sempre que possível.

Aos companheiros de laboratório Ana Maria, Alex, Irlon, Lenilson, Mariana, Natália, Sandra e Yara pela amizade, pelo compartilhamento de experiências, pelos vários momentos de descontrações.

As amigas que conquistei durante o período de doutorado, que passaram a fazer parte da minha vida sempre transmitindo energia positiva, oferecendo sempre um ombro amigo; Raquel, Kelly e Fayene.

Ao amigo Isac, pelas diversas vezes que me ajudou quando sempre gritava “ajuda eu”!

Ao amigo Rommel, que foi um dos grandes incentivadores para eu vim fazer o doutorado em São Carlos.

As minhas amigas conterrâneas Janete e Joseane que mesmo distante sempre estiveram ao meu lado apoiando-me.

As secretárias do curso de Pós-Graduação do IQSC, Maria Silvia de Guzzi Plepis e Andréia Cristina Cardozo de Moraes que sempre me trataram com solicitude e gentileza.

A Cidinha do Laboratório de Ensino pelos empréstimos de alguns reagentes quando necessário.

À FAPESP pelo apoio financeiro recebido através da bolsa de doutorado (Processo: 08/56371-9) e de projetos de auxílio à pesquisa.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

No presente estudo, uma triagem foi realizada com 12 fungos marinhos *Penicillium miczynskii* CBMAI 930, *Penicillium raistricki* CBMAI 931, *Aspergillus sydowii* CBMAI 933, *Aspergillus sydowii* CBMAI 934, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Bionectria* sp. CBMAI 936, *Penicillium oxalicum* CBMAI 1185, *Penicillium citrinum* CBMAI 1186, *Penicillium decaturense* CBMAI 1234, *Penicillium raistricki* CBMAI 1235, *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 e *Aspergillus sydowii* CBMAI 1241 para avaliar o potencial enzimático destes micro-organismos frente à fenilacetoneitrila **1**. Estes micro-organismos foram isolados de esponjas e alga coletadas do litoral norte do estado de São Paulo. A triagem foi realizada em meio sólido mineral suplementado com glicose e fenilacetoneitrila **1** como única fonte de nitrogênio. Dentre os fungos, 8 adaptaram-se muito bem ao substrato **1** nas respectivas quantidades 5 µL (0,04 mmol), 10 µL (0,08 mmol) e 15 µL (0,12 mmol). Em seguida, a triagem foi realizada em meio líquido (20 µL (0,17 mmol), 40 µL (0,35 mmol) e 60 µL (0,50 mmol) de fenilacetoneitrila **1** e obteve um bom crescimento de massa micelial dos fungos. Experimentos realizados na ausência de fenilacetoneitrila **1**, tanto em meio sólido, quanto em meio líquido, não promoveram o crescimento microbiano, evidenciando que as enzimas capazes de hidrolisarem nitrilas presente no sistema catalítico são construtivas. A fenilacetoneitrila **1** foi biotransformada ao ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b** (51% pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934) por todos os fungos adaptados. Devido ao bom crescimento do fungo *A. sydowii* CBMAI 934 em meio mineral sólido e líquido na presença de fenilacetoneitrila **1**, este fungo foi selecionado para promover reações de hidrólise frente a diferentes organonitrilas, arilcetoneitrilas: 4-fluorofenilacetoneitrila **2**, 4-clorofenilacetoneitrila **3**, 4-metoxifenilacetoneitrila **4**, 2-metilfenilacetoneitrila **5**, 3-metilfenilacetoneitrila **6**, 4-metilfenilacetoneitrila **7** aos seus correspondentes ácidos carboxílicos 4-fluorofenilacético **2a** (51%), 4-clorofenilacético **3a** (55%), 4-metoxifenilacético **4a** (43%), 2-metilfenilacético **5a** (76%), 3-metilfenilacético **6a** (52%) e 4-metilfenilacético **7a** (46%), em nitrila alifática, 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetoneitrila **8** ao ácido 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acético **8a** (28%) e nitrila hetero-aromática, 2-cianopiridina **19** a 2-piridinamida **19a**. As reações foram acompanhadas por GC-FID e os produtos de biotransformações foram isolados e caracterizados por GC-MS, HRMS, RMN de ¹H e de ¹³C. Este trabalho envolveu o primeiro estudo frente à biotransformação de nitrilas por micro-organismos de origem marinha.

ABSTRACT

In the present study, a screening of 12 marine fungi *Penicillium miczynskii* CBMAI 930, *Penicillium raistrickii* CBMAI 931, *Aspergillus sydowii* CBMAI 933, *Aspergillus sydowii* CBMAI 934, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Bionectria* sp. CBMAI 936, *Penicillium oxalicum* CBMAI 1185, *Penicillium citrinum* CBMAI 1186, *Penicillium decaturense* CBMAI 1234, *Penicillium raistrickii* CBMAI 1235, *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 and *Aspergillus sydowii* CBMAI 1241 was done in order to evaluate the enzymatic potential of these microorganisms in phenylacetonitrile **1**. These microorganisms were isolated from sponges and algae collected at the north shore of Sao Paulo State. The screening was carried out in solid mineral medium supplemented with glucose and phenylacetonitrile **1** as the only source of nitrogen. Among the fungi, 8 adapted to the substrate really well 5 μ L (0,04 mmol), 10 μ L (0,09 mmol) and 15 μ L (0,13 mmol). Afterwards, a screening was carried out in liquid medium 20 μ L (0,17 mmol), 40 μ L (0,35 mmol) and 60 μ L (0,50 mmol) of phenylacetonitrile **1**) and a great mass of the fungi was obtained. The phenylacetonitrile **1** was biotransformed in the acid 2-(2-hydroxyphenyl)acetic **1b** (51% by the fungus *A. sydowii* CBMAI 934) by all the adapted fungi. Experiments carried out without phenylacetonitrile **1**, both in solid and liquid media did not show microbial growth. Enzymes which hydrolyzed nitriles present in the catalytic system were constructive. Due to the good growth rate of the fungus *A. sydowii* CBMAI 934 in solid and liquid mineral media in presence of phenylacetonitrile **1**, this fungus was selected to promote hydrolysis reactions in different organonitriles, arylacetonitriles: 4-fluorophenylacetonitrile **2**, 4-chlorophenylacetonitrile **3**, 4-methoxyphenylacetonitrile **4**, 2-methylphenylacetonitrile **5**, 3-methylphenylacetonitrile **6**, 4-methylphenylacetonitrile **7** in their corresponding carboxylic acids 4-fluorophenylacetic **2a** (51%), 4-chlorophenylacetic **3a** (55%), 4-methoxyphenylacetic **4a** (43%), 2-methylphenylacetic **5a** (76%), 3-methylphenylacetic **6a** (52%) and 4-methylphenylacetic **7a** (46%), aliphatic nitrile 2-(1-cyclohexen-1-yl)acetonitrile **8** to 2-(1-cyclohexen-1-yl)acetic acid **8a** (28%) and heteroaromatic nitrile 2-cyanopyridine **19** to 2-pyridinecarboxamides **19a**. The reactions were monitored by GC-FID and the biotransformation products were isolated and characterized by GC-MS, HRMS and ^1H and ^{13}C NMR. This work involved the first study on the biotransformation of nitriles by marine microorganisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - (a) Estruturas de ressonância da ligação peptídica. (b) Representação da formação de uma ligação peptídica.....	2
Figura 2 - Estruturas de nitrilas que ocorrem naturalmente em diferentes organismos vivos.....	7
Figura 3 - Estruturas da linamarina e a lotaustralina.	8
Figura 4 - Nitrila como intermediária na síntese de diferentes compostos orgânicos.	9
Figura 5 - Hidrólise enzimática de nitrilas.....	10
Figura 6 - Etapas de reação de hidrólise de nitrilas por nitrilase.	11
Figura 7 - Estruturas de compostos naturais contendo o grupo ciano.....	13
Figura 8 - Mecanismo proposto para reação de hidrólise de nitrila catalisada por NHase.....	16
Figura 9 - Mecanismo sugerido para reação catalisada por amidase.....	19
Figura 10 - Exemplos de herbicidas contendo o grupo ciano.....	28
Figura 11 - Estruturas dos compostos presentes em efluentes industriais a partir da acrilonitrila. ..	29
Figura 12 - Classes de nitrilas selecionadas para serem biotransformadas pelo fungo de ambiente marinho <i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 934.....	32
Figura 13 - Colônias dos fungos <i>A. sydowii</i> CBMAI 934 (a), <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 (b), <i>Bionectria</i> sp. CBMAI 936 (c), <i>A. sydowii</i> CBMAI 1241 (d), <i>P. raistriicki</i> CBMAI 1235 (e), <i>P. decaturense</i> CBMAI 1234 (f) e <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237 (g) cultivados em malte 2%, 8 dias, 32°C.	40
Figura 14 - Fluxograma ilustrativo do experimento 2 da biotransformação da 2-(1-ciclohexen-1-il)acetonitrila 8 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	48
Figura 15 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da triagem em meio líquido de malte 2% empregando a fenilacetonitrila 1 e os fungos marinhos.....	56
Figura 16 - Crescimento do fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934 em meio sólido em diferentes quantidades de fenilacetonitrila 1 (5, 10, 15 e 20 µL/placa) e na ausência de fenilacetonitrila 1 (controle).....	58
Figura 17 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da triagem com fungos marinhos com 60 µL de fenilacetonitrila 1	61
Figura 18 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da fenilacetonitrila 1	63
Figura 19 - Cromatograma obtido por GC-MS do produto biotransformado da fenilacetonitrila 1 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	64
Figura 20 - Espectro de massas (70 eV) da 1c pela ciclização térmica do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético 1b	64

Figura 21 - Espectro de massas (70 eV) do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético 1b	64
Figura 22 - Cromatograma obtido por GC-MS do padrão 2-coumaranona 1c	65
Figura 23 - Espectro de massas (70 eV) do padrão 2-coumaranona 1c	65
Figura 24 - Espectro de HRMS $[M-H]^{-1}$ do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético 1b obtido pela biotransformação da fenilacetoneitrila 1 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	65
Figura 25 - Espectro de HRMS do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético 1b obtido pela biotransformação da fenilacetoneitrila 1 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	66
Figura 26 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr, cm^{-1}) para o ácido 2-(2-hidroxifenil)acético 1b	70
Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H [(200 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)] do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético 1b obtido da biotransformação da fenilacetoneitrila 1 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	70
Figura 28 - Espectro de RMN de ^{13}C [50 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)] do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético 1b obtido da biotransformação da fenilacetoneitrila 1 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	71
Figura 29 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 4-fluorofenilacetoneitrila 2	73
Figura 30 - Espectro de massas (70 eV) do ácido 4-fluorofenilacético 2a obtido pela biotransformação da 4-fluorofenilacetoneitrila 2 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934	73
Figura 31 - Estruturas de CIPRO [®] e PROZAC [®]	74
Figura 32 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr, cm^{-1}) para o ácido 4-fluorofenilacético 2a	75
Figura 33 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do ácido 4-fluorofenilacético 2a obtido da biotransformação da 4-fluorofenilacetoneitrila 2 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.	76
Figura 34 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do ácido 4-fluorofenilacético 2a obtido da biotransformação da 4-fluorofenilacetoneitrila 2 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.	76
Figura 35 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 4-clorofenilacetoneitrila 3	78
Figura 36 - Espectro de massas (70 eV) do ácido 4-clorofenilacético 3a obtido pela biotransformação da 4-clorofenilacetoneitrila 3 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	78
Figura 37 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr, cm^{-1}) para o ácido 4-clorofenilacético 3a	79
Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do ácido 4-clorofenilacético 3a obtido da biotransformação da 4-clorofenilacetoneitrila 3 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	80
Figura 39 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do ácido 4-clorofenilacético 3a obtido da biotransformação da 4-clorofenilacetoneitrila 3 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	80

Figura 40 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 4-metoxifenilacetoneitrila 4	82
Figura 41 - Espectro de massas (70 eV) do ácido 4-metoxifenilacético 4a obtido pela biotransformação da 4-metoxifenilacetoneitrila 4 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.	82
Figura 42 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr, cm ⁻¹) para o ácido 4-metoxifenilacético 4a	84
Figura 43 - Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do ácido 4-metoxifenilacético 4a obtido da biotransformação da 4-metoxifenilacetoneitrila 4 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.	84
Figura 44 - Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do ácido 4-metoxifenilacético 4a obtido da biotransformação da 4-metoxifenilacetoneitrila 4 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.	85
Figura 45 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 2-metilfenilacetoneitrila 5	87
Figura 46 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 3-metilfenilacetoneitrila 6	88
Figura 47 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 4-metilfenilacetoneitrila 7	89
Figura 48 - Cromatograma obtido por GC-MS do ácido 2-metilfenilacético 5a biotransformado pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934 após ser purificado.	90
Figura 49 - Espectro de massas (70 eV) do ácido 2-metilfenilacético 5a obtido da biotransformação da 2-metilfenilacetoneitrila 5 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.	90
Figura 50 - Cromatograma obtido por GC-MS do ácido 3-metilfenilacético 6a biotransformado pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934 após ser purificado.	90
Figura 51 - Espectro de massas (70 eV) do ácido 3-metilfenilacético 6a obtido da biotransformação de 3-metilfenilacetoneitrila 6 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.	90
Figura 52 - Cromatograma obtido por GC-MS do ácido 4-metilfenilacético 7a biotransformado pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934 após ser purificado.	91
Figura 53 - Espectro de massas (70 eV) do ácido 4-metilfenilacético 7a obtido da biotransformação da 4-metilfenilacetoneitrila 7 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.	91
Figura 54 - Espectro de HRMS do ácido 2-metilfenilacético 5a obtido pela biotransformação da 2-metilfenilacetoneitrila 5 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	93
Figura 55 - Espectro de HRMS do ácido 3-metilfenilacético 6a obtido pela biotransformação da 3-metilfenilacetoneitrila 6 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	93
Figura 56 - Espectro de HRMS do ácido 4-metilfenilacético 7a obtido pela biotransformação da 4-metilfenilacetoneitrila 7 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	94

Figura 57 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr, cm^{-1}) para o ácido 2-metilfenilacético 5a	96
Figura 58 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do ácido 2-metilfenilacético 5a obtido da biotransformação pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	97
Figura 59 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do ácido 2-metilfenilacético 5a obtido da biotransformação pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	97
Figura 60 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr, cm^{-1}) para o ácido 3-metilfenilacético 6a	98
Figura 61 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do ácido 3-metilfenilacético 6a obtido da biotransformação pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	98
Figura 62 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do ácido 3-metilfenilacético 6a obtido da biotransformação pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	99
Figura 63 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr, cm^{-1}) para o ácido 4-metilfenilacético 7a	99
Figura 64 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do ácido 4-metilfenilacético 7a obtido da biotransformação pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	100
Figura 65 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do ácido 4-metilfenilacético 7a obtido da biotransformação pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	100
Figura 66 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonitrila 8 (20 μL).....	103
Figura 67 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonitrila 8 (40 μL).....	104
Figura 68 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonitrila 8 (60 μL).....	105
Figura 69 - Espectro de massas (70 eV) do ácido 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acético 8a obtido da biotransformação da 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonitrila 8 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	105
Figura 70 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr, cm^{-1}) para o ácido 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acético 8a	106
Figura 71 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do ácido 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acético 8a obtido da biotransformação pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	107
Figura 72 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do ácido 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acético 8a obtido da biotransformação pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	107
Figura 73 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 3-hidroxipentanodinitrila 9	108

Figura 74 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da (±)-mandelonitrila 10 .	109
Figura 75 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da esterificação da (±)-mandelonitrila 10 .	111
Figura 76 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da benzonitrila 11 .	114
Figura 77 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 2-clorobenzonitrila 12 .	115
Figura 78 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 4-hidroxibenzonitrila 13 .	116
Figura 79 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 4-metoxibenzonitrila 14 .	117
Figura 80 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 3,5-dimetoxibenzonitrila 15 .	117
Figura 81 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 2-nitrobenzonitrila 16 .	118
Figura 82 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 3-nitrobenzonitrila 17 .	119
Figura 83 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 4-nitrobenzonitrila 18 .	120
Figura 84 - Espectros de massas (70 eV) da 4-aminobenzonitrila 18a obtido pela redução da 4-nitrobenzonitrila 18 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.	121
Figura 85 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da benzonitrila 11 e 2-cianopiridina 19 .	122
Figura 86 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 2-cianopiridina 19 .	124
Figura 87 - Cromatograma obtido por GC-MS da reação de biotransformação da 2-cianopiridina 19 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.	125
Figura 88 - Espectro de massas (70 eV) da 2-piridinamida 19a obtida da biotransformação da 2-cianopiridina 19 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.	125
Figura 89 - Cromatograma obtido por GC-MS do padrão sintético da 2-piridinamida 19a .	125
Figura 90 - Espectro de massas (70 eV) do padrão sintético da 2-piridinamida 19a .	125
Figura 91 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da benzonitrila 11 e 4-cianopiridina 20 .	126
Figura 92 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da benzonitrila 11 , 2-cianopiridina 19 e ácido benzoico.	127
Figura 93 - Indução em meio sólido do fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934 pela 2-cianopiridina 19 .	128

Figura 94 - Espectro na região do infravermelho (KBr cm^{-1}) do padrão ácido fenilacético 1a	141
Figura 95 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do padrão ácido fenilacético 1a	141
Figura 96 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do padrão ácido fenilacético 1a	142
Figura 97 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do padrão da ($\pm$)-mandelonitrila 10	142
Figura 98 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do padrão da ($\pm$)-mandelonitrila 10	143
Figura 99 - Cromatograma e espectros UV obtidos por HPLC do padrão ($\pm$)-mandelonitrila 10	143
Figura 100 - Cromatograma e espectros UV obtidos por HPLC do padrão benzaldeído 10b	144
Figura 101 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do acetato 10a da ($\pm$)-mandelonitrila 10	144
Figura 102 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do acetato 10a da ($\pm$)-mandelonitrila 10	145
Figura 103 - Espectro na região do infravermelho (KBr, cm^{-1}) do padrão 2-piridinamida 19a	145
Figura 104 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do padrão 2-piridinamida 19a	146
Figura 105 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) o padrão 2-piridinamida 19a	146

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Hidrólise enantiosseletiva do éster da ofloxacina pela esterase de <i>Y. lipolytica</i> CL180.	4
Esquema 2 - Biotransformação de citrinina pela bactéria marinha <i>Moraxella</i> sp. MB1.....	5
Esquema 3 - Biotransformação de cembranóide por bactérias marinhas.	5
Esquema 4 - Biotransformação do sesquiterpeno pacifenol pelo fungo marinho <i>Penicillium brevicompactum</i>	6
Esquema 5 – Diferentes rotas enzimáticas para a biotransformação do grupo ciano (BANERJEE, SHARMA e BANERJEE, 2002).	8
Esquema 6 - Produção de ácido cianídrico pela ação da linamarase.	9
Esquema 7 - Biotransformação por nitrilase em folhas de cevada.	12
Esquema 8 - Biotransformação <i>N</i> -metil-3-ciano-4-metoxi-2-piridona por nitrilase de <i>Pseudomonas</i> sp.	13
Esquema 9 - Biotransformação da acetonitrila por nitrila hidratase.	15
Esquema 10 - (a) Representação da hidrólise de amida. (b) Auação da amidase na formação do ácido hidroxâmico.	19
Esquema 11 - Reações catalisadas por amidases.	20
Esquema 12 - Produção de <i>S</i> -ibuprofeno pela nitrilase <i>S</i> -enantiosseletiva de <i>Acinetobacter</i> sp. AK226.	21
Esquema 13 - Hidrólise enantiosseletiva de (±)-mandelonitrila catalisada por nitrilase de bactérias.	22
Esquema 14 - Hidrólise do (±)-naproxeno por <i>Rhodococcus</i> sp. C3II e <i>Rhodococcus erythropolis</i> MP50.	22
Esquema 15 - Biotransformação da (±)-1,4-benzodioxano-2-carbonitrila por <i>Rhodococcus</i> sp. AJ270.	23
Esquema 16 - Biotransformação da (±)-2,2-dimetilciclopropanamida por amidase de <i>Comomonas acidivorans</i>	23
Esquema 17 - Hidrólise enantiosseletiva da (±)-piperazina-2-amida por amidases bacterianas.	24
Esquema 18 - Dessimetrização enzimática da 3-hidroxi-glutaronitrila pela nitrilase BD9570.	25
Esquema 19 - Dessimetrização da 3-(benziloxi)glutaronitrila por nitrila hidratase e amidase da <i>Brevibacterium</i> sp. B312.	25
Esquema 20 - Hidrólise regioseletiva do 1,4-dicianocicloexano pela bactéria <i>Acremonium</i> sp.	26

Esquema 21 - Hidrólise regioseletiva da adiponitrila pela nitrilase de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> K22.....	26
Esquema 22 - Produção de acrilamida e nicotinamida por nitrila hidratases de <i>R. rhodochrous</i> J1.	27
Esquema 23 - Hidrólise quimiosseletiva da 4-cianopiridina pela bactéria <i>R. rhodochrous</i> J1.....	27
Esquema 24 - Hidrólise de ácido acrílico pela <i>R. Rhodochrous</i> J1.	28
Esquema 25 - Hidrólise do ácido glicólico pela bactéria <i>Alcaligenes</i> sp. ECU0401.	28
Esquema 26 - Biodegradação da acetonitrila (a), acrilonitrila (b) e benzonitrila (c).	30
Esquema 27 - Preparação do ácido fenilacético 1a	38
Esquema 28 - Preparação da 2-piridinamida 19a	39
Esquema 29 - Preparação do acetato da (±)-mandelonitrila.	51
Esquema 30 - Ciclização térmica do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético 1b oriundo da biotransformação da fenilacetoneitrila 1	64
Esquema 31 - Proposta enzimática para a biotransformação da fenilacetoneitrila 1 ao ácido 2-(2-hidroxifenil)acético 1b pela indução dos fungos marinhos.	67
Esquema 32 - Biotransformação de fenilacetatos de alquila ao ácido 2-(2-hidroxifenil)acético 1b	67
Esquema 33 - Biotransformação do <i>orto</i> -tirosol ao ácido 2-(2-hidroxifenil)acético 1b	68
Esquema 34 - Biotransformação da fenilacetoneitrila 1 e 4-fluorofenilacetoneitrila 2 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.	72
Esquema 35 - Biotransformação da fenilacetoneitrila 1 e 4-clorofenilacetoneitrila 3 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934	77
Esquema 36 - Biotransformação da fenilacetoneitrila 1 e 4-metoxifenilacetoneitrila 4 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934	81
Esquema 37 - Biotransformação da fenilacetoneitrila 1 e das metilfenilacetoneitrilas 5-7 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	86
Esquema 38 - Biotransformação da fenilacetoneitrila 1 e 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetoneitrila 8 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	101
Esquema 39 - Biotransformação da fenilacetoneitrila 1 e (±)-mandelonitrila 10 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.	110
Esquema 40 - Sequência de produtos que foram biotransformados a partir da (±)-mandelonitrila 10 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	112
Esquema 41 - Biotransformação da fenilacetoneitrila 1 e 4-nitrobenzonitrila 18 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.	120

Esquema 42 - Biotransformação da fenilacetoneitrila 1 , 2-cianopiridina 19 e benzonitrila 11 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	123
Esquema 43 - Biotransformação da fenilacetoneitrila 1 e 2-cianopiridina 19 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores das enzimas nitrilases, nitrila hidratases e amidases.....	12
Tabela 2 - Fontes de organismos com atividade para nitrilases.....	14
Tabela 3 - Micro-organismos com atividade para nitrila hidratase.....	18
Tabela 4 - Micro-organismos com atividade para amidases.....	20
Tabela 5 - Fungos de ambiente marinho utilizados na triagem frente à fenilacetoneitrila 1	33
Tabela 6 - Métodos utilizados nas análises dos compostos por cromatografia a gás.	37
Tabela 7 - Crescimento de fungos marinhos em meio sólido com fenilacetoneitrila 1 (5 µL/placa), durante 8 dias a 32°C.	58
Tabela 8 - Crescimento de fungos marinhos em meio sólido com fenilacetoneitrila 1 (10, 15 e 20 µL/placa), durante 8 dias a 32°C.....	59
Tabela 9 - Crescimento induzido de fungos marinhos pela adição de fenilacetoneitrila 1 em meio líquido (32°C, 124 rpm, 8 dias).	60
Tabela 10 - Biotransformação da fenilacetoneitrila 1 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	62
Tabela 11 - Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C, IV, ponto de fusão e massas da 2-coumaranona 1c e do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético 1b	69
Tabela 12 - Biotransformação da fenilacetoneitrila 1 e 4-fluorofenilacetoneitrila 2 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.	72
Tabela 13 - Biotransformação da fenilacetoneitrila 1 e 4-clorofenilacetoneitrila 3 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.	77
Tabela 14 - Biotransformação da fenilacetoneitrila 1 e 4-metoxifenilacetoneitrila 4 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.	81
Tabela 15 - Biotransformação da fenilacetoneitrila 1 e metilfenilacetoneitrilas 5-7 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.	86
Tabela 16 - Biotransformação da fenilacetoneitrila 1 e 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetoneitrila 8 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	102
Tabela 17 - Biotransformação da fenilacetoneitrila 1 e (±)-mandelonitrila 10 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	110
Tabela 18 - Resultados das esterificações dos extratos oriundos das reações com (±)-mandelonitrila 10 com o fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	112
Tabela 19 - Biotransformação da fenilacetoneitrila 1 , benzonitrila 11 e 2-cianopiridina 19 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	123

Tabela 20 - Biotransformação da fenilacetoneitrila 1 e 2-cianopiridina 19 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	124
--	-----

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 - Etapas de preparação das frações oriundas das reações enzimáticas com os fungos de origem marinha induzidos pela fenilacetoneitrila 1	42
Fluxograma 2 - Biotransformação da fenilacetoneitrila 1 pelo fungo <i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 934.....	43
Fluxograma 3 - Biotransformação da 4-fluorofenilacetoneitrila 2 , 4-clorofenilacetoneitrila 3 e 4-metoxifenilacetoneitrila 4 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.	45
Fluxograma 4 - Biotransformação da 2-metilfenilacetoneitrila 5 , 3-metilfenilacetoneitrila 6 e 4-metilfenilacetoneitrila 7 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.	47
Fluxograma 5 - Biotransformação da 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetoneitrila 8 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	50
Fluxograma 6 - Biotransformação da (±)-mandelonitrila 10 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934. .	52
Fluxograma 7 - Biotransformação da benzonitrila 11 e 2-cianopiridina 19 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ac ₂ O	Anidrido acético
CAQI	Central de Análises Químicas e Instrumentais
CAL B	Lipase de <i>Candida antarctica</i> fração B
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
(CD ₃) ₂ CO	Acetona deuterado
CBMAI	Coleção Brasileira de Micro-organismo de Ambiente e Indústria
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DEX CB	β-ciclodextrina
DMSO	Dimetil sulfóxido
d	Dubleto
GC-FID	Gas chromatography - flame ionization detector (Cromatografia a gás com detector de ionização de chama)
GC-MS	Gas chromatography - Mass Spectrometry (Cromatografia a gás acoplado ao espectrômetro de massas de baixa resolução)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência)
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
MeOH	Metanol
NLs	Nitrilases
NHases	Nitrila hidratases
pi	Piridina
<i>r</i>	Taxa de aquecimento por minuto
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
<i>s</i>	Singleto
sl	Singleto largo
<i>t</i>	Triplete
ta	Temperatura ambiente
<i>t_c</i>	Tempo de corrida
<i>t_i</i>	Temperatura inicial
<i>t_f</i>	Temperatura final
<i>t_r</i>	Tempo de retenção
TMS	Trimetilsilano
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE ESQUEMAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FLUXOGRAMAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Biocatálise e biotransformação	1
1.2 Micro-organismos marinhos	3
1.3 Nitrilas.....	6
1.3.1 Hidrólise enzimática de nitrilas	10
1.4 Nitrilases, nitrila hidratases e amidases	12
1.4.1 Nitrilases (NLs)	12
1.4.2 Nitrila hidratases (NHases).....	15
1.4.3 Amidases	18
1.5 Aplicação de nitrilases, nitrila hidratases e amidases em biocatálise	21
1.5.1 Hidrólise de nitrilas racêmicas por nitrilases.....	21
1.5.2 Hidrólise de nitrilas racêmicas por nitrila hidratase	22
1.5.3 Hidrólise de amidas racêmicas por amidases	23
1.5.4 Dessimetrização de di-nitrilas	24
1.5.5 Hidrólise regioseletiva de di-nitrilas	25
1.5.6 Hidrólise quimiosseletiva de nitrilas	26
1.6 Biodegradação de nitrilas.....	28
2 OBJETIVOS	31
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	33
3.1 Micro-organismos	33
3.2 Crescimento dos micro-organismos.....	33
3.2.1 Composição dos meios de cultura	33
3.3 Métodos de análises, identificação e caracterização dos compostos	34
3.3.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	34
3.3.2 Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (EM-IES)	35
3.3.3 Espectrometria na região de absorção do Infravermelho (IV)	35
3.3.4 Cromatografia a Gás Acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM)	35
3.4 Métodos Cromatográficos.....	35
3.4.1 Cromatografia de adsorção	35
3.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	36

3.5	Evaporador rotativo	36
3.6	Agitador orbital rotativo termostatzado.....	36
3.7	Outros equipamentos	36
3.8	Reagentes e Solventes.....	37
3.9	Síntese dos padrões	38
3.9.1	Ácido fenilacético 1a	38
3.9.2	2-Piridinamida 19a	38
3.10	Triagem de fungos marinhos em meio enriquecido com malte 2%.....	39
3.10.1	Seleção dos fungos frente à fenilacetonnitrila 1 em meio líquido com malte 2%	39
3.11	Triagem de fungos marinhos em meio mineral suplementado com glicose e fenilacetonnitrila 1	40
3.11.1	Crescimento dos fungos marinhos em meio de cultura sólido na presença e ausência de fenilacetonnitrila 1	40
3.11.2	Crescimento dos fungos em meio de cultura líquido na presença e ausência de fenilacetonnitrila 1	41
3.11.3	Isolamento e purificação do produto biotransformado a partir da fenilacetonnitrila 1 pelo fungo <i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 934	42
3.12	Biotransformação da 4-fluorofenilacetonnitrila 2 , 4-clorofenilacetonnitrila 3 , 4-metoxifenilacetonnitrila 4 , 2-metilfenilacetonnitrila 5 , 3-metilfenilacetonnitrila 6 e 4-metilfenilacetonnitrila 7 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934	44
3.12.1	Isolamento e purificação dos produtos biotransformados das nitrilas 2-7 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934	44
3.13	Biotransformação da 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonnitrila 8 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934	47
3.13.1	Isolamento e purificação do produto biotransformado da 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonnitrila 8 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	49
3.14	Biotransformação da 3-hidroxipentanodinitrila 9 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	49
3.15	Biotransformação da (±)-mandelonitrila 10 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	50
3.16	Reações de esterificações.....	51
3.16.1	Preparação do acetato racêmico da (±)-mandelonitrila 10	51
3.16.2	Esterificação das reações de biotransformação de (±)-mandelonitrila 10 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	51
3.17	Biotransformação de nitrilas aromáticas 11-18 e hetero-aromáticas 19 e 20 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934	52
3.17.1	Nitrilas aromáticas 11-18	52
3.17.2	Benzonitrila 11 e 2-cianopiridina 19	53
3.17.3	Benzonitrila 11 e 4-cianopiridina 20	53
3.17.4	2-Cianopiridina 19	53

3.18	Crescimento do fungo marinho <i>A. sydowii</i> CBMAI 934 em meio de cultura sólido na presença de 2-cianopiridina 19	54
3.19	Biotransformação da benzonitrila 11 pelo fungo marinho <i>A. sydowii</i> CBMAI 934 em meio de cultura líquido na presença de 2-cianopiridina 19	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
4.1	Triagem de fungos marinhos em meio líquido de malte 2%	56
4.2	Triagem de fungos marinhos em meio mineral sólido e líquido com fenilacetona nitrila 1	57
4.3	Biotransformação da fenilacetona nitrila 1	60
4.4	Biotransformação das nitrilas arilalifáticas 2-7	71
4.4.1	4-Fluorofenilacetona nitrila 2	71
4.4.2	4-Clorofenilacetona nitrila 3	77
4.4.3	4-Metoxifenilacetona nitrila 4	81
4.4.4	2-Metilfenilacetona nitrila 5 , 3-metilfenilacetona nitrila 6 e 4-metilfenilacetona nitrila 7	85
4.5	Biotransformação da 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetona nitrila 8 pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934	101
4.6	Biotransformação da 3-hidroxipentanodinitrila 9	108
4.7	Biotransformação da (±)-mandelonitrila 10	109
4.8	Biotransformação das nitrilas aromáticas 11-18 e hetero-aromáticas 19 e 20	113
4.8.1	Nitrilas aromáticas 11-18	113
4.8.2	Benzonitrila 11 e 2-cianopiridina 19	122
4.8.3	2-Cianopiridina 19	123
4.8.4	Benzonitrila 11 e 4-cianopiridina 20	126
5	CONCLUSÃO	129
	REFERÊNCIAS	131

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biocatálise e biotransformação

Os termos biocatálise e biotransformação abrangem os processos em que enzimas são utilizadas para catalisar reações químicas, porém fora do sistema bioquímico, ou seja, com substratos não naturais às suas vias metabólicas. A biotransformação é aplicada a modificações específicas ou interconversões na estrutura química de compostos em múltiplas etapas utilizando organismos vivos (CASTRO et al., 2004; MOLINARI et al., 2007).

A biocatálise é uma área da Biotecnologia aplicada a Química que promove reações em compostos orgânicos em uma ou mais etapas, para a produção de compostos de interesse, principalmente com alta pureza enantiomérica (LILJEBLAD e KANERVA, 2006). Além da importância da biocatálise na obtenção de blocos quirais voltados para a produção de fármacos quirais; também sua aplicabilidade vem destacando-se na produção de insumos para produtos na indústria de cosméticos, polímeros, agroquímicos e combustíveis (FESSNER et al., 2011).

Para estabelecer um processo de biotransformação eficaz é necessária à análise detalhada dos fatores que condicionam o desenvolvimento e a otimização integrada do processo biotecnológico, as quais dependem: i) do biocatalisador, ii) da bioconversão e iii) do isolamento e purificação do produto.

As enzimas fazem parte das células de organismos vivos, como fungos filamentosos, bactérias, leveduras, algas, plantas e animais, sendo também possível utilizá-las em formas isoladas provenientes de fontes comerciais. A utilização de enzimas na transformação de compostos orgânicos é conhecida há mais de 100 anos (FABER, 2004). Contudo, foi somente a partir da segunda metade da década de 90 que o verdadeiro potencial que estes biocatalisadores representam em síntese orgânica começou a ser explorado (COSTA e AMORIN, 1999). Durante este período, um grande número de reações catalisadas por enzimas foram desenvolvidas e tornaram-se familiares aos químicos orgânicos. Uma das principais contribuições deste tipo de metodologia biossintética tem sido na obtenção de compostos enantiomericamente puros ou enriquecidos, geralmente intermediários ou produtos finais de rotas sintéticas estereocontroladas (COSTA e AMORIN, 1999).

As enzimas são macromoléculas protéicas constituídas de longas sequências de L-aminoácidos naturais, unidas por ligações peptídicas, que adotam estruturas tridimensionais complexas, características de cada enzima. Assim, elas são imprescindíveis a qualquer organismo, pois aceleram as reações químicas promovendo processos específicos vitais aos seres vivos.

A ligação peptídica é rígida e planar por apresentar caráter de ligação dupla devido à ressonância ou compartilhamento parcial entre os pares de elétrons do oxigênio carbonílico e o

nitrogênio amídico. O oxigênio adquire uma carga parcial negativa e o nitrogênio uma carga parcial positiva, formando um pequeno dipolo elétrico. Os carbonos α de resíduos adjacentes de aminoácidos são separados entre si por três ligações covalentes, arranjados na forma C_{α} -C-N- C_{α} (Figura 1) (NELSON e COX, 2011).

Figura 1 - (a) Estruturas de ressonância da ligação peptídica. **(b)** Representação da formação de uma ligação peptídica.

Existem diversas classes de enzimas e as mais utilizadas para propostas sintéticas correspondem às oxidorreduções (hidrogenases, oxidases, peroxidases, redutases), transferases, hidrolases (esterases, lipases, amidases, fosfatases, epóxido hidrolases e nitrilases) e as liases (descarboxilases) (FABER, 2011).

A eficiência dos biocatalisadores (enzimas) em realizar diversas reações químicas tem sido o grande atrativo para seu uso em sínteses químicas devido à seletividade apresentada pelos biocatalisadores naturais, tais como; quimiosseletividade, enantiosseletividade e regioseletividade (SILVERMAN, 2000). Como também, um amplo espectro de compostos químicos que são aceitos como substratos xenobióticos para as reações, as condições amenas e ambientalmente sustentáveis conferem a estes biocatalisadores algumas características fundamentais para sua utilização em diferentes transformações de interesse biotecnológico (FABER, 2011).

A utilização da biodiversidade na busca de novos catalisadores por técnicas de seleção de micro-organismos, plantas ou células animais representam os métodos tradicionais de descoberta de novas enzimas para o desenvolvimento da biocatálise para diferentes setores industriais. O uso de micro-organismos apresenta um particular interesse devido ao curto período de cultivo, a grande diversidade de processos metabólicos e enzimas envolvidas e, devido a um número ilimitado de micro-organismos na natureza que podem ser utilizados, os quais são bastante diferenciados entre si proporcionando a descoberta de enzimas com diferentes aplicações (CARVALHO et al., 2005).

1.2 Micro-organismos marinhos

Apesar de várias enzimas industriais serem derivadas de fontes terrestres, o potencial dos micro-organismos marinhos vem sendo explorado com uma atenção para uso industrial. Nos últimos anos, os micro-organismos marinhos têm atraído os pesquisadores despertando interesse em explorar as enzimas para diferentes aplicações biotecnológicas.

Considerando que a ocorrência de fungos no ambiente marinho foi descrita no final do século XIX e que os oceanos cobrem mais de 70% da superfície terrestre, o número de espécies de fungos marinhos conhecidos é muito menor que as espécies terrestres (DE VITA-MARQUES et al., 2008). Em 1849, foi descrito o primeiro fungo marinho facultativo, *Phaeosphaeria typharus*, e em 1869, o primeiro fungo marinho obrigatório, *Halothia posidoniae* (LOQUE, 2009). Os fungos marinhos podem ser divididos em dois grandes grupos. O primeiro definido como obrigatórios que são representados por fungos que crescem e esporulam exclusivamente em habitat marinhos ou estuarinos. E o segundo, chamado de facultativos que são representados por fungos que vêm de águas continentais e ambientes terrestres, os quais crescem e, sobrevivem em ambientes marinhos (LOQUE, 2009). Os fungos marinhos, dentre os diversos micro-organismos presentes nesse complexo e imenso conjunto de ecossistemas, representam uma fonte valiosa e pouco estudada de novas espécies para ciência e para estudos ecológicos, evolutivos e biotecnológicos. Dentre estes micro-organismos, os fungos podem ser encontrados associados a diferentes organismos, tais como, poríferos, peixes, cnidários, tunicados, algas, etc.

O isolamento de fungos de amostras marinhas não implica necessariamente que estes organismos estejam ativos no ambiente marinho, portanto é possível isolar um fungo terrestre que foi adaptado ou está presente no ambiente marinho. Ainda, o fungo isolado poderia estar dormente na forma de esporos ou fragmentos de hifas até que as condições de cultivo em laboratório tornem-se favoráveis para sua germinação e crescimento. Muitos fungos isolados de amostras marinhas não foram comprovadamente identificados como sendo fungos marinhos obrigatórios ou facultativos. Portanto, uma expressão generalizada “fungos derivados do meio marinho” (marine-derived fungi) tem sido utilizada (BUGNI e IRELAND, 2004).

Com o avanço das técnicas aplicadas à biologia molecular, tem sido possível isolar e identificar bactérias e fungos marinhos obrigatórios presentes nos oceanos. Recentemente, estudos foram realizados para avaliar métodos de isolamento de fungos derivados de ambiente marinho, resultando em 688 cepas fúngicas isoladas a partir de ascídias, esponjas e algas (KOSSUGA et al., 2012).

Inúmeros micro-organismos marinhos contêm propriedades bioquímicas específicas que podem fornecer novas enzimas que apresentam características peculiares, podendo ser mais estáveis

e ativas do que as correspondentes enzimas de organismos terrestres (ZHANG e KIM, 2010). A complexidade do ambiente marinho que envolve alta salinidade e pressão, baixa temperatura e condições especiais de iluminação podem contribuir para as diferenças significativas entre as enzimas geradas por micro-organismos marinhos em comparação às enzimas homólogas de micro-organismos terrestres, impulsionando a tecnologia enzimática dos micro-organismos marinhos nos últimos anos e resultando na obtenção de produtos valiosos de interesse científicos e econômicos (ZHANG e KIM, 2010).

Nos últimos anos, foram isoladas uma variedade de enzimas com atividades específicas a partir de bactérias, fungos e outros organismos marinhos. Inclusive, alguns produtos já foram utilizados em aplicações industriais. Nesse âmbito, pode citar as enzimas proteases, as quais representam um tipo muito importante de enzima do ponto de vista industrial, que são utilizadas no processamento de couro, de alimentos e detergentes (BESHAY e MOREIRA, 2004). Em 2009, foi isolada e purificada uma protease alcalina a partir da bactéria marinha *Bacillus mojavensis* A21 (ZHANG e KIM, 2010). Esta protease apresentou alta estabilidade para surfactantes não iônicos, além de estabilidade para agentes oxidantes. As proteases com alta atividade e estabilidade em pH alcalino elevado são interessantes para aplicações em bioengenharia e biotecnologia (HADDAR et al., 2009).

Enzimas microbianas marinhas podem produzir um considerável número de moléculas com potencial a serem transformadas em fármacos (GHOSH et al., 2005; HAEFNER, 2003). Nesse âmbito, pode citar a hidrólise enantiosseletiva do *rac*-éster ofloxacina ao correspondente ácido da levofloxacina pela esterase da levedura *Yarrowia lipolytica* CL180 isolada de ambiente marinho (Esquema 1) (KIM et al., 2007)

O *S*-isômero da Levofloxacina é um antibiótico que apresenta um amplo espectro de atividade antibacteriana (ELIOPOULOS et al., 1996).

Esquema 1 - Hidrólise enantiosseletiva do éster da ofloxacina pela esterase de *Y. lipolytica* CL180.

Na literatura, são descritos alguns trabalhos envolvendo a biotransformação de produtos naturais por micro-organismos marinhos, cujos produtos biotransformados apresentam atividade

biológica. A biotransformação de produtos naturais por esta fonte de biocatalisadores é uma importante metodologia para o desenvolvimento de novos compostos bioativos (FENG et al., 2010).

Neste âmbito, pode citar alguns exemplos sobre biotransformações de produtos naturais por micro-organismos isolados de ambiente marinho.

A citrinina foi isolada como um metabólito secundário a partir de um fungo marinho *Penicillium chrysogenum* e foi biotransformada a descarboxicitrinina pela bactéria marinha *Moraxella* sp. MB1 pela ação da enzima decarboxilase (Esquema 2). A citrinina e descarboxicitrinina mostraram atividade antibiótica contra bactérias patogênicas, tais como, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. e *Vibrio cholera* (DEVI et al., 2006).

Esquema 2 - Biotransformação de citrinina pela bactéria marinha *Moraxella* sp. MB1.

As bactérias marinhas, *Bacillus* sp. NC5, *Bacillus* sp. NK8 e *Bacillus* sp. NK7, isoladas da esponja *Negombata magnífica*, biotransformaram o cembranóide em seis metabólitos hidroxilados (Esquema 3). Cembranóide e seus produtos de bioconversão mostraram atividade anti-invasiva contra o câncer de próstata PC-3M (SAYED et al., 2008).

Esquema 3 - Biotransformação de cembranóide por bactérias marinhas.

Biotransformações de terpenóides foram realizadas a fim de avaliar a atividade biológica dos compostos produzidos. O sesquiterpeno pacifenol, isolado da alga marinha *Laurencia claviformis*, foi biotransformado pelo fungo marinho *Penicillium brevicompactum* ao derivado

hidroxilado, o qual apresentou atividade antibacteriana contra a *Staphylococcus enteriditis* que causa infecção na pele (Esquema 4) (SAN-MARTÍN et al., 2008).

Esquema 4 - Biotransformação do sesquiterpeno pacifenol pelo fungo marinho *Penicillium brevicompactum*.

A partir desses resultados apresentados, observa-se que as enzimas marinhas possuem um grande potencial para a biotransformação de produtos naturais para produzir novas moléculas. No entanto, existem poucos estudos relacionados às biotransformações por meio de enzimas marinhas na literatura. Os micro-organismos marinhos, cuja diversidade genética e bioquímica é pouco conhecida, são de interesse considerável como novas fontes de enzimas com potencial de aplicação em diversas áreas biotecnológicas.

O Brasil com cerca de 8000 km de costa litorânea, o segundo litoral mais extenso depois da Austrália, é bastante diversificado em recursos aquáticos e merece ser intensivamente estudado na busca de novos biocatalisadores. Esse interesse vem sendo despertado por pesquisadores brasileiros. Recentemente, o grupo de Química Orgânica e Biocatálise do IQSC, coordenado pelo Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto, iniciou o primeiro programa brasileiro a desenvolver pesquisa em Biocatálise, Biotransformação e Biodegradação com micro-organismos de ambiente marinho. Nesse âmbito, foram desenvolvidas dissertações de mestrado (ROCHA, 2008; MARTINS, 2008; FERREIRA, 2008; MOUAD, 2010) e publicações como a biotransformação de α -bromoacetofenonas (ROCHA et al., 2009), biorredução de α -cloroacetofenonas (ROCHA et al., 2010), degradação de pesticidas organoclorados DDD (ORTEGA et al., 2011), hidrólise de benzil glicidil éter (MARTINS et al., 2011).

1.3 Nitrilas

Compostos orgânicos contendo grupo ciano ocorrem naturalmente no ambiente com diferentes tipos estruturais que são sintetizados por plantas, fungos, bactéria, algas, esponjas e insetos. Tanto plantas, quanto micro-organismos são hábeis em produzirem nitrilas do tipo alifáticas e aromáticas, tais como, cianoglicosídeos, cianolipídeos, ricinina, fenilacetoneitrila, dentre outras (Figura 2) (HOWDEN e PRESTON, 2009). Estes compostos podem servir não só como

armazenamento de nitrogênio, mas também como proteção contra o ataque de agentes predadores (FABER, 2011).

Figura 2 - Estruturas de nitrilas que ocorrem naturalmente em diferentes organismos vivos.

A rota enzimática para obtenção de nitrilas é pouco conhecida. Um estudo realizado por Kato et al. mostrou que a atividade enzimática de aldoxima desidratase é responsável pela formação de nitrilas a partir de aldoximas (KATO et al., 2000). Consequentemente, o metabolismo de compostos contendo o grupo ciano envolve um amplo espectro de reações, dentre elas destaca-se a hidrólise enzimática por nitrilase ou nitrila hidratase seguida por amidase, reações catalisadas por oxigenase e oxinitrilase, e reduções cianídricas catalisadas por nitrogenase (Esquema 5) (BANERJEE, SHARMA e BANERJEE, 2002).

Muitas plantas e insetos usam oxigenases para oxidar algumas nitrilas a cianoidrinas (α -hidroxinitrilas), que são convertidas a aldeídos e ácido cianídrico (HCN) pela ação das oxinitrilases (hidroxinitrila liases) (JONHSON et al., 2000). O ácido cianídrico também pode ser convertido pela enzima cianase a gás carbônico (CO₂) e amônia (NH₃) ou pela enzima ciano hidratase a formamida, e ainda pela enzima ciano diidratase ao ácido fórmico e amônia. Já as nitrogenases, que estão presentes em organismos fixadores de nitrogênio, são capazes de reduzir nitrilas aos correspondentes hidrocarbonetos e amônia (Esquema 5) (BANERJEE, SHARMA e BANERJEE, 2002).

Esquema 5 – Diferentes rotas enzimáticas para a biotransformação do grupo ciano (BANERJEE, SHARMA e BANERJEE, 2002).

A maioria das nitrilas encontradas na natureza são tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas (CHEN et al., 2009). Em geral, a toxicidade de nitrilas em humanos causa problema gástrico, náusea, irritação bronquial e dificuldade respiratória (BANERJEE, SHARMA e BANERJEE, 2002). Compostos orgânicos contendo o grupo ciano são encontrados no ambiente, não somente como produto natural, mas também, como resultado da atividade humana (FABER, 2011).

Por exemplo, a mandioca (*Manihot esculenta*), uma planta largamente consumida, pois é uma fonte rica de carboidratos, se preparada inadequadamente, pode causar intoxicação e até mesmo levar a óbito. Nas folhas e raízes da planta contêm glicocianetos, compostos de defesa, também conhecidos como glicosídeos cianogênicos, os quais são a linamarina e a lotaustralina (Figura 3).

Figura 3 - Estruturas da linamarina e a lotaustralina.

Embora não sejam tóxicos por si só, os glicocianetos sob a ação das enzimas β -glicosidases, hidroxinitrila liases ou linamarases liberam entre outras substâncias o ácido cianídrico (HCN), substância de alta toxicidade (Esquema 6). Na circulação sanguínea, o ácido cianídrico

libera o íon cianeto, que é transportado pela hemoglobina. Nas células, o cianeto liga-se fortemente ao citocromo mitocondrial, que é responsável pela respiração celular. Por essa razão, o intoxicado passa por um processo de asfixia celular que, dependendo da quantidade de cianeto no sangue, pode provocar a morte (FUNDAÇÃO INSTITUTO OSWALDO CRUZ).

Esquema 6 - Produção de ácido cianídrico pela ação da linamarase.

Outro exemplo de nitrila que causa danos ao ser humano e ao meio ambiente é a acrilonitrila, a qual pode ser lançada ao meio ambiente durante sua síntese e uso. A acrilonitrila é usada na fabricação de ácido acrílico e fibras modacrílicas, como também, na obtenção de plásticos. Segundo a EPA (Environmental Protection Agency- EUA) a acrilonitrila é classificada como carcinogênica ao homem. Logo, a degradação microbiana tem sido considerada como uma eficiente alternativa para remover a alta toxicidade de nitrilas do meio ambiente (BANERJEE, SHARMA e BANERJEE, 2002).

Apesar da alta toxicidade da maioria das nitrilas, estas são amplamente usadas como compostos intermediários na química orgânica para a síntese de aminas, amidas, amidinas, ácidos carboxílicos, ésteres, aldeídos, cetonas e compostos heterocíclicos (Figura 4) (BANERJEE, SHARMA e BANERJEE, 2002; CHEN et al., 2009).

A hidrólise química de nitrilas requer o uso de ácidos ou bases fortes, sais de metais tóxicos e temperaturas elevadas (KIELBASINSKI et al., 2007; ZHU et al., 2008). Entretanto, a hidrólise enzimática oferece um meio de promover tal reação, sob condições suaves e não produz subprodutos (KIELBASINSKI et al., 2007; GRUNWALD, 2009).

Figura 4 - Nitrila como intermediária na síntese de diferentes compostos orgânicos.

1.3.1 Hidrólise enzimática de nitrilas

A hidrólise é o caminho mais comum para o metabolismo microbiano de nitrilas que ocorre por duas rotas enzimáticas:

i) por nitrilase (NL) que hidrolisa a nitrila diretamente ao correspondente ácido carboxílico *via* adição de duas moléculas de água;

ii) por nitrila hidratase (NHase) que converte a nitrila à correspondente amida, *via* adição de uma molécula de água, que por ação de uma amidase é transformada ao correspondente ácido carboxílico, *via* adição de uma molécula de água (KIELBASINSKI et al., 2008). Na figura 5 está esquematizado as possíveis rotas enzimáticas da hidrólise de nitrilas.

Figura 5 - Hidrólise enzimática de nitrilas.

Uma proposta mecanística simplificada para reação de hidrólise enzimática de nitrila por nitrilase é apresentada na figura 6.

As principais etapas deste mecanismo são:

(a) No sítio catalítico da enzima estão envolvidos três resíduos de aminoácidos, o ácido glutâmico (Glu), a cisteína (Cis) e a lisina (Lis), e uma molécula de água;

(b) Inicialmente, ocorre uma interação *via* ligação de hidrogênio do substrato (nitrila) ao sítio catalítico da enzima com o resíduo de aminoácido lisina protonada. Como também, há ligação de hidrogênio entre a molécula de água com a nitrila e os aminoácidos Cis e Glu. O ácido glutâmico também é estabilizado *via* ligação de hidrogênio com a lisina;

(c) Na primeira etapa da reação, o carbono eletrofílico do grupo ciano sofre um ataque nucleofílico do grupo sulfidrílico da cisteína para formar um complexo covalente tioimidato-enzima. O caráter nucleofílico da cisteína é favorecido pelas interações de ligação de hidrogênio com a água;

(d) O complexo tioimidato-enzima é subsequentemente hidrolisado por uma molécula de água para formar um intermediário tetraédrico;

- (e) O nitrogênio do intermediário tetraédrico é protonado ao capturar um próton do ácido glutâmico;
- (f) Posteriormente, a protonação do nitrogênio do intermediário tetraédrico favorece a eliminação da amônia e formação do complexo covalente tioéster-enzima;
- (g) Finalmente, o complexo tioéster-enzima é hidrolisado por uma molécula de água para formar o correspondente carboxilato.

Figura 6 - Etapas de reação de hidrólise de nitrilas por nitrilase.

Fonte: Adaptado de MARTÍNKOVA, L.; KREN, V. Biotransformations with nitrilases. **Current Opinion Chemical Biology**, v. 14, p. 130-137, 2010.

As reações mediadas por biocatalisadores que convertem nitrilas são na maioria ativos em pH neutro ou ligeiramente alcalino (MARTÍNKOVÁ, VEJVODA e KREN, 2008). Em ambientes muito ácidos ou alcalinos estas enzimas exibem baixa atividade (CHEN et al., 2009). Porém, há algumas exceções, por exemplo, a hidrólise da fenilacetonnitrila e 2-fenilpropionitrila pela levedura acidotolerante *Exophiala oligosperma* R1 ocorreu em uma faixa de pH variando-se de 1,5 a 9,0 (RUSTLER e STOLZ, 2007).

1.4 Nitrilases, nitrila hidratases e amidases

As nitrilases (EC 3.5.5.1) e amidases (EC 3.5.1.4) pertencem à classe de enzimas hidrolases, enquanto nitrila hidratases (EC 4.2.1.84) pertencem à classe de enzimas liases (BRADY et al., 2004; WINKLER, GLIEDER e KLEMPIER, 2006). Estas enzimas estão disponíveis comercialmente (Sigma Aldrich) (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores das enzimas nitrilases, nitrila hidratases e amidases.

Enzima (expressa em <i>Escherichia coli</i>)	Quantidade (mg)	U/mg	Valor (R\$)/US\$
Nitrilase	10	$\geq 2,0$	211,00 / 55,60
	50		795,00
Nitrila hidratase	10	$\geq 1,5$	179,00/ 46,40
	50		706,00
Amidase	10	$\geq 1,5$	254,00 / 94,80
	50		1.006,00

Fonte: www.sigmaaldrich.com/brazil.html, acessado em 14.08.2012

U = Quantidade de enzimas que converte 1 μmol de acrilonitrila a acrilamida

1.4.1 Nitrilases (NLs)

Desde sua descoberta em plantas (1958) e em bactérias (1964), mais de 30 nitrilases foram reportadas em muitos organismos, inclusive em fungos (HOWDEN e PRESTON, 2009). A enzima nitrilase foi reconhecida pela primeira vez por converter a indolacetonitrila ao ácido indolacético em folhas de cevada (*Chinese cabbage*), a qual foi denominada de indolacetonitrilase (Esquema 7) (REILLY e TURNER, 2003).

Esquema 7 - Biotransformação por nitrilase em folhas de cevada.

A primeira nitrilase bacteriana purificada e parcialmente caracterizada foi isolada de *Pseudomonas* sp., a qual catalisou a *N*-metil-3-ciano-4-metoxi-2-piridona em *N*-metil-3-carboxil-4-metoxi-2-piridona (Esquema 8) (REILLY e TURNER, 2003).

Esquema 8 - Biotransformação *N*-metil-3-ciano-4-metoxi-2-piridona por nitrilase de *Pseudomonas* sp.

As propriedades bioquímicas e biológicas de nitrilases e seus substratos indicam que estas enzimas são susceptíveis a terem funções de defesa, desintoxicação, utilização do nitrogênio como fonte de nutriente e síntese de hormônio vegetal (HOWDEN e PRESTON, 2009).

As nitrilases de plantas são as enzimas que apresentam melhores caracterizações em relação às suas funções biológicas, particularmente NIT1, NIT2, NIT3 e NIT4 de *Arabidopsis thaliana*. Nitrilases de plantas formam dois grupos distintos segundo o tipo de substrato que catalisam: nitrilases com alta atividade para hidrolisar arilacetonnitrilas (fenilpropanonitrila) e nitrilases com alta atividade hidrolítica para nitrilas alifáticas (β -ciano-L-alanina) (Figura 7) (HOWDEN e PRESTON, 2009).

Figura 7 - Estruturas de compostos naturais contendo o grupo ciano.

A maioria das nitrilases caracterizadas é de origem bacteriana e estas foram obtidas por métodos seletivos que permitiram que apenas as linhagens Gram positivas desenvolvessem em um meio de cultivo na presença de nitrila como única fonte de nitrogênio (PETRICKOVÁ et al., 2012; MARTÍNKOVÁ et al., 2009a). O cultivo de micro-organismos em meios seletivos é um método eficiente para isolar micro-organismos capazes de hidrolisar nitrilas. Como nitrilases e amidases convertem os respectivos substratos (contendo grupo ciano) em amônia, a qual é utilizada como fonte de nitrogênio, os micro-organismos que produzem as enzimas de interesse podem crescer na presença de nitrilas ou amidas como única fonte de nutrientes. Em alguns casos, os carboxilatos resultantes da hidrólise de nitrilas ou amida também são utilizados pelos micro-organismos, promovendo, assim, a degradação do substrato (MARTINKOVÁ, VEJVODA E KREN, 2008).

Bactérias do gênero *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Nocardia* são fontes de diversas nitrilases com especificidades para diferentes tipos de substratos, cujas enzimas foram purificadas e caracterizadas (BANERJEE, SHARMA E BANERJEE, 2002; REILLY E TURNER, 2003; MARTÍNKOVÁ et al., 2009b). Em relação às nitrilases fúngicas, a primeira foi isolada de *Aspergillus niger*, a qual foi caracterizada bioquimicamente e sequenciada. Outros gêneros foram sendo conhecidos como produtores destas enzimas, como o *Fusarium*, *Gibberella* e *Penicillium* (KAPLAN et al., 2006a; MARTÍNKOVÁ e KREN, 2010). A tabela 2 mostra algumas fontes de organismos que apresentaram atividade para nitrilases.

Tabela 2 - Fontes de organismos com atividade para nitrilases.

Bactérias	Fungos	Plantas
<i>Acidovorax facilis</i> 72W	<i>Fusarium solani</i> IMI196840	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>Bacillus pallidus</i> Dac521	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC8750	<i>Cryptococcus</i> sp. UFMG-Y28	<i>Brassica campestris pekinensis</i>
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> J-1	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Brassica rapa</i>
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> NCIMB	<i>Penicillium multicolor</i>	
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> PA-34	<i>Exophiala oligosperma</i> R1	
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> K22		
<i>Comamonas testosterone</i>		
<i>Pseudomonas fluorescens</i> DSM		
<i>Rhodococcus rubber</i>		
<i>Acinetobacter</i> sp. AK 226		
<i>Klebsiella ozaenae</i>		
<i>Arthrobacter</i> sp. J1		
<i>Streptomyces</i> sp. MTCC 7546		
<i>Bacillus subtilis</i> ZJB-063		

Fonte: Chen et al. Microbiol transformation of nitriles to high-value acids or amides. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 113, p. 33-37, 2009.

A expressão de nitrilases em micro-organismos pode ser melhor obtida partindo-se da seleção de um indutor (substrato) apropriado, pois as nitrilases tanto de origem bacteriana, quanto fúngica são geralmente induzidas na presença de substratos específicos (MARTÍNKOVÁ et al., 2009a). Por exemplo, a nitrilase da bactéria *Nocardia* sp. foi induzida pela benzonitrila. Enquanto, a acetonnitrila foi usada como indutora na expressão de nitrilase no fungo *Fusarium oxysporum* (BANERJEE, SHARMA E BANERJEE, 2002).

Nitrilases de fungos filamentosos mostraram baixa atividade e, portanto, a purificação destas enzimas torna-se difícil. Contudo, vários estudos demonstraram a atividade de nitrilases por

fungos filamentosos através da utilização de indutores, por exemplo, a 2-cianopiridina e a 3-cianopiridina (KAPLAN et al., 2006a; KAPLAN et al., 2006b; SNAJDROVÁ et al., 2004). A 2-cianopiridina foi selecionada por ser um excelente indutor destas enzimas em vários gêneros de fungos (*Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*), pois sua atividade foi duas a três vezes superior à atividade de 3-cianopiridina em meios de cultura contendo estes substratos como indutores (MARTÍNKOVÁ et al., 2009a). Segundo Martínková et al. a 2-cianopiridina pode ser considerada como um indutor universal de nitrilases aromáticas em fungos filamentosos (MARTÍNKOVÁ et al., 2009b).

Dependendo da especificidade do substrato, as nitrilases podem ser diferenciadas em três subclasses:

- i) nitrilases alifáticas (acrilonitrila, glutaronitrila);
- ii) nitrilases aromáticas (benzonitrila) e heterocíclicas (cianopiridinas);
- iii) arilacetoneitrilases, que predominantemente catalisam a hidrólise de arilacetoneitrilas (arilalifáticas, por ex. fenilacetoneitrila, fenilpropanoneitrila) (WINKLER et al., 2009; CHEN et al., 2009).

A hiperindução de nitrilases alifáticas foi bastante eficiente pelo uso da isovaleroneitrila em *Rhodococcus rhodochrous* K22. O mesmo indutor, também, foi eficaz para nitrilases aromáticas em *Rhodococcus rhodochrous* J1 (KAPLAN et al., 2006b).

As nitrilases de fungos filamentosos são, em geral, classificadas como nitrilases aromáticas devido a sua alta atividade para nitrilas hetero-aromáticas, entretanto, estas enzimas também catalisam a hidrólise de uma variedade de nitrilas alifáticas (MARTÍNKOVÁ et al., 2009b).

Embora as nitrilases possam ser induzidas de acordo com a especificidade dos substratos, em muitos casos estas podem biotransformar diferentes tipos de nitrilas, sejam aromáticas, alifáticas ou hetero-aromáticas.

1.4.2 Nitrila hidratases (NHases)

Em 1980, foi verificada a presença de acetoneitrila hidratase na degradação de nitrilas alifáticas (ASANO, TANI e YAMADA 1980). A primeira ocorrência de nitrila hidratase foi reportada em *Rhodococcus rhodochrous* J1, a princípio esta bactéria foi identificada como *Arthrobacter* sp. J1, a qual degradou acetoneitrila em acetamida (Esquema 9) (CHEN et al., 2009).

Esquema 9 - Biotransformação da acetoneitrila por nitrila hidratase.

As nitrila hidratases são enzimas que dispõem em seu sítio ativo de íons metálicos, como Fe^{3+} ou Co^{2+} . Assim, as NHases podem ser classificadas em dois grupos: NHases dependentes de ferro(III) e NHases dependentes de cobalto(II) (BANERJEE, SHARMA e BANERJEE, 2002). Por exemplo, NHases a partir de *Pseudomonas chlororaphis* B23, *Brevibacterium* sp. R312 e *Rhodococcus* sp. necessitam de ferro, enquanto as NHases a partir de *R. rhodochrous* J1 e *Pseudomonas putida* NRRL 18668 necessitam de cobalto (BORNSCHEUER e KAZLAUSKAS, 2006). Já as NHases de *Agrobacterium tumefaciens* requerem ambos íons metálicos. Existem duas principais razões da presença do íon metálico no sítio ativo da enzima. Primeiro, devido os íons metálicos serem ótimos catalisadores para hidratação da ligação $-\text{CN}$. Segundo, os íons metálicos são essenciais para reforçar a flexibilidade (dobragem) e estabilidade da subunidade da cadeia polipeptídica (α e β) das NHases (BANERJEE, SHARMA e BANERJEE, 2002; CHEN et al., 2009). Na figura 8, está representado dois possíveis mecanismos da ação de uma NHase.

Figura 8 - Mecanismo proposto para reação de hidrólise de nitrila catalisada por NHase.

Mecanismo I

Mecanismo II

Fonte: Adaptado de BANERJEE, A.; SHARMA, R.; BANERJEE, U. C. The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 33-44, 2002.

Todos os ligantes coordenados ao metal estão na subunidade α da proteína. Esses ligantes são três tiolatos de cisteína (Cis110, Cis112, Cis114) e dois átomos de nitrogênio (Ser113, Cis112). Estes aminoácidos ocupam os cinco vértices de um octaedro coordenado com um metal e a sexta posição do octaedro pode ser ocupada por um íon hidróxido. As principais etapas desses mecanismos são:

Mecanismo I:

- i) o carbono eletrofílico do grupo ciano sofre um ataque nucleofílico do íon hidróxido que está coordenado ao metal do sítio catalítico da enzima levando a formação de um imidato;
- ii) o imidato por tautomerização forma a amida, a qual é mais estável.

Mecanismo II:

- i) o íon hidróxido coordenado ao metal do sítio catalítico da enzima atua como uma base ativando uma molécula de água para promover o ataque nucleofílico ao grupo ciano levando a formação de um imidato;
- ii) o imidato por tautomerização forma a amida.

Como consequência da estrutura única do sítio ativo da NHase, a hidratação de nitrilas é catalisada eficientemente (KOBAYASHI e SHIMIZU et al., 2000).

Um número considerável de micro-organismos (bactérias) mostrou a atividade para nitrila hidratase em diferentes tipos de nitrilas (Tabela 3).

Tabela 3 - Micro-organismos com atividade para nitrila hidratase.

Micro-organismos	Substratos específicos
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> d3	Arilnitrilas, arilalquilnitrilas, acrilonitrila
<i>Arthrobacter</i> sp. J-1	Nitrilas alifáticas
<i>Bacillus cereus</i>	Acrilonitrila
<i>Bacillus</i> sp. BR 449	Acrilonitrila
<i>Bacillus smithii</i> SC-J05-1	Arilnitrilas
<i>Brevibacterium imperialis</i> CBS 489-74	Acrilonitrila
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> B23	Alquilnitrila
<i>Pseudomonas putida</i>	Acetonitrila
<i>Pseudonocardia thermophila</i> JCM 3095	Acrilonitrila
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> J-1	Alquilnitrila, nitrilas heterocíclicas, arilnitrilas
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> R312	Alquilnitrila, benzonitrila
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> LL 100-21	Alquilnitrila, acrilonitrila, arilalquilnitrilas, 3-cianopiridina
<i>Rhodococcus erythropolis</i> BL1	Alquilnitrila, arilalquilnitrilas
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> A4	Alquilnitrila, arilnitrilas, cicloalquilnitrilas, arilnitrilas, nitrilas heterocíclicas, arilalquilnitrilas
<i>Rhodococcus</i> sp. AJ270	Dinitrilas alifáticas e aromáticas
<i>Rhodococcus</i> sp. SHZ-1	Acrilonitrila
<i>Nocardia</i> sp. 108	Acrilonitrila
<i>Rhodococcus</i> sp. ZJUT-N595	Acrilonitrila, glicolonitrila, 2,2-dimetilciclopropanocarbonitrila
<i>Rhodococcus</i> sp. N 774	Nitrilas alifáticas
<i>Candida guilliermondii</i> CCT 7207	Cicloalquilnitrilas, arilnitrilas, nitrilas heterocíclicas
<i>Candida famata</i>	Alquilnitrilas
<i>Cryptococcus flavus</i> UFMG-Y61	Isobutironitrila

Fonte: Chen et al. Microbiol transformation of nitriles to high-value acids or amides. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 113, p. 33-37, 2009.

As nitrila hidratases foram inicialmente consideradas específicas para nitrilas alifáticas, porém, posteriormente, atividades destas enzimas foram reportadas em nitrilas hetero-aromáticas (MARTINKOVÁ, VEJVODA e KREN, 2008).

Assim como as nitrilases, as nitrila hidratases também são geralmente induzidas. Vale ressaltar que os íons metálicos Fe^{3+} e Co^{2+} são essenciais na exibição de sua atividade catalítica (CHEN et al., 2009).

1.4.3 Amidases

As amidases são enzimas que catalisam a hidrólise de amidas aos correspondentes ácidos carboxílicos e amônia. Adicionalmente, amidases catalisam amida ao ácido hidroxâmico na presença de hidroxilamina (Esquema 10, **a** e **b**) (CHEN et al., 2009).

Esquema 10 - (a) Representação da hidrólise de amida. (b) Auação da amidase na formação do ácido hidroxâmico.

As etapas da reação catalisadas por amidase são representadas na figura 9:

Figura 9 - Mecanismo sugerido para reação catalisada por amidase.

- i) o carbono carbonílico do grupo amida sofre um ataque nucleofílico pela enzima levando a formação de um intermediário tetraédrico;
- ii) o intermediário tetraédrico formado é convertido ao complexo acil-enzima, liberando molécula de amônia;
- iii) o carbono carbonílico do complexo acil-enzima sofre ataque nucleofílico por uma molécula de água levando a formação do ácido carboxílico.

As amidases estão envolvidas no metabolismo de organismos procariontes e eucariontes e podem ser divididas em dois tipos:

- i) amidases alifáticas: hidrolisam amidas alifáticas de cadeias curtas ou amidas alifáticas de cadeias médias;
- ii) algumas arilamidases (FOURNAND e ARNAUD, 2001).

As amidases também podem catalisar diversas outras reações tais como: hidrólise de ésteres, conversão de ésteres a ácidos hidroxâmicos, conversão de ácidos carboxílicos a ácidos hidroxâmicos e hidrólise da hidrazida do ácido isonicotínico (isoniazida) (Esquema 11, **a,b,c,d**).

Esquema 11 - Reações catalisadas por amidases.

É importante ressaltar que a maioria das amidases apresentam enantiosseletividade, o que contribui para a síntese de ácido carboxílico quiral através da associação com a enzima nitrila hidratase. As reações catalisadas por amidases enantiosseletivas fornecem compostos opticamente puros de importância farmacêutica tais como, amino ácidos ou ácidos 2-arilpropanóicos.

Assim, uma atenção voltou-se ao isolamento e à descoberta de organismos produtores de amidases, incluindo bactérias, leveduras, fungos, plantas e animais (Tabela 4).

Tabela 4 - Micro-organismos com atividade para amidases.

Micro-organismos	Substratos específicos
<i>Rhodococcus erythropolis</i> MP50	Amida aromática
<i>Geobacillus pallidus</i> RAPc8	Amida alifática
<i>Sulfolobus tokodaii</i> strain 7	Amida aromática
<i>Arthrobacter</i> sp. J-1	Amida alifática
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> M8	Amida alifática
<i>Brevibacterium</i> sp Strain R312	Ariloxipropionamidas
<i>Pseudonocardia thermophila</i>	Alifática, aromática
<i>Pseudomonas</i> sp. MCI3434	Amida heterocíclica
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Amida alifática
<i>Brevibacillus borstelensis</i> BCS-1	Amida aromática e alifática
<i>Ochrobactrum anthropi</i> SV3	Amida aromática e alifática
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain d3	Amida aromática
<i>Sulfolobus solfataricus</i> MT4	Amida alifática e aromática
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTR1	Amida alifática
<i>Bacillus stearothermophilus</i> BR388	Amida alifática com cadeia curta
<i>Delftia tsuruhatensis</i> ZJB-05174	2,2-Dimetilciclopropanoamida

Fonte: Chen et al. Microbiol transformation of nitriles to high-value acids or amides. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 113, p. 33-37, 2009.

Recentemente, um número considerável de produtos, que podem ser utilizados como intermediários para fármacos, aditivos químicos e alimentos, tem sido obtido por reações enzimáticas. Ambas as enzimas que convertem nitrilas (nitrilases e/ou nitrila hidratases e amidases) são potenciais catalisadores para a produção de amidas e ácidos carboxílicos de interesse para aplicação industrial.

1.5 Aplicação de nitrilases, nitrila hidratases e amidases em biocatálise

Essas enzimas são biocatalisadores importantes na indústria de produtos de química fina e farmacêuticos devido às suas elevadas especificidades como, quimio-, regio e enantiosseletividade. Além, de serem utilizadas na desintoxicação de resíduos industriais e na degradação de herbicidas contendo o grupo ciano (THUKU et al., 2009).

1.5.1 Hidrólise de nitrilas racêmicas por nitrilases

Muitas resoluções quimioenzimáticas de *rac*-nitrilas foram realizadas com o objetivo de produzir ácidos α -arilpropionícos com configuração *S*, tais como, o cetoprofeno, ibuprofeno e/ou naproxeno, que são amplamente utilizados como agentes anti-inflamatórios não esteroidais (FABER, 2011).

O ácido (+)-(*S*)-2-(4'-isobutilfenil)propioníco (*S*-ibuprofeno) foi produzido a partir da ($\pm$)-2-(4'-isobutilfenil)propanonitrila (Ibu-CN) pela bactéria *Acinetobacter* sp. AK226 com um excesso enantiomérico de 95% e rendimento de 45% (Esquema 12). (YAMAMOTO et al., 1990). O *S*-ibuprofeno é 160 vezes mais ativo que o *R*-ibuprofeno na inibição da biossíntese das prostaglandinas *in vitro* (CARVALHO et al., 2005).

Esquema 12 - Produção de *S*-ibuprofeno pela nitrilase *S*-enantiosseletiva de *Acinetobacter* sp. AK226.

Outra importante aplicação de nitrilases é a produção comercial do ácido *R*-(-)-mandeléico pelas bactérias *Alcaligenes faecalis* ATCC8750 (Rend.: 91% e ee > 99%) (YAMAMOTO et al., 1991) e *Alcaligenes* sp. ECU0401 (Rend.: 26% e ee > 99,9%) (Esquema 13) (HE et al., 2007). O ácido *R*-(-)-mandeléico apresenta ampla aplicação como intermediário para a produção de produtos

farmacêuticos, como a Cefaclor, um tipo de cefalosporinas, que é um antibiótico usado em infecções bacterianas (XUE et al., 2011).

Esquema 13 - Hidrólise enantiosseletiva de (±)-mandelonitrila catalisada por nitrilase de bactérias.

1.5.2 Hidrólise de nitrilas racêmicas por nitrila hidratase

Em geral, as nitrila hidratases são associadas com as amidases em organismos vivos e, na maioria dos casos, as formações de amidas e ácidos opticamente puros são devido as maiores enantiosseletividades das amidases comparada com as nitrila hidratases. Um número de ácidos e amidas foram obtidos por este método, por exemplo, a síntese enzimática do ácido *S*-naproxeno por *Rhodococcus* sp. C3II e *Rhodococcus erythropolis* MP50 (CHEN et al., 2009).

Ambas cepas bacterianas pela associação nitrila hidratase e amidase foram hábeis em converter o grupo ciano do naproxeno ao ácido *S*-naproxeno [ácido (+)-(*S*)-2-(6-metoxinaftalen-2-il)propanóico] com um excesso enantiomérico > 99% e conversão até 80% (Esquema 14) (CHEN et al., 2009).

Esquema 14 - Hidrólise do (±)-naproxeno por *Rhodococcus* sp. C3II e *Rhodococcus erythropolis* MP50.

Outro exemplo interessante foi a hidrólise enantiosseletiva da (±)-1,4-benzodioxano-2-carbonitrila sob condições brandas ao ácido (+)-(*S*)-1,4-benzodioxano-2-carboxílico (Rend.: 46%, ee 99%) e a (-)-(*R*)-1,4-benzodioxano-2-amida (Rend.: 50%, ee 94%) pela bactéria *Rhodococcus* sp. AJ270 (Esquema 15) (CHEN et al., 2009). Estes compostos são importantes para a indústria farmacêutica, pois são intermediários na obtenção de fármacos (CHEN et al., 2009). Por exemplo, o ácido (-)-(*S*)-1,4-benzodioxano-2-carboxílico é um intermediário quiral para a síntese da *S*-

doxazosina (LIU et al., 2006). A ($\pm$)-doxazosina é uma fármaco comercializado pela Pfizer com o nome de Canduran[®] indicado para o tratamento da hipertensão. O enantiômero *S* de doxazosina tem-se mostrado eficaz no tratamento da hiperplasia prostática benigna (FANG et al., 2001).

Esquema 15 - Biotransformação da ($\pm$)-1,4-benzodioxano-2-carbonitrila por *Rhodococcus* sp. AJ270.

1.5.3 Hidrólise de amidas racêmicas por amidases

Um exemplo de biotransformação industrial catalisada pela amidase de *Comomonas acidivorans* foi a resolução enzimática da ($\pm$)-2,2-dimetilciclopropanamida fornecendo a (*S*)-2,2-dimetilciclopropanamida (Rend.: 35%, ee > 98%) (Esquema 16) (SHAW et al., 2003).

O *S*-isômero é um intermediário utilizado na produção do antibiótico cilastatina, um inibidor da enzima desidropeptidase renal. A cilastatina é comumente administrada em conjunto ao antibiótico imipenem que associados recebem o nome de Tienam[®] indicado para o tratamento de infecções urinárias (BIRNBAUM et al., 1985) Esta associação tem como vantagem inibir a biotransformação renal do imipenem tornando o tratamento mais eficaz (SHAW et al., 2003).

Esquema 16 - Biotransformação da ($\pm$)-2,2-dimetilciclopropanamida por amidase de *Comomonas acidivorans*.

Amidases estereoespecíficas, isoladas de células bacterianas, foram utilizadas na resolução cinética da ($\pm$)-piperazina-2-amida aos ácidos (*S*)- e (*R*)-piperazina-2-carboxílicos. A bactéria *Klebsiella terrigena* DSM 9174 biotransformou a ($\pm$)-piperazina-2-amida ao ácido (-)-(*S*)-

piperazina-2-carboxílico (Rend.: 41%, ee 99,4%), enquanto a bactéria *Burkholderia* sp. DSM 9925 forneceu o ácido (+)-(R)-piperazina-2-carboxílico (Rend: 22%; ee 99%) (Esquema 17) (EICHHORN et al., 1997).

Os ácidos obtidos pertencem à classe de aminoácidos não proteínogênicos e são utilizados como precursores de numerosos compostos bio-ativos (CHEN et al., 2009). Por exemplo, o ácido (-)-(S)-piperazina-2-carboxílico é um intermediário para a síntese do Crixivan[®] (Merk), fármaco utilizado no tratamento do vírus HIV (EICHHORN et al., 1997). A rota biossintética do ácido (-)-(S)-piperazina-2-carboxílico pela *Klebsiella terrigena* DSM 9174 para aplicação comercial foi desenvolvida pela Lonza AG.

Esquema 17 - Hidrólise enantiosseletiva da (±)-piperazina-2-amida por amidases bacterianas.

1.5.4 Dessimetização de di-nitrilas

Uma das características mais importante do uso de enzimas que metabolizam nitrilas é sua habilidade seletiva em converter um grupo ciano de uma nitrila pro-estereogênica, cuja reação é difícil de ocorrer por métodos químicos convencionais (BANERJEE, SHARMA e BANERJEE, 2002).

Um exemplo de dessimetização enantiosseletiva foi a biotransformação da 3-hidroxi-glutaronitrila ao ácido (R)-4-ciano-3-hidroxi-butírico catalisada pela nitrilase BD9570 R-específica, a qual foi expressa em *Pseudomonas fluorescens*. O correspondente ácido foi obtido com excesso enantiomérico variando de 98,6% a 99,4% e uma conversão de aproximadamente 99% (Esquema 18) (BERGERON et al., 2006). O ácido (R)-4-ciano-3-hidroxi-butírico após esterificado é

usado como um intermediário para a síntese do Lipitor[®], fármaco que atua no controle do colesterol e comercializado pela Pfizer (MARTÍNKOVÁ e KREN, 2010).

Esquema 18 - Dessimetração enzimática da 3-hidroxi-glutaronitrila pela nitrilase BD9570.

A dessimetração de nitrilas não é restrita só as nitrilases, também pode ocorrer por nitrila hidratases. Por exemplo, a transformação da 3-(benziloxi)glutaronitrila ao ácido 3-(S)-(benziloxi)pentanoico catalisada pela associação da nitrila hidratase e amidase de *Brevibacterium* sp. B312 fornecendo 65% de rendimento e excesso enantiomérico 88%. O ácido 3-(benziloxi)pentanoico é um intermediário usado na síntese do fármaco Lovastatina[®] utilizado no tratamento de hipercolesterolemia e doenças cardiovasculares (Esquema 19) (MADDRELL et al., 1996).

Esquema 19 - Dessimetração da 3-(benziloxi)glutaronitrila por nitrila hidratase e amidase da *Brevibacterium* sp. B312.

1.5.5 Hidrólise regioseletiva de di-nitrilas

Hidrólise regioseletiva de di-nitrilas por métodos químicos em uma só etapa é difícil de conduzir, enquanto pelo uso de enzimas pode levar a resultados significativos com rendimentos quantitativos em uma só etapa (CHEN et al., 2009).

Nishise et al. relataram a obtenção do ácido *trans*-4-cianocicloexano carboxílico a partir do 1,4-dicianocicloexano por nitrilases da bactéria *Acremonium* sp. (Esquema 20). O ácido *trans*-4-cianocicloexano carboxílico é um intermediário na síntese do ácido tranexâmico (*trans*-4-aminometilciclo-hexano carboxílico) que é um fármaco utilizado no tratamento de hemorragia fetal (NISHISE, KURIHARA e TANI, 1987).

Esquema 20 - Hidrólise regioseletiva do 1,4-dicianocicloexano pela bactéria *Acremonium* sp.

A biotransformação regioseletiva da adiponitrila ao ácido 5-cianovalérico, o qual é utilizado como um intermediário na síntese dos polímeros nylon-6 e nylon-6,6. Esta reação foi catalisada por nitrilases da bactéria *Rhodococcus rhodochrous* K22 (Esquema 21) (BANERJEE, SHARMA e BANERJEE, 2002).

Esquema 21 - Hidrólise regioseletiva da adiponitrila pela nitrilase de *Rhodococcus rhodochrous* K22.

1.5.6 Hidrólise quimiosseletiva de nitrilas

Quanto à atuação das nitrila hidratases, vale destacar duas aplicações bastante significativas do ponto de vista industrial, as quais foram isoladas da bactéria *Rhodococcus rhodochrous* J1.

A produção de acrilamida a partir de acrilonitrila chega a mais de 30.000 ton/ano pela Nitto Chemical (Yokohama, Japão). A reação é extremamente eficiente, produzindo mais de 7 Kg de acrilamida por g/células em 99,97% de conversão (Esquema 22). Além desta cepa bacteriana, a acrilamida também foi obtida pelas bactérias *Pseudomonas chlororapae* e *Brevibacterium* sp. com rendimentos > 99% (KOBAYASHI, NAGASAWA e YAMADA, 1992; BORNSCHEUER e KAZLAUSKAS, 2005). A acrilamida é um importante *commodity* químico para a síntese de vários polímeros (FABER, 2011).

O outro exemplo é a produção de nicotinamida pela conversão de 3-cianopiridina a qual foi comercializada pela Lonza. Sua produtividade chega a 6.000 ton/ano (Esquema 22). A nicotinamida é um nutriente essencial na alimentação para humanos e animais. Em contraste ao processo químico, o processo enzimático não forma o ácido nicótico como sub-produto (BORNSCHEUER e KAZLAUSKAS, 2005; FABER, 2011).

Esquema 22 - Produção de acrilamida e nicotinamida por nitrila hidratases de *R. rhodochorous* J1.

A nitrila hidratase da *Rhodococcus rhodochorous* J1 também foi eficiente em biotransformar a 4-cianopiridina a isonicotinamida ($1,099 \text{ g.L}^{-1}$) precursora da Isoniazida, uma hidrazida do ácido isonicotínico, fármaco utilizado no tratamento contra tuberculose (Esquema 24) (MAUGER, NAGASAWA e YAMADA, 1988; FABER, 2011).

Esquema 23 - Hidrólise quimiosseletiva da 4-cianopiridina pela bactéria *R. rhodochorous* J1.

A bactéria *R. rhodochorous* J1 induzida por ϵ -caprolactama ativou as nitrilases a produzirem o ácido acrílico a partir da acrilonitrila fornecendo 390 g.L^{-1} do composto biotransformado (Esquema 24) (NAGASAWA et al., 1990). O ácido acrílico é um *commodity* químico, cuja produção anual chega 4,2 milhões de toneladas. O ácido acrílico e os seus ésteres são utilizados em tintas, polímeros e papel (CHEN et al., 2009).

Esquema 24 - Hidrólise de ácido acrílico pela *R. Rhodochrous* J1.

A bactéria *Alcaligenes* sp. ECU0401 forneceu o ácido glicólico (ácido 2-hidroxi-acético) a partir da glicolonitrila (2-hidroxi-acetonitrila) pela ação de nitrilases com um rendimento de 96,5% (Esquema 25). O ácido glicólico tem várias aplicações em produtos de cosméticos, como também, é um importante ingrediente no processamento de metais, aditivos de óleo automotivo e polímeros biodegradáveis (HE et al., 2010).

Esquema 25 - Hidrólise do ácido glicólico pela bactéria *Alcaligenes* sp. ECU0401.

1.6 Biodegradação de nitrilas

Devido as nitrilas serem altamente tóxicas, cancerígenas e mutagênicas é necessário controlar e monitorar o descarte dessas organonitrilas no ambiente.

Exemplos típicos destes compostos incluem acrilonitrila, acetonitrila, benzonitrila, entre outros que são amplamente utilizadas em laboratórios e indústrias, como solventes ou como intermediários em produtos farmacêuticos, plásticos, borrachas sintéticas, intermediários de fármacos (blocos quirais), herbicidas [bromoxinil (3,5-dibromo-4-hidroxibenzonitrila), ioxinil (3,5-diiodo-4-hidroxibenzonitrila, diclorobenil (2,6-diclorobenzonitrila)] e pesticidas (Figura 10) (CHEN et al., 2009).

Figura 10 - Exemplos de herbicidas contendo o grupo ciano.

Muitos estudos de biodegradação de nitrilas vem sendo realizado devido ao enorme potencial demonstrado pelas enzimas que convertem o grupo ciano.

Em relação aos herbicidas, por exemplo, diclorobenil e bromoxinil (Figura 10) uma exposição prolongada pode resultar em alguns sintomas, como a perda de peso, vômito, febre, dores de cabeça (BANERJEE, SHARMA e BANERJEE, 2002). Assim, as enzimas que metabolizam nitrilas tornam-se eficazes para impedir que estes herbicidas entrem na cadeia alimentar e causem danos à saúde. A degradação dos herbicidas bromoxinil, diclorobenil e ioxinil foi realizada pela bactéria *Agrobacterium radiobacter* por ação da nitrila hidratase. A eficácia da degradação foi alcançada pela adição de íons de ferro ou cobalto ao meio de cultura (VOSÁHLOVÁ et al., 1997; MULLER e GABRIEL, 1999).

Os efluentes oriundos da síntese de acrilonitrila são constituídos de acrilamida, ácido acrílico, acroleína, fumaronitrila, succinonitrila e maleimida, além da acrilonitrila (Figura 11). Wyatt e Knowles realizaram um estudo microbiano para degradar os efluentes industriais de acrilonitrila, para tanto foi preparado uma cultura mista de bactérias, as quais foram cultivadas em meio de cultura na presença dos efluentes industriais da síntese da acrilonitrila. A partir deste estudo, foi observado a degradação completa de todos os componentes residuais frente a cultura bacteriana mista (WYATT e KNOWLES, 1995).

Figura 11 - Estruturas dos compostos presentes em efluentes industriais a partir da acrilonitrila.

Recentemente, um processo para degradação microbiana de organonitrilas (acetonitrila, acrilonitrila e benzonitrila) foi avaliado (CHEN et al., 2009). A degradação dessas nitrilas foi investigada a partir de micro-organismos presentes em lodo ativado em uma estação de tratamento de água de resíduos farmacêuticos, cujo crescimento dos micro-organismos foram adaptados na presença de acetonitrila como única fonte de carbono e nitrogênio (LI et al., 2007). A biodegradação de acetonitrila e acrilonitrila aos seus correspondentes ácidos carboxílicos ocorreu por dois caminhos. Inicialmente, foi obtida as amidas correspondentes (acetamida e acrilamida), posteriormente os respectivos ácidos acético e acrílico, e em ambas reações formaram a amônia. Enquanto, a biodegradação da benzonitrila ocorreu por um único caminho, com a produção direta de ácido benzóico e amônia (Esquema 26).

Esquema 26 - Biodegradação da acetonitrila (**a**), acrilonitrila (**b**) e benzonitrila (**c**).

Através dos resultados obtidos foi sugerido por Li et al. que independente do substrato, a adaptação do meio de cultura destes micro-organismos pode desenvolver caminhos de degradação distintos, seja *via* nitrila hidratase seguida por amidase ou *via* nitrilase (LI et al., 2007).

Destacando alguns aspectos relevantes das enzimas nitrilases e/ou nitrila hidratases, seguida de amidases presente nas reações de hidrólise de nitrilas e considerando que as reações relatadas na literatura até o momento são por micro-organismos terrestres (fungos, leveduras e bactérias) ou por plantas, despertou-nos o interesse em explorar reações com nitrilas a partir de fungos de ambiente marinho para verificar o seu potencial diante desse versátil grupo funcional. Vale ressaltar que no Brasil, para nosso conhecimento, não há nenhum estudo de biotransformação de nitrilas a partir de micro-organismos de origem marinha.

No presente trabalho, é apresentado um estudo de otimização das condições reacionais para biotransformação de nitrilas partindo de um *screening* com cepas de fungos de origem marinha frente à fenilacetonitrila **1**, seguido de reações de biotransformações a partir de diferentes classes de nitrilas com o fungo *Aspergillus sydowii* CBMAI 934.

2 OBJETIVOS

- Geral

Biotransformação de nitrilas por fungos de origem marinha.

- Específicos

- Promover um *screening* com fungos de origem marinha frente à fenilacetoneitrila **1** para explorar o potencial catalítico destes micro-organismos tanto em meio sólido, quanto em meio líquido mineral;
- Selecionar fungos marinhos capazes de promover a biotransformação da fenilacetoneitrila **1** em meio líquido mineral;
- Verificar se as enzimas presentes nos fungos marinhos, que biotransformam nitrilas, são construtivas ou constitutivas;
- Realizar reações de hidrólise de nitrilas com diferentes tipos desta classe funcional, como; nitrilas arilalifáticas, alifáticas, aromáticas e hetero-aromáticas com o fungo de origem marinha *Aspergillus sydowii* CBMAI 934.

Na figura 12, encontram-se as classes de nitrilas selecionadas para as reações de hidrólise enzimática com o fungo de ambiente marinho selecionado a partir do *screening*.

Figura 12 - Classes de nitrilas selecionadas para serem biotransformadas pelo fungo de ambiente marinho *Aspergillus sydowii* CBMAI 934.

Nitrilas arilalifáticas

- $R_1 = R_2 = R_3 = H$, fenilacetona (1)
 $R_1 = R_2 = H$, $R_3 = F$, 4-fluorofenilacetona (2)
 $R_1 = R_2 = H$, $R_3 = Cl$, 4-clorofenilacetona (3)
 $R_1 = R_2 = H$, $R_3 = OCH_3$, 4-metoxifenilacetona (4)
 $R_1 = CH_3$, $R_2 = R_3 = H$, 2-metilfenilacetona (5)
 $R_1 = R_3 = H$, $R_2 = CH_3$, 3-metilfenilacetona (6)
 $R_1 = R_2 = H$, $R_3 = CH_3$, 4-metilfenilacetona (7)

Nitrilas alifáticas

- 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetona (8) 3-hidroxipentanodinitrila (9)

Nitrila quiral

- rac*-mandelonitrila (10)

Nitrilas aromáticas

- $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$, benzonitrila (11)
 $R_1 = Cl$, $R_2 = R_3 = R_4 = H$, 2-clorobenzonitrila (12)
 $R_1 = R_2 = R_4 = H$, $R_3 = OH$, 4-hidroxibenzonitrila (13)
 $R_1 = R_2 = R_4 = H$, $R_3 = OMe$, 4-metoxibenzonitrila (14)
 $R_1 = R_3 = H$, $R_2 = R_4 = OMe$, 3,5-dimetoxibenzonitrila (15)

- orto*-nitrobenzonitrila (16)
meta-nitrobenzonitrila (17)
para-nitrobenzonitrila (18)

Nitrilas hetero-aromáticas

- 2-cianopiridina (19)

- 4-cianopiridina (20)

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Micro-organismos

Os fungos de origem marinha apresentados neste trabalho foram isolados de organismos marinhos (esponjas e alga) coletados pelo grupo do Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck (IQSC) no litoral norte do estado de São Paulo, na cidade de São Sebastião. O isolamento, cultivo e armazenamento foram realizados pelo grupo da Profa. Dra. Mirna H. R. Seleglim do Laboratório de Ecologia e Micro-organismos Marinhos (UFSCar). Os fungos foram identificados pela Dra. Lara D. Sette no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade de Campinas (CPQBA/UNICAMP) e depositados na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria da Universidade de Campinas (CBMAI/UNICAMP).

A identificação baseou-se na utilização de métodos de taxonomia convencional e taxonomia molecular. Os fungos foram identificados baseados nas observações macro e microscópicas e seguindo os métodos descritos em literatura (PITT, 1979; SAMSON et al., 2002).

As cepas fúngicas marinhas utilizadas nas reações biocatalíticas com seus respectivos códigos CBMAI e a descrição da fonte isolada encontram-se na tabela 5.

Tabela 5 - Fungos de ambiente marinho utilizados na triagem frente à fenilacetonnitrila 1.

Fonte isolada	Fungo	Código CBMAI
<i>Geodia corticostylifera</i> (esponja)	<i>Penicillium miczynskii</i> Gc5	930
	<i>Aspergillus sydowii</i> Gc12	933
	<i>Penicillium raistrickii</i> Ce16	931
<i>Chelonaplysilla erecta</i> (esponja)	<i>Aspergillus sydowii</i> Ce19	934
	<i>Aspergillus sydowii</i> Ce15	935
	<i>Bionectria</i> sp.Ce5	936
	<i>Penicillium decaturense</i> DR(F)2	1234
<i>Dragmacidon reticulate</i> (esponja)	<i>Penicillium raistrickii</i> DR(B)2	1235
	<i>Cladosporium</i> sp. DR(A)2	1237
	<i>Aspergillus sydowii</i> DR(M3)2	1241
<i>Caulerpa</i> sp. (alga)	<i>Penicillium oxalicum</i> F30	1185
	<i>Penicillium citrinum</i> F53	1186

3.2 Crescimento dos micro-organismos

3.2.1 Composição dos meios de cultura

3.2.1.1 Composição do meio de cultura sólido e líquido para crescimento e cultivo dos fungos de origem marinha e biotransformação de nitrilas.

i) *Procedimento para preparar o meio líquido de malte 2% (M2)*: Em um recipiente de 2 L foram adicionados 1 L de água do mar artificial, 20 g de extrato de malte. A mistura foi agitada e o pH do meio foi ajustado para 7,5 com solução de KOH 0,7 M ou HCl 0,5 M.

ii) *Procedimento para preparar o meio sólido de malte 2% (MA2)*: Em um recipiente de 2 L foram adicionados 1 L de água do mar artificial, 20 g de extrato de malte e 15 g de ágar. A mistura foi agitada e o pH do meio foi ajustado para 7,5 com solução de KOH 0,7 M ou HCl 0,5 M.

iii) *Procedimento para preparar o meio sólido e líquido mineral suplementado com glicose*: Em um recipiente de 2 L foram adicionados 1 L de meio mineral, 15 g de glicose e 15 g de ágar. A mistura foi agitada e o pH do meio foi ajustado para 7,5 com solução de KOH 0,7 M ou HCl 0,5 M.

O meio líquido foi preparado nas mesmas condições, porém na ausência de ágar.

Após o ajuste de pH todos os meios de cultura foram autoclavados por 20 min a 121°C (1,5 Kpa).

Aos meios minerais sólidos e líquidos suplementados com glicose após serem autoclavados e atingirem as temperaturas 50°C e 25°C, respectivamente, foi adicionada a fenilacetoneitrila **1**.

3.2.1.2 Composição de sais para o preparo da água do mar artificial (1 L):

CaCl₂·2H₂O (1,36 g), MgCl₂·6H₂O (9,68 g), KCl (0,61 g), NaCl (30,0 g), Na₂HPO₄ (0,014 mg), Na₂SO₄ (3,47 g), NaHCO₃ (0,17 g), KBr (100,0 mg), SrCl₂·6H₂O (40,0 mg), H₃BO₃ (30,0 mg).

3.2.1.3 *Composição de sais para preparo do meio mineral suplementado de glicose (1 L)*: Glicose (15 g), Na₂HPO₄ (1 g), MgCl₂·7H₂O (0,5 g), KCl (0,5 g), FeSO₄·7H₂O (0,01 g), CoCl₂·6H₂O (0,001 g), ZnSO₄·7H₂O (0,0067 g) (KAPLAN et al., 2004).

As cepas fúngicas utilizadas para as reações biocatalíticas foram preservadas em placas Petri ou tubo de ensaio inclinado em meio de malte 2% (MA2) em geladeira a 4°C e os repiques para manutenção das cepas foram realizados a cada três meses. Todos os meios de cultura utilizados foram da marca Acumedia®.

3.3 Métodos de análises, identificação e caracterização dos compostos

3.3.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de próton (RMN de ¹H) foram obtidos em espectrômetros do tipo Bruker/AC 200 (CAQI-IQSC) operando na frequência de 200 (RMN ¹H) e 50 MHz (RMN de ¹³C) e Bruker/AC 400 (DQ-UFSCar, sob coordenação do Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira) operando na frequência 400 MHz (RMN ¹H) e 100 (RMN ¹³C). Os solventes deuterados utilizados na dissolução das substâncias foram acetona [(CD₃)₂CO] e clorofórmio (CDCl₃). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados para RMN de ¹H pelo sinal do hidrogênio pertencente à molécula do TMS e do solvente deuterado utilizado: acetona (δ 2,05) e clorofórmio (δ 7,27). Para RMN de ¹³C, o padrão foi o sinal do carbono-13 do solvente: acetona (δ 29,9 e 206,6) e clorofórmio (δ 77,2).

3.3.2 Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (EM-IES)

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos a partir de um aparelho Bruker Daltonics Micro TOF, com detector ESI-TOF (*electron spray ionization - time of flight*) operando em modo positivo e/ou negativo. Essas análises foram realizadas pela Central Analítica do Instituto de Química de São Paulo (IQ-USP) e no Instituto de Química de São Carlos no Laboratório de Cromatografia (Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças).

3.3.3 Espectrometria na região de absorção do Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier Bomem/MB-102 e calibração interna. Estas análises foram realizadas na CAQI. As amostras foram preparadas na forma de filmes (produtos líquidos) e em pastilhas de KBr (produtos sólidos) e as frequências de absorção foram expressas em cm^{-1} .

3.3.4 Cromatografia a Gás Acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM)

As análises por cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas foram obtidas em um aparelho Shimadzu/GC-2010 equipado com auto injetor Shimadzu/AOC-5000 e detector de massas (Shimadzu MS2010plus) com impacto de elétrons (IE, 70eV) no Instituto de Química de São Carlos (Prof. Dr. André Luiz Meleito Porto). O forno do cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama foi equipado com uma coluna de sílica fundida DB-5 (J&W Scientific, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), com as temperaturas do injetor e do detector, ambas a 250°C, e temperatura inicial de aquecimento 50°C e final 270°C. Taxa de aquecimento do forno a 10°C/min e tempo de análise de 32 min. O gás de arraste foi o hélio a 63 kPa.

3.4 Métodos Cromatográficos

3.4.1 Cromatografia de adsorção

As cromatografias de adsorção foram realizadas sobre coluna de sílica gel *flash* 60 (0.035–0.075 mm) da Across Organics. Para cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizados cromatofolhas de alumínio de gel de sílica 60 F₂₅₄ da Sorbent Technologies com espessura de 0,20 mm contendo indicador de fluorescência. Os eluentes utilizados foram: hexano, diclorometano e acetato de etila puros ou combinados para produzir soluções de polaridade crescentes.

A revelação das cromatofolhas foi realizada através da exposição desta à luz ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 356 nm), seguida por aspersão de uma solução de ácido fosfomolibdico (6,5 g de ácido fosfomolibdico em 100 mL de álcool etílico) e aquecimento em chapa aquecedora 110°C por aproximadamente 5 min. Para as fases móveis foram determinadas as misturas de solventes mais adequadas para cada composto.

3.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As separações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram realizadas na CAQI em aparelho da marca Shimadzu modelo LC-20AT equipado com detector SPD 10AV (UV/VIS), degaseificador DGU-20A3, central de controle CBM-20AV, injetor automático Sil-20A e forno CTO 20-A. Como fase móvel utilizou-se a mistura de hexano/isopropanol (9:1) grau CLAE com um fluxo de 1,0 mL/min e como fase estacionária coluna quiral Chiracel OD-H (0.46x25 cm) da marca Daicel®.

3.4.3 Cromatografia a Gás (CG)

As análises por cromatografia a gás foram obtidas em um cromatógrafo a gás Shimadzu/GC-2010 equipado com auto injetor Shimadzu/AOC20s com um detector de ionização de chama (DIC) (flame ionization detector-FID) no Laboratório de Química Orgânica e Biocatálise no Instituto de Química de São Carlos (Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto). As colunas utilizadas foram:

- i) coluna capilar de sílica fundida da J&W Scientific DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), com as temperaturas do injetor e do detector ambas a 250°C;
- ii) coluna capilar de sílica fundida VARIAN WCOT (25 m x 0,25 mm x 0,39 µm), fase estacionária CP-Chirasil-Dex CB, com as temperaturas do injetor e do detector ambas a 200°C. O gás de arraste foi o nitrogênio (74 kPa). As condições de análise utilizadas para cada composto foram determinadas e encontram-se na tabela 6.

3.5 Evaporador rotativo

Para remoção dos solventes das soluções orgânicas foi utilizados os rota-evaporadores Fisaton e Tecnal T-210 ambos equipados com bomba de vácuo TE-058 e refrigeração Tecnal Modelo TE-2005.

3.6 Agitador orbital rotativo termostatizado

O crescimento dos fungos e as reações de biocatálise foram realizados em agitadores rotativos modelo Tecnal TE-421, Superohm G-25 ou SI-600R da Analítica.

3.7 Outros equipamentos

Balança analítica modelo AY-220 marca Shimadzu, pHmetro modelo 8010 da marca Qualxtron, autoclave vertical modelo Phoenix, capela de fluxo laminar marca Veco, vortex Motion da Logen Scientific, centrífuga da Hermle Z 200 A e UV modelo TE-540 da Tecnal. Os pontos de fusão foram determinados usando aparelho da Fisatom 430 D do laboratório de Síntese Orgânica no Instituto de Química de São Carlos (Prof. Dr. Antônio C. B. Burtoloso).

Tabela 6 - Métodos utilizados nas análises dos compostos por cromatografia a gás.

Composto	T _i (°C)	t _i (min)	T _f (°C)	t _f (min)	r (°C/min)	tr (min)	tc (min)
1	100	2	160	2	5	7,9	16
1a	100	2	160	2	5	10,2	16
2	100	2	160	2	5	8,1	16
2a	100	2	160	2	5	10,5	16
1 e 3	100	1	210	5	10	6,2 e 7,1	17
1a/3a	100	1	210	5	10	7,6 e 10,4	17
1/4	120	1	210	5	10	4,7 e 7,6	15
1a/4a	120	1	210	5	10	5,9 e 8,9	15
5	100	2	160	2	5	10,4	16
5a	100	2	160	2	5	12,9	16
6	100	2	160	2	5	10,1	16
6a	100	2	160	2	5	12,7	16
7	100	2	160	2	5	10,3	16
7a	100	2	160	2	5	12,8	16
8	100	2	160	2	5	8,3	16
8a	100	2	160	2	5	10,0	16
1/1a/9	80	1	170	1	5	6,7; 9,5 e 9,8	15
10	100	2	160	2	5	5,6	16
10b	100	2	160	2	5	5,6	16
10c	100	2	160	2	5	6,6	16
10	100 – 175 (10°C)	2	180	5	5	3,6	15,5
1b	100 – 175 (10°C)	2	180	5	5	7,1	15,5
10a	100 – 175 (10°C)	2	180	5	5	R: 7,5; S: 7,8	15,5
10b	100 – 175 (10°C)	2	180	5	5	3,6	15,5
10c	100 – 175 (10°C)	2	180	5	5	5,3	15,5
11/1/1b	80	1	150	5	10	5,9; 8,4 e 10,2	13
1/12/1b	120	2	210	5	10	4,9; 5,3 e 6,0	15
1/1b/13	120	2	210	5	10	4,9; 5,9 e 7,8	15
1/1b/13	100	2	180	5	10	6,4; 7,7 e 8,2	14
1/1b/15	120	2	220	5	10	5,9; 6,9 e 11,2	16
1/16	100	2	210	2	10	4,3 e 7,4	17
1/17	100	2	210	2	10	4,3 e 6,5	17
1/18	100	2	210	2	10	6,2 e 9,3	17
1b/18a	100	2	210	2	10	7,9 e 10,6	17
11/19	100	2	160	2	5	5,0 e 6,3	16
1b/19a	100	2	160	2	5	10,2 e 10,6	16
20/11	100	2	160	2	5	4,8 e 5,1	16

□ coluna DB-5 (25m x 0,25 mm e filme 0,25 µm)

■ coluna VARIAN WCOT Fused Sílica 25 m x 0,25 mm x 0,39 µm, fase estacionária CP-Chirasil-Dex CB

3.8 Reagentes e Solventes

As nitrilas (**1**, **3**, **4**, **7**, **8**, **10**, **11**, **16-18**) e a 2-coumaranona **1c** foram adquiridas pela Sigma Aldrich. As nitrilas **2**, **12-15** foram gentilmente doadas pela Profa. Dra. Arlene G. Corrêa (DQ/UFSCar, São Carlos) e as nitrilas **5**, **6**, **19** e **20** foram gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Leandro Helgueira Andrade (IQ-USP, SP) e a nitrila **9** foi fornecida pelo Prof. Dr. Maurício M. Victor do IQ/UFBA. O benzaldeído **10b** e álcool benzílico **10c** foram doados pelo Laboratório de Ensino do IQSC. Os solventes (hexano, diclorometano e acetato de etila) foram obtidos pela Synth, os quais foram utilizados sem prévia purificação. Os solventes graus HPLC e os solventes

deuterados foram adquiridos pela Tedia Brasil. Os sais utilizados para preparação do meio de cultura também foram obtidos de fontes comerciais (Synth, Merck e/ou Vetec).

3.9 Síntese dos padrões

3.9.1 Ácido fenilacético **1a**

Em um balão de 50 mL sobre um sistema de refluxo e agitação magnética contendo uma solução de 2 mL de hidróxido de sódio a 10% foi adicionado a fenilacetonitrila **1** (146,7 mg; 1,08 mmol) dissolvida em MeOH (2 mL). A mistura reacional foi mantida à temperatura de 110°C durante 18h (Esquema 27). A reação foi monitorada por CCD.

Cessada a reação, foi extraída com diclorometano (3 x 10 mL). O produto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando sílica *flash* e eluída com uma mistura de solventes Hex/AcOEt (7:3). O rendimento para o ácido fenilacético **1a** foi de 75% (126 mg; 0,82 mmol). O produto sintetizado apresentou-se como um sólido cristalino de cor amarelo claro (p.f.: 74-76°C; lit.: 75-77°C). A estrutura do ácido fenilacético **1a** foi confirmada por RMN de ^1H e de ^{13}C e comparado com dados da literatura (MCNULTY e DAS, 2009).

Ácido fenilacético **1a**: RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3,67 (s, 2H, H_2); 7,27-7,39 (m, 4H, aromáticos); RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3): δ 41,0; 127,3; 128,6; 129,3; 133,2; 177,9. IV: 3099-2920 cm^{-1} (O-H), 3029 cm^{-1} (C-H sp^2), 2954 e 2920 cm^{-1} (C-H sp^3), 1701 cm^{-1} (C=O), 1602 a 1454 cm^{-1} (C=C), 1242 cm^{-1} (C-O).

Esquema 27 - Preparação do ácido fenilacético **1a**.

3.9.2 2-Piridinamida **19a**

Em um balão de 25 mL contendo 200 mg (1,92 mmol) de 2-cianopiridina em banho de gelo foi adicionado 0,49 mL ($3,88 \times 10^{-3}$ mmol) de cloretotrimetilsilano (TMSCl). Em seguida foi adicionado lentamente 69 μL de H_2O e a reação foi aquecida e mantida a uma temperatura de 25°C por 4h (Esquema 28). Após este tempo, a reação foi transferida a banho de gelo e, em seguida neutralizada com NaHCO_3 , extraída com CH_2Cl_2 (3 x 10 mL) e seca com MgSO_4 anidro (BASU e LUO, 1998).

O produto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando sílica *flash* e eluída com uma mistura de solvente Hex/AcOEt (1:1) e adição de algumas gotas de ácido acético. O

rendimento do produto obtido após purificação foi de 68% (65 mg; 0,53 mmol). O composto apresentou-se como um aspecto de óleo viscoso de cor amarela.

A estrutura da 2-piridinamida foi confirmada por GC-MS, RMN de ^1H e de ^{13}C ao comparar com dados da literatura (SINGHA et al., 1998).

2-Piridinamida **19a**: RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 8,58 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H); 8,21 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H); 7,86 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H, H_{pi} e H_{a}); 7,46 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H); 6,17 (sl, 1H, H_{b}); RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 122,4; 128,4; 137,3; 148,2; 149,3; 166,9. IV: 3413-3180 cm^{-1} (N-H), 1662 cm^{-1} (C=O) (NIELSEN et al.; 2011).

Esquema 28 - Preparação da 2-piridinamida **19a**.

3.10 Triagem de fungos marinhos em meio enriquecido com malte 2%

3.10.1 Seleção dos fungos frente à fenilacetonnitrila **1** em meio líquido com malte 2%

Inicialmente dois tipos de experimentos foram realizados para triagem com os fungos de origem marinha (*Penicillium miczynskii* CBMAI 930, *Aspergillus sydowii* CBMAI 933, *Aspergillus sydowii* CBMAI 934, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935 e *Bionectria* sp. CBMAI 936).

No primeiro experimento, para cada fungo foi preparado 100 mL de meio líquido em água do mar artificial e enriquecido de extrato de malte (2%) (item 3.2.1.1, i, pág. 34). O inóculo de cada fungo em meio líquido (M2) foi realizado em frasco Erlenmeyer de 250 mL e o crescimento foi realizado em agitador rotativo (32°C e 124 rpm) por 5 dias. Após o crescimento microbiano foi adicionado a fenilacetonnitrila **1** (50 μL ; 0,43 mmol) e alíquotas foram retiradas a cada 24h em um período de 4 dias, extraídas, centrifugadas e analisadas por GC-FID.

Ao segundo experimento, foram preparados 100 mL de meio líquido em água do mar artificial e enriquecido de extrato de malte (2%) (item 3.2.1.1, i, pág. 34) em frasco Erlenmeyer de 250 mL, e junto ao inóculo de cada fungo foi adicionada a fenilacetonnitrila **1** (50 μL ; 0,43 mmol). O fungo cresceu nas mesmas condições descritas para o primeiro experimento por um período de 8 dias. As alíquotas foram retiradas a cada 24h, extraídas, centrifugadas e analisadas por GC-FID.

3.11 Triagem de fungos marinhos em meio mineral suplementado com glicose e fenilacetoneitrila 1

3.11.1 Crescimento dos fungos marinhos em meio de cultura sólido na presença e ausência de fenilacetoneitrila 1

Partindo de dados da literatura (KAPLAN et al., 2006b e SNADROVA et al., 2004) uma metodologia foi desenvolvida para o crescimento dos fungos de origem marinha, utilizando-se um meio mineral suplementado com glicose e tendo como única fonte de nitrogênio a fenilacetoneitrila 1. Assim, realizou-se uma triagem com 12 cepas fúngicas de origem marinha: *Penicillium miczynskii* CBMAI 930, *Penicillium raistrickii* CBMAI 931, *Aspergillus sydowii* CBMAI 933, *Aspergillus sydowii* CBMAI 934, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Bionectria* sp. CBMAI 936, *Penicillium oxalicum* CBMAI 1185, *Penicillium citrinum* CBMAI 1186, *Penicillium decaturense* CBMAI 1234, *Penicillium raistrickii* CBMAI 1235, *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 e *Aspergillus sydowii* CBMAI 1241 (Figura 13).

Figura 13 - Colônias dos fungos *A. sydowii* CBMAI 934 (a), *A. sydowii* CBMAI 935 (b), *Bionectria* sp. CBMAI 936 (c), *A. sydowii* CBMAI 1241 (d), *P. raistrickii* CBMAI 1235 (e), *P. decaturense* CBMAI 1234 (f) e *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 (g) cultivados em malte 2%, 8 dias, 32°C.

Para cada fungo foi preparado duas placas de Petri com meio de cultura mineral sólido suplementado com glicose (item 3.2.1.1, iii, pág. 34), uma na ausência (controle) e outra na presença de fenilacetoneitrila 1. A primeira triagem foi realizada com 5 μ L (0,04 mmol) de

fenilacetoneitrila **1** a cada 25 mL de meio de cultura mineral distribuído pela placa de Petri. Após o meio de cultura atingir uma temperatura de aproximadamente 50°C adicionou-se a nitrila e homogeneizou-se antes de transferir para as placas de Petri. As placas foram incubadas em estufa por 48h para descartar a possibilidade de contaminação. Após este período, os requipes dos fungos foram realizados a partir de cepas puras previamente cultivadas em meio MA2 (item 3.2.1.1, ii, pág. 35). O repique foi realizado com um auxílio de uma agulha de inoculação realizando-se 5 pontos diferentes na placa Petri. Em seguida, as placas foram incubadas em uma estufa a 32°C por 8 dias. O crescimento dos fungos foi observado medindo-se o crescimento das colônias na superfície das placas tanto para o controle, quanto para as placas que continham a fenilacetoneitrila **1**.

Os fungos que apresentaram um bom crescimento microbiano na quantidade de 5 µL de fenilacetoneitrila **1** foram, sucessivamente, selecionados para maiores quantidades: 10 µL (0,08 mmol), 15 µL (0,12 mmol) e 20 µL (0,16 mmol) por placa, seguindo o mesmo protocolo descrito no parágrafo anterior até obter-se a inibição do crescimento microbiano.

3.11.2 Crescimento dos fungos em meio de cultura líquido na presença e ausência de fenilacetoneitrila **1**

Para a triagem realizada em meio líquido utilizou frascos Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de meio mineral suplementado com glicose (item 3.2.1.1, ii, pág. 34) e foi adicionado diferentes quantidades de fenilacetoneitrila **1** (20, 40 e 60 µL). Para cada fungo: *Penicillium raistrickii* CBMAI 931, *Aspergillus sydowii* CBMAI 933, *Aspergillus sydowii* CBMAI 934, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Bionectria* sp. CBMAI 936, *Penicillium decaturense* CBMAI 1234, *Penicillium raistrickii* CBMAI 1235 e *Aspergillus sydowii* CBMAI 1241. Para cada fungo foi preparado quatro frascos Erlenmeyer de 250 mL um com meio mineral, um na ausência (controle) e os outros três na presença de diferentes quantidades de fenilacetoneitrila **1**.

A fenilacetoneitrila **1** foi adicionada simultaneamente ao inóculo dos fungos. Realizaram-se os inóculos dos fungos transferindo-se com auxílio de uma espátula oito fragmentos de ágar (5 x 5 mm) contendo os micélios dos fungos previamente cultivados na presença de fenilacetoneitrila **1** (60 µL; 0,50 mmol). Em seguida, deixou-se à temperatura de 32°C e em rotação a 124 rpm para ocorrer o crescimento dos fungos e a cada 24h foram retiradas alíquotas (2 mL), extraídas com acetato de etila, centrifugadas (6.000 rpm / 6min) e analisadas por GC-FID. Após 8 dias de reação, os experimentos foram cessados, filtrados em funil de Buchner e extraídos com acetato de etila (3 x 50 mL), às fases orgânicas foram adicionadas Na₂SO₄ anidro, em seguida as amostras foram rotaevaporadas e analisadas no GC-FID (Fluxograma 1). Após todos os experimentos terem sido filtrados, as massas miceliais correspondentes a cada quantidade de fenilacetoneitrila **1** adicionada ao meio foram secas em estufa a 32°C por 24h para posteriormente serem pesadas e comparadas.

Fluxograma 1 - Etapas de preparação das frações oriundas das reações enzimáticas com os fungos de origem marinha induzidos pela fenilacetoneitrila **1**.

3.11.3 Isolamento e purificação do produto biotransformado a partir da fenilacetoneitrila **1** pelo fungo *Aspergillus sydowii* CBMAI 934

Foram preparados 5 frascos Erlenmeyer de 250 mL com meio mineral suplementado com glicose e fenilacetoneitrila **1** (60 µL; 0,50 mmol), e o substrato foi adicionado simultaneamente ao inóculo do fungo *A. sydowii* CBMAI 934, como descrito no item 3.11.2 (Pág. 41). Após 96h de reação foi adicionado mais 60 µL de fenilacetoneitrila **1**. Alíquotas (2 mL) foram retiradas a cada 24h, durante 8 dias, extraídas com acetato de etila (2 mL), centrifugadas (6.000 rpm / 6min) e analisadas por GC-FID.

Após 8 dias de reação, os experimentos foram cessados, reunidos e filtrados em funil de Buchner. O caldo enzimático foi extraído com acetato de etila (3 x 50 mL), à fase orgânica foi adicionada Na₂SO₄ anidro, filtrada e rotaevaporada. Às células úmidas do fungo *A. sydowii* CBMAI 934 (16,0 g) foi adicionado 100 mL de água destilada e submetidas à agitação magnética por 30 min, em seguida, foi adicionado 50 mL de acetato de etila e agitadas por mais 30min, posteriormente o material foi submetido a uma partição líquido-líquido com acetato de etila (2 x 50 mL). À fase orgânica foi adicionado Na₂SO₄ anidro, filtrada e rotaevaporada. Tanto a fase orgânica

correspondente ao caldo enzimático, quanto às células úmidas foram analisadas no GC-FID. O extrato foi submetido a purificação por coluna cromatográfica utilizando sílica *flash*. A separação foi feita em gradiente utilizando uma mistura de Hex/AcOEt (9:1, 8:2, 7:3, 1:1). A eluição foi monitorada por CCD com um sistema de eluentes Hex/AcOEt (7:3). As frações coletadas correspondentes foram reunidas por similaridade fornecendo uma massa de 294,4 mg para o produto biotransformado (Fluxograma 2).

A estrutura do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético foi sugerida pelos dados preliminares fornecidos pelas bibliotecas Nist e Nist 5 do GC-EM e confirmada por HRMS, IV, ponto de fusão, RMN de ^1H e de ^{13}C , e por comparação com dados da literatura (YANG e FU, 2010).

Fluxograma 2 - Biotransformação da fenilacetonnitrila **1** pelo fungo *Aspergillus sydowii* CBMAI 934.

3.12 Biotransformação da 4-fluorofenilacetoni-trila **2**, 4-clorofenilacetoni-trila **3**, 4-metoxifenilacetoni-trila **4**, 2-metilfenilacetoni-trila **5**, 3-metilfenilacetoni-trila **6** e 4-metilfenilacetoni-trila **7** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934

Inicialmente, para cada nitrila foram preparados três frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo meio mineral suplementado com glicose e fenilacetoni-trila **1** (60 µL; 0,50 mmol), a qual foi adicionada simultaneamente ao inóculo do fungo (item 3.11.2, pág. 41). Após o crescimento microbiano (96h), foi adicionado as nitrilas **2-7**: 4-fluorofenilacetoni-trila **2** [20 µL (0,17 mmol), 40 µL (0,34 mmol), 60 µL (0,51 mmol)]; 4-clorofenilacetoni-trila **3** [20 µL (0,16 mmol), 40 µL (0,32 mmol), 60 µL 0,48 mmol)]; 4-metoxifenilacetoni-trila **4** [20 µL (0,15 mmol), 40 µL (0,30 mmol), 60 µL 0,45 mmol)]; 2-metilfenilacetoni-trila **5** [20 µL (0,16 mmol); 40 µL (0,32 mmol); 60 µL (0,48 mmol)]; 3-metilfenilacetoni-trila **6** [20 µL (0,15 mmol), 40 µL (0,30 mmol); 60 µL (0,45 mmol)]; 4-metilfenilacetoni-trila **7** [20 µL (0,15 mmol), 40 µL (0,30 mmol), 60 µL 0,45 mmol)]. Alíquotas foram retiradas a cada 24h, durante 4 dias, extraídas com acetato de etila (2 mL), centrifugadas (6.000 rpm / 6min) e analisadas por GC-FID.

Os experimentos correspondentes às nitrilas **2, 3** (20, 40 e 60 µL) e **5-7** (20 µL) foram cessados após 24h de reação. Enquanto, aos experimentos correspondentes a nitrila **4** (20, 40 e 60 µL) e as nitrilas **5-7** nas quantidades de 40 e 60 µL foram cessados após 96h de reação. Após cessados todos os experimentos, estes foram filtrados em funil de Buchner e extraídos com acetato de etila (3 x 50 mL). À fase orgânica foi adicionado Na₂SO₄ anidro, seguida de filtração, evaporação e submetida à análise por GC-FID.

3.12.1 Isolamento e purificação dos produtos biotransformados das nitrilas **2-7** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934

a) 4-Fluorofenilacetoni-trila **2**, 4-clorofenilacetoni-trila **3** e 4-metoxifenilacetoni-trila **4**

Para as reações correspondentes a cada nitrila foram preparados 6 frascos Erlenmeyer (250 mL) e a cada reação foi adicionada 60 µL (0,50 mmol) de fenilacetoni-trila **1**, simultaneamente ao inóculo do fungo (item 3.11.2, pág. 41). Após 96h, foi adicionado, separadamente, 60 µL das nitrilas **2-4**.

Após 24h de reação, os experimentos correspondentes às nitrilas **2 e 3** foram cessados, e o experimento referente à nitrila **4** foi cessado após 96h de reação. Em seguida, cada reação biocatalítica foi reunida, filtrada em funil de Buchner e extraída com acetato de etila (3 x 100 mL). Às fases orgânicas foram adicionados Na₂SO₄ anidro, seguida de filtração, evaporação e submetida à análise por GC-FID.

Os extratos obtidos de cada reação de biotransformação forneceram uma massa de 726 mg (4-fluorofenilacetoneitrila **2**), 455 mg (4-clorofenilacetoneitrila **3**) e 255 mg (4-metoxifenilacetoneitrila **4**).

Cada extrato foi submetido à purificação por cromatografia em coluna utilizando sílica *flash*. A eluição foi realizada com uma mistura de solventes CH₂Cl₂/AcOEt (9:1, 8:2, 7:3, 1:1) e monitorada por CCD com um sistema de eluição de CH₂Cl₂/AcOEt (7:3). As frações coletadas correspondentes a cada produto biotransformado das nitrilas **2-4** foram reunidas por similaridades fornecendo 206,75 mg (51%) a partir da nitrila **2**, 235,62 mg (55%) da nitrila **3** e 167,9 mg (43%) da nitrila **4** (Fluxograma 3).

As estruturas dos ácidos 4-fluorofenilacético **2a**, 4-clorofenilacético **3a** e 4-metoxifenilacético **4a** foram sugeridas pelos dados fornecidos pelas bibliotecas Nist e Nist 5 (GC-MS) e confirmadas por pontos de fusões e análises de RMN de ¹H e de ¹³C em comparação aos dados descritos na literatura (MCNULTY e DAS, 2009).

Fluxograma 3 - Biotransformação da 4-fluorofenilacetoneitrila **2**, 4-clorofenilacetoneitrila **3** e 4- metoxifenilacetoneitrila **4** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

b) 2-Metilfenilacetoneitrila 5, 3-metilfenilacetoneitrila 6 e 4-metilfenilacetoneitrila 7

Para cada nitrila foi preparado 6 frascos Erlenmeyer (250 mL), e separadamente, foi adicionado 20 µL das correspondentes nitrilas. Alíquotas foram retiradas com 24h, extraídas com acetato de etila (2 mL), centrifugadas (6.000 rpm / 6min) e analisadas por GC-FID.

Após completar 24h de reação, os experimentos correspondentes a cada nitrila foram cessados, reunidos, filtrados em funil de Buchner e extraídos com acetato de etila (3 x 100 mL). Às fases orgânicas foram adicionados Na₂SO₄ anidro, seguida de filtração, evaporação e submetidas às análises por GC-FID. Os extratos obtidos de cada reação de biotransformação forneceram uma massa de 277 mg (2-metilfenilacetoneitrila **5**), 187 mg (3-metilfenilacetoneitrila **6**) e 296 mg (4-metilfenilacetoneitrila **7**). Cada extrato foi submetido à purificação por cromatografia em coluna utilizando sílica *flash*. A eluição foi realizada com uma mistura de solventes CH₂Cl₂/AcOEt (9:1, 8:2, 7:3, 1:1), seguida da eluição de 100% de acetato de etila e monitorada por CCD com um sistema de eluição de CH₂Cl₂/AcOEt (7:3). As frações coletadas correspondentes a cada produto biotransformado das nitrilas **5-7** foram reunidas por similaridades fornecendo: 96,3 mg (76%) a partir da nitrila **5**, 62,52 mg (52%) da nitrila **6** e 54,75 mg (46%) da nitrila **7** (Fluxograma 4).

As estruturas dos ácidos 2-metilfenilacético **5a**, 3-metilfenilacético **6a** e 4-metilfenilacético **7a** foram sugeridas pelos dados fornecidos pelas bibliotecas Nist e Nist 5 do GC-MS e confirmadas por ponto de fusão, análises de HRMS e RMN de ¹H e de ¹³C em comparação aos dados descritos na literatura (VAN DER STELT, HARMS e NAUTA, 1961; BAIOCCHI e GIANNANGELI, 1979; LI e ALPER, 1986).

Fluxograma 4 - Biotransformação da 2-metilfenilacetoneitrila **5**, 3-metilfenilacetoneitrila **6** e 4-metilfenilacetoneitrila **7** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

3.13 Biotransformação da 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetoneitrila **8** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934

Para a biotransformação da 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetoneitrila **8** foram realizados dois experimentos.

No *experimento 1*, foram preparados 3 frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio líquido mineral com a adição de 60 µL (0,50 mmol) de fenilacetoneitrila **1**, simultaneamente ao inóculo do fungo (item 3.11.2, pág. 41). Após completar 96h de reação, foi adicionado separadamente, 20 µL (0,16 mmol), 40 µL (0,32 mmol) e 60 µL (0,48 mmol) de 2-(1-ciclo-hexen-

1-il)acetonitrila **8** a cada reação. Alíquotas foram retiradas a cada 24h, durante 4 dias, extraídas com acetato de etila (2 mL), centrifugadas (6.000 rpm / 6min) e analisadas por GC-FID.

No *experimento 2*, foram preparados 3 frascos Erlenmeyer de 250 mL, cada um contendo 100 mL de meio mineral. Foi utilizado o mesmo procedimento descrito no experimental 1 para o crescimento microbiano. Após completar 96h de reação, a massa micelial obtida a partir dos três experimentos foram reunidas e transferidas para um frasco Erlenmeyer de 1 L, e posteriormente, foi adicionada a 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonitrila **8** (60 µL, 0,48 mmol), o experimento 2 permaneceu em agitação por mais 96h. Alíquotas foram retiradas a cada 24h, durante 4 dias, extraídas com acetato de etila (2 mL), centrifugadas (6.000 rpm / 6 min) e analisadas por GC-FID. Após 8 dias de reação, todas as reações foram filtradas em funil de Buchner e extraídas com acetato de etila (3 x 100 mL). Às fases orgânicas foi adicionado Na₂SO₄ anidro, seguida de filtração, evaporação e submetida à análise por GC-FID.

Na figura 14, é apresentado um fluxograma ilustrativo do procedimento experimental em relação ao experimento 2 realizado na reação de biotransformação da 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonitrila **8**.

Figure 14 - Fluxograma ilustrativo do experimento 2 da biotransformação da 2-(1-ciclohexen-1-il)acetonitrila **8** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

3.13.1 Isolamento e purificação do produto biotransformado da 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonitrila **8** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934

Experimentos adicionais foram realizados seguindo os passos do experimento 2 descrito no item 3.13, a fim de isolar, purificar e caracterizar o produto biotransformado da 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonitrila **8**. Para tanto, foram preparados 12 frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura líquido mineral na presença de fenilacetonitrila **1** de acordo com item 3.11.2 (pág. 42).

Após a adição de 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonitrila **8** (60 µL; 0,48 mmol) as reações, alíquotas foram retiradas a cada 24h, durante 4 dias, extraídas com acetato de etila (2 mL), centrifugadas (6.000 rpm / 6min) e analisadas por GC-FID.

Após 8 dias de reação, os experimentos foram filtrados em um funil de Buchner, extraídos com acetato de etila (3 x 100 mL). Às fases orgânicas foi adicionado Na₂SO₄ anidro, seguida de filtração, evaporação e submetida às análises por GC-FID.

O extrato obtido da biotransformação forneceu 283 mg que foi submetido a purificação por cromatografia em coluna utilizando sílica *flash*. A eluição foi realizada com uma mistura de solventes CH₂Cl₂/AcOEt (9:1, 8:2, 7:3, 1:1), seguida da eluição de 100% de acetato de etila. A eluição foi monitorada por CCD com uma mistura de solvente CH₂Cl₂/AcOEt (7:3). As frações coletadas correspondentes ao produto biotransformado foram reunidas por similaridades fornecendo uma massa de 63,64 mg (Fluxograma 5).

A estrutura do ácido 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acético **8a** foi sugerida pelos dados preliminares fornecidos pelas bibliotecas Nist e Nist 5 do GC-MS e confirmada por análises de IV, RMN de ¹H e de ¹³C ao comparar com dados da literatura (BELLEAU, GULLINI e GOUR-SALIN, 1985; MASAMURE, 1980).

3.14 Biotransformação da 3-hidroxipentanodinitrila **9** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934

O procedimento reacional foi realizado como descrito no item 3.11.2 (Pág. 42). Após completar 96h de reação foi adicionado a 3-hidroxipentanodinitrila **9** (20 mg / 50 µL / DMSO). Alíquotas (2 mL) foram retiradas em períodos de 6, 10, 24, 48, 72 e 96h, extraídas com acetato de etila (2 mL), centrifugadas (6.000 rpm / 6min) e analisadas por GC-FID.

Após 8 dias de reação o experimento foi filtrado em funil de Buchner e extraído com acetato de etila (3 x 50 mL). À fase orgânica foi adicionado Na₂SO₄ anidro, seguida de filtração, evaporação e submetida à análise por GC-FID.

Fluxograma 5 - Biotransformação da 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonitrila **8** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

3.15 Biotransformação da (±)-mandelonitrila **10** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934

Foram preparados 3 frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura líquido mineral de acordo com item 3.11.2 (Pág. 41).

Após completar 96h de reação, tempo reacional necessário para o crescimento do fungo, foi adicionado sequencialmente 20 (0,17 mmol), 40 (0,34 mmol) e 60 µL (0,51 mmol) de (±)-mandelonitrila **10** a cada experimento. Alíquotas de 2 mL foram retiradas a cada 24h, durante 4 dias, extraídas com acetato de etila (2 mL), centrifugadas (6.000 rpm / 6min) e analisadas por GC-FID.

Após 8 dias de reação, todos os experimentos foram filtrados em funil de Buchner e extraídos com acetato de etila (3 x 50 mL). Às fases orgânicas correspondentes a cada experimento

foram adicionados Na_2SO_4 anidro, seguida de filtração, evaporação e submetida às análises por GC-FID e GC-MS (Fluxograma 6).

3.16 Reações de esterificações

3.16.1 Preparação do acetato racêmico da ($\pm$)-mandelonitrila **10**

Inicialmente, o padrão racêmico do acetato da mandelonitrila **10** foi preparado (Esquema 29). A ($\pm$)-mandelonitrila **10** e acetato racêmico **10a** foram submetidos à separação cromatográfica em coluna quirral de β -ciclodextrina.

A reação de esterificação foi realizada em um balão de 25 mL sob agitação magnética, adicionando-se sequencialmente anidrido acético (1,0 mL), piridina (1,0 mL) e a ($\pm$)-mandelonitrila **10** (100 μL , 0,84 mmol). Manteve-se a reação sob agitação magnética por 48h (Esquema 29). Posteriormente, realizou-se análises por CCD e GC-FID, e quando constatado a esterificação completa da ($\pm$)-mandelonitrila **10**, adicionou-se HCl 10% (2 mL). A fase orgânica foi extraída com acetato de etila (3 x 10 mL) e seca com Na_2SO_4 anidro. O produto foi purificado por cromatografia em coluna com sílica *flash* fornecendo 50% de rendimento.

Acetato racêmico **10a**: RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 2,09 (s, 3H), 6,33 (s, 1H), 7,36-7,48, m (5H); RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 20,4; 62,7; 116,0; 127,8; 129,2; 130,3; 131,6; 166,9.

Esquema 29 - Preparação do acetato da ($\pm$)-mandelonitrila.

3.16.2 Esterificação das reações de biotransformação de ($\pm$)-mandelonitrila **10** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934

Os extratos obtidos das reações de biotransformação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com a ($\pm$)-mandelonitrila **10** (20, 40 e 60 μL) (item 3.14) foram submetidos às reações de esterificações.

Cada extrato foi dissolvido em 10 mL de acetato de etila e submetido à reação de esterificação. As reações de esterificação foram realizadas em um balão de 50 mL sob agitação magnética, adicionando-se, sequencialmente, anidrido acético (1,0 mL) e piridina (1,0 mL). As reações foram mantidas sob agitação por 48h. Posteriormente, adicionou-se HCl 10% (5 mL). A fase orgânica foi extraída com acetato de etila (3 x 30 mL) e seca com Na_2SO_4 anidro e analisada por GC-FID (Fluxograma 6).

Fluxograma 6 - Biotransformação da (±)-mandelonitrila **10** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

3.17 Biotransformação de nitrilas aromáticas **11-18** e hetero-aromáticas **19** e **20** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934

3.17.1 Nitrilas aromáticas **11-18**

As reações de biotransformações foram preparadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL seguindo as condições descritas no item 3.11.2 (Pág. 41). A cada experimento, separadamente, após completar 96h de reação foi adicionado as nitrilas: benzonitrila (**11**) (20 µL, 0,19 mmol), 2-clorobenzonitrila (**12**) (20 mg, 0,15 mmol), 4-hidroxibenzonitrila (**13**) (20 mg, 0,17 mmol), 4-metoxibenzonitrila (**14**) (20 mg, 0,20 mmol), 3,5-dimetoxibenzonitrila (**15**) (20 mg, 0,12 mmol), 2-nitrobenzonitrila (**16**) (20 mg, 0,14 mmol), 3-nitrobenzonitrila (**17**) (20 mg, 0,14 mmol) e 4-nitrobenzonitrila (**18**) (20 mg, 0,14 mmol).

Aliquotas de 2 mL foram retiradas a cada 24h, durante 4 dias, extraídas com acetato de etila (2 mL), centrifugadas (6.000 rpm / 6min) e analisadas por GC-FID.

Após 8 dias de reação cada experimento foi filtrado em funil de Buchner e extraído com acetato de etila (3 x 50 mL). À fase orgânica foi adicionado Na₂SO₄ anidro, seguida de filtração, evaporação e submetida à análise por GC-FID.

3.17.2 Benzonitrila (11) e 2-cianopiridina 19

A reação foi preparada em um frasco Erlenmeyer de 250 mL com adição de 60 µL (0,50 mmol) de fenilacetoneitrila **1** (item 3.11.2, pág. 41). Após completar 96h, foi adicionado, ao mesmo frasco, a benzonitrila **11** (20 µL; 0,19 mmol) e a 2-cianopiridina **19** (20 µL; 0,21 mmol) ao meio reacional. Alíquotas foram retiradas a cada 24h, durante 4 dias, extraídas com acetato de etila (2 mL), centrifugadas (6.000 rpm / 6min) e analisadas por GC-FID.

Após 8 dias de reação o experimento foi filtrado em funil de Buchner e extraído com acetato de etila (3 x 50 mL). À fase orgânica foi adicionado Na₂SO₄ anidro, seguida de filtração, evaporação e submetida à análise por GC-FID e GC-MS (Fluxograma 8).

Realizou-se outro experimento em frasco Erlenmeyer de 250 mL com adição de 60 µL (0,50 mmol) de fenilacetoneitrila **1** (item 3.11.2, pág. 41), no qual após completar 96h, foi adicionado, ao mesmo frasco, a benzonitrila **11** (20 µL), 2-cianopiridina **19** (20 µL) e o ácido benzóico (20 mg / 50 µL / DMSO). Alíquotas foram retiradas em um período de 3, 24, 48, 72 e 96h, extraídas com acetato de etila (2 mL), centrifugadas (6.000 rpm / 6min) e analisadas por GC-FID. Após 8 dias de reação o experimento foi filtrado em funil de Buchner e extraído com acetato de etila (3 x 50 mL). À fase orgânica foi adicionado Na₂SO₄ anidro, seguida de filtração, evaporação e submetida à análise por GC-FID.

3.17.3 Benzonitrila 11 e 4-cianopiridina 20

A reação foi preparada em frasco Erlenmeyer de 250 mL seguindo o procedimento descrito no item 3.11.2, pág. 41. Após completar 96h, foi adicionada, simultaneamente, a benzonitrila **11** (20 µL; 0,19 mmol) e 4-cianopiridina **20** (20 mg; 0,19 mmol) dissolvida em 100 µL de DMSO. As extrações e análises foram idênticas ao procedimento descrito no item 3.16.2.

3.17.4 2-Cianopiridina 19

Foram preparados 3 frascos Erlenmeyer de 250 mL com adição de 60 µL (0,50 mmol) de fenilacetoneitrila **1**, simultaneamente ao inóculo do fungo (item 3.11.2). Após completar 96h de reação foi adicionado a cada experimento, sequencialmente, 20 µL (0,21 mmol), 40 µL (0,42 mmol) e 60 µL (0,63 mmol) de 2-cianopiridina **19**. As extrações e análises foram idênticas aos procedimentos discutidos no item 3.16.2.

Fluxograma 7 - Biotransformação da benzonitrila **11** e 2-cianopiridina **19** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934

3.18 Crescimento do fungo marinho *A. sydowii* CBMAI 934 em meio de cultura sólido na presença de 2-cianopiridina **19**

O fungo *A. sydowii* CBMAI 934 foi cultivado em placa Petri em meio mineral sólido suplementado com glicose (item 3.2.1.1, iii, pág. 34) e 2-cianopiridina **19** (5 µL; 0,052 mmol) por placa. Após o meio de cultura atingir uma temperatura de aproximadamente 50°C adicionou-se a nitrila **19** e homogeneizou-se antes de transferir para a placa Petri. A placa foi incubada em estufa a 32°C por 48h para descartar a possibilidade de contaminação. Após este período, o repique do fungo foi realizado a partir de cepa pura previamente cultivada em meio MA2 (item 3.2.1.1, ii, pág. 34). O repique foi realizado com um auxílio de uma agulha de inoculação realizando-se 5 pontos diferentes na placa Petri. Em seguida, a placa foi incubada em uma estufa a 32°C por 8 dias.

3.19 Biotransformação da benzonitrila **11** pelo fungo marinho *A. sydowii* CBMAI 934 em meio de cultura líquido na presença de 2-cianopiridina **19**

O fungo *A. sydowii* CBMAI 934 previamente cultivado em meio sólido na presença de 2-cianopiridina **19** foi submetido ao crescimento em meio mineral líquido (100 mL) suplementado com glicose (item 3.2.1.1, iii, pág. 34) e 2-cianopiridina **19** (20,0 µL; 0,21 mmol) à temperatura de 32°C e em agitador orbital a 124 rpm. Após completar 96h, foi adicionado a benzonitrila **11** (20 µL;

0,19 mmol) e alíquotas foram retiradas a cada 24h (2 mL), extraídas com acetato de etila (2 mL), centrifugadas (6.000 rpm / 6min) e analisadas por GC-FID. Após 8 dias de reação, o experimento foi cessado, filtrado em funil de Buchner e extraído com acetato de etila (3 x 50 mL). À fase orgânica foi adicionada Na₂SO₄ anidro, em seguida a fração foi rotaevaporada e analisada no GC-FID.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Triagem de fungos marinhos em meio líquido de malte 2%

Aos experimentos iniciais realizados com os fungos *Penicillium miczynskii* CBMAI 930, *Aspergillus sydowii* CBMAI 933, *Aspergillus sydowii* CBMAI 934, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935 e *Bionectria* sp. CBMAI 936 em meio líquido de malte 2% (M2) (3.2.1.1, i) observou-se, através das análises por GC-FID, que por esta metodologia não foi possível obter a biotransformação da fenilacetoneitrila **1** (Figura 15). Portanto, as enzimas responsáveis pela biotransformação do grupo ciano precisavam ser ativadas pelo metabolismo microbiano. Assim, a partir de uma busca na literatura sobre biotransformação de nitrilas deu-se início a novos experimentos a fim de promover a biotransformação da fenilacetoneitrila **1** (KAPLAN et al., 2006a, KAPLAN et al., 2006b).

Figura 15 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da triagem em meio líquido de malte 2% empregando a fenilacetoneitrila **1** e os fungos marinhos.

(a) *P. miczynskii* CBMAI 930. (b) *A. sydowii* CBMAI 933. (c) *A. sydowii* CBMAI 934. (d) *A. sydowii* CBMAI 935. (e) *Bionectria* sp. CBMAI 936.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 100^\circ\text{C}$ (2min), $T_f = 160^\circ\text{C}$ (2min), $r = 5^\circ\text{C/min}$, $t_c = 16\text{min}$

4.2 Triagem de fungos marinhos em meio mineral sólido e líquido com fenilacetônitrila 1

Com o objetivo de selecionar fungos de origem marinha para biotransformar nitrilas realizou-se um *screening* com 12 cepas fúngicas através de ensaios em placas de Petri com meio de cultura sólido mineral suplementado com glicose e utilizando-se a fenilacetônitrila 1 como única fonte de nitrogênio. O potencial biocatalítico desses fungos foi avaliado pela comparação entre o crescimento dos fungos nas placas em meio de cultura mineral na presença de fenilacetônitrila 1 com aqueles cultivados em meios de cultura mineral na ausência da fenilacetônitrila 1 (controle).

O crescimento de cada fungo foi avaliado em 4 experimentos variando-se a quantidade de fenilacetônitrila 1 adicionada ao meio sólido (5, 10, 15 e 20 µL/placa) (Parte experimental, item 3.11.1). A partir destes experimentos foi possível estabelecer a quantidade de fenilacetônitrila 1 adicionada ao meio, a fim de não atingir a inibição do crescimento dos fungos. A avaliação do crescimento dos fungos nas placas (controle e com fenilacetônitrila 1) com 5 µL foi estabelecida com 8 dias, pois foi observado que os fungos cresceram muito bem durante este período (Tabela 7).

Para todos os fungos observou-se que nas placas controles, ou seja, sem a presença de fenilacetônitrila 1 não houve crescimento microbiano. Logo, através destes estudos observou-se que a presença de fenilacetônitrila 1, como fonte de nitrogênio e carbono, foi importante para o crescimento dos micro-organismos neste meio (sem outra fonte de nitrogênio), o qual dispõe apenas de sais e glicose como fonte de carbono. Em relação, às placas em que foram inoculados os micro-organismos contendo a fenilacetônitrila 1 os resultados foram distintos, de acordo com os fungos utilizados. Os fungos *Aspergillus sydowii* CBMAI 934, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Aspergillus sydowii* CBMAI 933, *Bionectria* sp. CBMAI 936, *Aspergillus sydowii* CBMAI 1241, *Penicillium raistrickii* CBMAI 1235, *Penicillium decaturense* CBMAI 1234 e *Penicillium raistrickii* CBMAI 931 apresentaram desenvolvimento no meio de cultura, cujo diâmetro da colônia variou de 1,0 a 2,5 cm (Tabela 7). Vale ressaltar que o crescimento na presença de fenilacetônitrila 1 foi discreto comparando-se ao crescimento destes fungos em meio provido de malte 2% (MA2). Em geral, em meio malte 2% (MA2) com 8 dias os micro-organismos crescem por toda a superfície da placa (Figura 13). Portanto, foi constatado que a fenilacetônitrila 1, utilizada como única fonte de nitrogênio, induziu o crescimento dos fungos nestas condições realizadas (Figura 16).

Figura 16 - Crescimento do fungo *A. sydowii* CBMAI 934 em meio sólido em diferentes quantidades de fenilacetoneitrila **1** (5, 10, 15 e 20 µL/placa) e na ausência de fenilacetoneitrila **1** (controle).

Nesta triagem, também verificou-se que os fungos *Penicillium miczynskii* CBMAI 930, *Penicillium oxalicum* CBMAI 1185, *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 e *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 não apresentaram crescimento, uma vez que o meio utilizado tinha escassa quantidade de nutrientes, não favorecendo o crescimento destes fungos marinhos sob as condições realizadas (Tabela 7). Portanto, o crescimento destes fungos não foi induzido pela adição de fenilacetoneitrila **1** ao meio de cultura.

Tabela 7 - Crescimento de fungos marinhos em meio sólido com fenilacetoneitrila **1** (5 µL/placa), durante 8 dias a 32°C.

Fungos marinhos	Diâmetro da colônia (cm) com 8 dias de crescimento ^a
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 935	1,5
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 934	1,5
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 933	1,5
<i>Penicillium miczynskii</i> CBMAI 930	*
<i>Bionectria</i> sp. CBMAI 936	2,5
<i>Penicillium oxalicum</i> CBMAI 1185	*
<i>Penicillium citrinum</i> CBMAI 1186	*
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 1241	1,5
<i>Penicillium raistrickii</i> CBMAI 1235	1,0
<i>Penicillium decaturense</i> CBMAI 1234	1,5
<i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237	*
<i>Penicillium raistrickii</i> CBMAI 931	1,5

^a Os experimentos foram realizados em duplicatas.

*100 % de inibição

Os fungos que apresentaram crescimento microbiano na presença de fenilacetoneitrila **1** (5 µL/placa) foram selecionados para serem avaliados ao crescimento em maiores quantidades (10, 15 e 20 µL) durante um período de oito dias (Tabela 8).

Tabela 8 - Crescimento de fungos marinhos em meio sólido com fenilacetoneitrila **1** (10, 15 e 20 µL/placa), durante 8 dias a 32°C.

Fungos marinhos	Diâmetro da colônia (cm) com 8 dias de crescimento ^a		
	10 µL	15 µL	20 µL
<i>Penicillium raistrickii</i> CBMAI 931	1,5 x 1,5	1,5 x 1,5	0,5 x 0,5
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 933	2,0 x 2,0	2,0 x 2,0	*
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 934	1,8 x 1,8	1,8 x 1,8	*
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 935	2,0 x 2,0	2,0 x 2,0	0,5 x 0,5
<i>Bionectria</i> sp. CBMAI 936	3,5 x 3,5	3,5 x 3,5	*
<i>Penicillium decaturense</i> CBMAI 1234	1,5 x 1,5	1,5 x 1,5	*
<i>Penicillium raistrickii</i> CBMAI 1235	1,0 x 1,0	1,0 x 1,0	*
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 1241	1,5 x 1,5	1,5 x 1,5	*

*100 % de inibição

Pode ser observado pela tabela 8 que os fungos desenvolveram-se bem em todas as placas, nas quais foram adicionadas a fenilacetoneitrila **1** (10 e 15 µL), porém em uma quantidade maior de fenilacetoneitrila **1** (20 µL) houve inibição total do crescimento microbiano, com exceção do *Penicillium raistrickii* CBMAI 931 e *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, cujos fungos apresentaram um discreto crescimento nesta quantidade, pois mostraram-se mais resistentes a uma quantidade maior de fenilacetoneitrila **1**. Interessantemente, que o crescimento do fungo *Aspergillus sydowii* CBMAI 1241 em quantidades crescentes de fenilacetoneitrila **1** permaneceu constante. Provavelmente, as quantidades da nitrila **1** adicionada não foram favoráveis para o crescimento deste micro-organismo (Tabelas 7 e 8). Todos os micro-organismos cresceram bem em até 15 µL de substrato adicionado no meio sólido. Assim, partindo-se desta triagem observou-se que a quantidade máxima de fenilacetoneitrila **1** foi 15 µL/placa para que os fungos apresentem um bom crescimento.

Uma vez selecionado os fungos que melhor adaptaram-se na presença de fenilacetoneitrila **1** em meio sólido, estes foram avaliados, quanto ao crescimento, em meio líquido mineral suplementado com glicose e fenilacetoneitrila **1** (fonte de nitrogênio) (Parte experimental, item 3.11.2). O potencial de crescimento desses fungos foi avaliado pela comparação entre a massa de células miceliais secas dos fungos cultivados em meio líquido de cultura na presença de

fenilacetoneitrila **1** com aqueles cultivados na ausência da fenilacetoneitrila **1** (controle) após completar 8 dias de crescimento. Através destes estudos, observou-se que a quantidade de massa seca micelial foi maior quando se adicionou 60 µL de fenilacetoneitrila **1** em 100 mL de meio de cultura, enquanto houve pouca variação de massa micelial seca com adição de 20 e 40 µL por 100 mL de meio. Em todos os experimentos (em meio líquido) realizados na presença de fenilacetoneitrila **1** ficou evidente que a adição desta nitrila foi um fator preponderante para o crescimento dos fungos neste meio mineral suplementado com glicose (Tabela 9). Finalmente, estes estudos em meio sólido sugerem que estes fungos cultivados na presença de fenilacetoneitrila **1** apresentaram potencial para biotransformar o grupo ciano.

Tabela 9 - Crescimento induzido de fungos marinhos pela adição de fenilacetoneitrila **1** em meio líquido (32°C, 124 rpm, 8 dias).

Fungos marinhos	Volume de fenilacetoneitrila 1		
	20 µL	40 µL	60 µL
	Peso total das células miceliais secas (g) ^a		
<i>Penicillium raistrickii</i> CBMAI 931	1,10	1,10	1,10
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 933	0,69	0,72	0,72
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 934	0,61	0,66	0,94
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 935	0,61	0,75	0,90
<i>Bionectria</i> sp. CBMAI 936	0,46	0,59	0,63
<i>Penicillium decaturense</i> CBMAI 1234	0,41	1,10	1,46
<i>Penicillium raistrickii</i> CBMAI 1235	0,88	0,95	1,28
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 1241	0,72	0,95	1,10

^aAs células miceliais após serem filtradas foram colocadas em estufa a 32°C por 24h para pesagem

4.3 Biotransformação da fenilacetoneitrila **1**

Todas as reações correspondentes a triagem frente à fenilacetoneitrila **1** (item 3.11.2) foram monitoradas pelas análises por GC-FID através de alíquotas retiradas a cada 24h em um período de 8 dias. Foi observado que em 48h de reação a fenilacetoneitrila **1** ainda permanecia no meio reacional. Porém, com 96h foi totalmente consumida e consequentemente biotransformada, pois foi observado um sinal em 10,2min no cromatograma e com tempo de retenção superior à fenilacetoneitrila **1** ($t_r = 7,9\text{min}$) (Figura 17). Também, realizaram-se análises das extrações finais das fases líquidas para cada experimento. Verificou-se na extração final o mesmo sinal em $t_r = 10,2\text{min}$ (Figura 17).

Foram analisadas as alíquotas dos experimentos controles, ou seja, sem a presença da fenilacetoneitrila **1** no período de 48 e 96h e não foi observado a presença de nenhum sinal nos

cromatogramas referente a biotransformação da fenilacetoneitrila **1**. Logo, foi possível constatar que o sinal observado nas reações na presença de fenilacetoneitrila **1** seja um produto biotransformado e não um metabólito produzido pelos fungos.

Figura 17 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da triagem com fungos marinhos com 60 μ L de fenilacetoneitrila **1**.

(a) Padrão da fenilacetoneitrila **1**. (b) *A. sydowii* CBMAI 934, (c) *A. sydowii* CBMAI 935, (d) *A. sydowii* CBMAI 933, (e) *Bionectria* sp. CBMAI 936.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 100^\circ\text{C}$ (2min), $T_f = 160^\circ\text{C}$ (2min), $r = 5^\circ\text{C/min}$, $t_c = 16$ min

Foi observado pelas análises no GC-FID que a fenilacetoneitrila **1** foi biotransformada ao longo do tempo reacional, quando utilizou-se um meio mineral suplementado com glicose, porém quando submetida a um meio enriquecido com malte, esta não foi biotransformada. Quando os fungos foram cultivados em condições mais favoráveis, ou seja, em meio de malte 2%, provavelmente as enzimas capazes de biotransformar a fenilacetoneitrila **1** não se mostraram ativas. Assim, as enzimas capazes de hidrolisar o grupo ciano presente no sistema enzimático dos fungos marinhos avaliados possivelmente são enzimas construtivas, ou seja, necessitam de um indutor no meio de crescimento do micro-organismo.

Com o objetivo de caracterizar e determinar o rendimento do produto obtido da biotransformação da fenilacetoneitrila **1** foi realizado experimento em replicatas com o fungo *Aspergillus sydowii* CBMAI 934 (Parte experimental, item 3.11.3, pág. 43).

O experimento foi realizado com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 devido a literatura reportar alguns trabalhos de reação de hidrólise enzimática de nitrilas com espécies de fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, como também, por ter mostrado um crescimento favorável na placa Petri no período de 8 dias, em comparação aos demais fungos adaptados ao crescimento no meio mineral suplementado com glicose e fenilacetoneitrila **1**.

Como esperado, o fungo apresentou crescimento em meio líquido na presença de fenilacetoneitrila **1** (60 µL; 0,50 mmol), a qual foi biotransformada no intervalo de 96h. Após o crescimento microbiano (96h) adicionou-se mais 60 µL de fenilacetoneitrila **1** para verificar se a quantidade excedente seria biotransformada e consequentemente obter um melhor rendimento de reação. Alíquotas foram retiradas e analisadas a cada 24h durante 8 dias. A fenilacetoneitrila **1** excedente foi consumida e biotransformada após 24h de sua adição ao meio reacional (Tabela 10) (Figura 18). Portanto, as enzimas responsáveis pela biotransformação estavam bastante ativas nestas condições.

Análises realizadas no GC-FID correspondente aos extratos do caldo enzimático e das células úmidas (micélios) mostraram resultados semelhantes, logo os extratos foram reunidos (m = 258 mg) e submetidos a purificação por cromatografia em coluna (Figura 18). O rendimento do produto purificado foi de 51% (m = 171 mg; 1,13 mmol) e apresentou-se como um sólido de cor amarela.

Tabela 10 - Biotransformação da fenilacetoneitrila **1** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Tempo (h)	c (%) 1	c (%) [R] (%) 1b
24	100	-
48	3	97
72	-	100
96	-	100
Adição de mais 60 µL de fenilacetoneitrila 1 após 96h de reação		
24	-	100 [51]

c (%): conversão determinada por análises em GC-FID
[R] = rendimento isolado

Figura 18 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da fenilacetoneitrila **1**:

Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 em 60 μL de fenilacetoneitrila **1**: (a) Com 48h. (b) Com 96h. (c) Após 24h de ter adicionado mais 60 μL de fenilacetoneitrila **1**. (d) Extrato final do caldo enzimático da reação. (e) Extrato final das células miceliais.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 100^\circ\text{C}$ (2min), $T_f = 160^\circ\text{C}$ (2min), $r = 5^\circ\text{C/min}$, $t_c = 16\text{min}$

Pela análise realizada por GC-MS do produto purificado da biotransformação da fenilacetoneitrila **1** observou-se a presença de dois picos correspondentes, um para a 2-coumaranona **1c** e outro para o ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**, respectivamente, segundo dados fornecidos pela biblioteca Nist e Nist 5 (GC-MS) (Figura 19). O ponto de fusão foi condizente com o da literatura para o ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b** (p.f.: $144\text{--}146^\circ\text{C}$, lit.: $143\text{--}147^\circ\text{C}$) (ZHOU, ZHANG e PAN, 2005).

O padrão correspondente a 2-coumaranona **1c** foi analisado por GC-MS, e comparado com o dado experimental pela reação de biotransformação da fenilacetoneitrila **1**, cujo tempo de retenção foi o mesmo e os espectros foram idênticos segundo os dados fornecidos pelas bibliotecas Nist e Nist 5 (GC-MS) (Figuras 19, 20, 22 e 23). Assim, foi possível sugerir que ocorreu uma ciclização térmica pelo GC-MS do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b** a partir da perda de uma molécula de água fornecendo a 2-coumaranona **1c** (Esquema 30).

Esquema 30 - Ciclização térmica do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b** oriundo da biotransformação da fenilacetoneitrila **1**.

Figura 19 - Cromatograma obtido por GC-MS do produto biotransformado da fenilacetoneitrila **1** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Figura 20 - Espectro de massas (70 eV) da **1c** pela ciclização térmica do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**.

Figura 21 - Espectro de massas (70 eV) do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**.

Figura 22 - Cromatograma obtido por GC-MS do padrão 2-coumaranona **1c**. **Figura 23** - Espectro de massas (70 eV) do padrão 2-coumaranona **1c**.

Pelos dados adquiridos por HRMS observou-se que o valor de massas encontrado foi de 152.0431 [M]; 151.0398 [M-H]⁻¹, os quais sugeriram a obtenção do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b** (Figuras 24 e 25).

Figura 24 - Espectro de HRMS do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b** obtido pela biotransformação da fenilacetoneitrila **1** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Figura 25 - Espectro de HRMS do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b** obtido pela biotransformação da fenilacetonitrila **1** pelo pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

A produção do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b** a partir de fenilacetonitrila **1** por fungos marinhos envolve uma complexa sequência de reações enzimáticas de hidrólise e hidroxilação. A adaptação dos fungos marinhos em meios sólidos e líquidos minerais na presença de fenilacetonitrila **1** como fonte de nitrogênio, desenvolveu uma via para promover esta biotransformação específica. Como em todas as análises, não foi possível identificar nenhum produto intermediário, logo pela proposta apresentada no esquema 31 não foi possível afirmar qual intermediário foi formado primeiro, ou seja, o ácido fenilacético ou o 2-(2-hidroxifenil)acetonitrila. Pois, poderia ocorrer primeiro a hidroxilação enzimática no anel aromático da fenilacetonitrila **1** e, posteriormente a hidrólise da nitrila ao correspondente ácido carboxílico por uma reação de hidrólise enzimática (Esquema 31, pág. 68). Em um estudo realizado por Mason et al. observaram que as mono-oxigenases são frequentemente envolvidas na hidroxilação de anéis aromáticos (MASON et al., 1998).

Esquema 31 - Proposta enzimática para a biotransformação da fenilacetona **1** ao ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b** pela indução dos fungos marinhos.

Recentemente, um caminho para a biodegradação da fenilacetona **1** pela levedura *Exophiala oligosperma* R1 foi proposto (RUSTLER et al., 2008). Nesse estudo, dois dos principais intermediários foram formados, o ácido fenilacético **1a** e o ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**, como sugerido nas reações com os fungos marinhos (Esquema 31). Nesse estudo, a levedura *E. oligosperma* R1 também foi cultivada em condições semelhantes aos fungos marinhos, ou seja, na presença de fenilacetona **1** como fonte de carbono, nitrogênio e energia.

Possivelmente, a fenilacetona **1** foi hidrolisada previamente ao ácido carboxílico correspondente por uma nitrilase e/ou nitrila hidratase. Uma vez obtido o ácido fenilacético **1a**, este pode ter sido hidroxilado regioseletivamente na posição *orto* fornecendo o ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**. Estudos na literatura relatam que por uma via metabólica do ácido fenilacético **1a**, encontrado em vários fungos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* ATCC 28282) e bactéria (*Pseudomonas fluorescens*) leva a formação do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b** como primeiro produto e em seguida ocorre uma segunda monoidroxilação na posição 5 ou 6 do anel aromático do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b** (STAUDENMAIER et al., 1998).

O ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b** foi sintetizado pelo fungo *Helminthosporium* sp. tendo como substrato de partida o fenilacetato (Esquema 32) (XIA et al., 2012).

Esquema 32 - Biotransformação de fenilacetatos de alquila ao ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**

Como também, o composto **1b** foi sintetizado pela bactéria *Serratia marcescens* a partir do *orto*-tirosol (Esquema 33) (ALLOUCHE e SAYADI, 2005), além de ter sido obtido pela fermentação do ácido fenilacético pelos fungos *Humicola fuscoatra* Traaen e *Chaetomium seminudum*, os quais são depositados com o número DMS 7047 (STAUDENMAIER et al., 1998).

Esquema 33 - Biotransformação do *orto*-tirosol ao ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**

A partir destes resultados da literatura, adicionalmente foi realizado um experimento com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 adicionando o ácido fenilacético **1a** como substrato no meio reacional para verificar se o mesmo era biotransformado ao ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**. Pelas análises por GC-FID observou-se que o ácido não foi biotransformado ao correspondente produto hidroxilado, o mesmo permaneceu no meio reacional.

A hidroxilação de anéis aromáticos é uma reação fundamental utilizada para a preparação de vários compostos ativos. O ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b** é frequentemente utilizado na indústria farmacêutica como intermediário na preparação de alguns produtos biologicamente ativos, tais como agentes anti-hipertensivos (ALLOUCHE e SAYADI, 2005).

- Análises espectrais do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**

No espectro de absorção de infravermelho (KBr, cm⁻¹), foi observado uma banda muito larga na faixa de 3400 a 2852 cm⁻¹, compatível com estiramento O-H para ácidos carboxílicos, como também nessa faixa encontra-se o estiramento O-H para fenóis, sobrepondo parcialmente bandas na faixa de 3028 a 2852 cm⁻¹ de estiramentos C-H *sp*² aromático. Banda em 1704 cm⁻¹ de estiramento C=O de ácidos carboxílicos, bandas em 1639 a 1596 cm⁻¹ de estiramento C=C em anéis aromáticos, bandas em 1458 e 1402 cm⁻¹ de dobramento C-H *sp*³ do grupo metileno, banda em 1222 cm⁻¹ para estiramento de C-O-H de fenóis e banda em 750 cm⁻¹ para anéis *orto*-dissubstituídos (Figura 26). Estas absorções confirmam a presença dos grupos funcionais presentes no composto **1b**.

No espectro de RMN de ¹H [200 MHz, (CD₃)₂CO] foi observado um singlete em δ_H 3,62 (s, 2H, CH₂), além de multipletos na região de δ_H 6,76-6,87 (m, 2H aromáticos, H₅ e H₈) e δ_H 7,05-7,19 (m, 2H aromáticos, H₆ e H₇) (Figura 27).

No espectro de RMN de ^{13}C [50 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] foram observados 8 linhas espectrais, entre as quais, uma referente a carbono sp^3 com sinal em δ 36,3 e sete a carbonos sp^2 (δ 173,6; 156,6; 132,4; 129,3; 123,1; 120,7; 116,3) sendo o sinal em δ 173,6, segundo a literatura, compatível com carbonila de ácido carboxílico e o sinal em δ 156,6 compatível a carbono fenólico (Figura 28) (YANG e FU, 2010). Ao analisar os dados de RMN de ^1H e ^{13}C do padrão da 2-coumaranona **1c** e do produto obtido **1b** observou-se que os deslocamentos químicos eram muito próximos, inclusive com os dados da literatura (Tabela 11) (MATSUI et al., 2001; YANG e FU, 2010).

A partir de todos os dados apresentados e comparação com dados de HRMS, RMN de ^1H e de ^{13}C registrados na literatura confirmou-se a obtenção do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b** a partir da biotransformação da fenilacetonnitrila **1** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934 (YANG e FU, 2010).

Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , IV, ponto de fusão e massas da 2-coumaranona **1c** e do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**.

Análises	Dados experimentais*	2-coumaranona padrão	Lit. ^a 2-coumaranona	Lit. ^{b,c} ácido 2-(2-hidroxifenil)acético
RMN de ^1H	7,19-7,05 (m, 2H); 6,87-6,76 (m, 2H); 3,62 (s, 2H)	7,33-7,25 (m, 2H); 7,16-7,06 (m, 2H); 3,71(s, 2H)	7,30 (m, 1H); 7,28 (d, 8,0 Hz, 1H); 7,14 (m, 1H); 7,10 (d, 8,0 Hz, 1H); 3,73 (s,2H)	12,08 (s, 1H); 9,41 (s, 1H); 7,10-7,03 (m, 2H); 6,79-6,70 (m, 2H); 3,45 (s, 2H)
RMN de ^{13}C	173,6; 156,6; 132,4; 129,3; 123,1; 120,7; 116,3; 36,3	174,0; 154,5; 128,7; 124,5; 124,0; 122,9; 110,6; 32,0	-	173,3; 155,9; 131,6; 128,3; 122,4; 119,2; 115,3; 35,9
IV $\nu(\text{cm}^{-1})$	3400-3365, 3028-2852, 1704, 1639-1596, 1222, 750	-	1808, 1832, 1618, 1590, 1475, 1390, 1333, 1205, 1124, 1050, 952, 890, 826, 813, 750, 707, 670	-
HRMS (m/z)	$[\text{M-H}]^{-1}$ 151,0398	-	-	$[\text{M-H}]^{-1}$ 151,9
Pf	144-146°C	47-49°C	49°C	°143-147°C

* $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}]$, 200 MHz (^1H) e 50 MHz (^{13}C)

^a MATSUI et al., 2001;

^b YANG e FU, 2010, DMSO- d_6 , 300 MHz (^1H) e 75 MHz (^{13}C);

^c ZHOU, ZHANG e PAN, 2005

Figura 26 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr, cm^{-1}) para o ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**. **Figura 27** - Espectro de RMN de ^1H [(200 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)] do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b** obtido da biotransformação da fenilacetoneitrila **1** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Figura 28 - Espectro de RMN de ^{13}C [50 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b** obtido da biotransformação da fenilacetoneitrila **1** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

4.4 Biotransformação das nitrilas arilalifáticas 2-7

Uma vez que os fungos marinhos adaptados biotransformaram a fenilacetoneitrila **1** iniciaram-se os estudos com outras arilacetoneitrilas, que diferem quanto a natureza do grupo ligado ao anel aromático, nas mesmas condições realizadas para biotransformação do substrato **1**. Os estudos foram realizados com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 previamente cultivado em meio sólido na presença de fenilacetoneitrila **1** (60 μL , 0,50 mmol), o qual foi ao crescimento em meio líquido na presença de fenilacetoneitrila **1** (60 μL , 0,50 mmol) por 96h. Esse período foi suficiente para o crescimento microbiano e consequentemente obter a biotransformação da fenilacetoneitrila **1**.

Os experimentos foram realizados variando-se a quantidade de cada nitrila (**2-7**) (20, 40 e 60 μL) a ser avaliada para observar o comportamento destes compostos frente ao fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

4.4.1 4-Fluorofenilacetoneitrila **2**

Pelas as análises por GC-FID para todas as quantidades de 4-fluorofenilacetoneitrila **2** adicionadas (20, 40 e 60 μL) observou-se a biotransformação total do substrato em 24h de reação.

Com o objetivo de caracterizar e determinar o rendimento do produto da biotransformação da nitrila **2** foram preparados 6 experimentos com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 na presença de

fenilacetoneitrila **1** (60 μ L). Após completar 96h, adicionou-se a 4-fluorofenilacetoneitrila **2** (60 μ L). Pelas análises por GC-FID observou-se a biotransformação total da fenilacetoneitrila **1**, como também, da nitrila **2** para todos os experimentos (Tabela 12) (Figura 29). Após o produto ser purificado por cromatografia em coluna foi submetido à análise por GC-MS e os dados da biblioteca Nist e Nist 5 indicaram que o produto biotransformado foi o correspondente ácido 4-fluorofenilacético **2a** (Figura 30). Vale destacar que pelas análises por GC-FID e GC-MS não foi observado a presença de nenhum produto intermediário (Esquema 34).

Esquema 34 - Biotransformação da fenilacetoneitrila **1** e 4-fluorofenilacetoneitrila **2** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

O rendimento do produto biotransformado **2a** foi de 51% (206,75 mg, 1,34 mmol) e apresentou-se fisicamente com um aspecto sólido de cor amarela (p.f.: 80-82°C; lit.: 83-84°C) (MCNULTY et al., 2009).

Tabela 12 - Biotransformação da fenilacetoneitrila **1** e 4-fluorofenilacetoneitrila **2** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Tempo (h)	c (%) 1	c (%) 2	c (%) 1b	c (%) [R] (%) 2a
24	100	-	-	-
96 ^a	-	100	100	-
120	-	-	12	88 [51]

^aApós completar 96h de reação foi adicionada a 4-fluorofenilacetoneitrila **2** e a reação permaneceu por mais 24h

c (%): conversão determinada por GC-FID

[R] = rendimento isolado

Figura 29 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 4-fluorofenilacetnitrila **2**.

(a) Padrão da fenilacetnitrila **1**. (b) Padrão da 4-fluorofenilacetnitrila **2**. (c) Padrão do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**. (d) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 60 μ L de 4-fluorofenilacetnitrila **2** com 24h. (e) Produto da biotransformação após ser purificado por CC.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 100^\circ\text{C}$ (2min), $T_f = 160^\circ\text{C}$ (2min), $r = 5^\circ\text{C}/\text{min}$, $t_c = 16\text{min}$

Figura 30 - Espectro de massas (70 eV) do ácido 4-fluorofenilacético **2a** obtido pela biotransformação da 4-fluorofenilacetnitrila **2** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934

Uma pesquisa bibliográfica realizada nas bases de dados SciFinder, Scopus, Web of Science Direct até 1 de setembro de 2012 não foi encontrado nenhuma referência que relatasse a produção deste composto por biotransformação (enzimas), somente por metodologia sintética (MCNULTY e DAS, 2009).

Os compostos fluorados tem uma grande aplicabilidade na indústria farmacêutica. Até a década de 1970 eram poucos os fármacos fluorados usados na medicina. Entretanto, nos últimos 20 anos o número de fármacos contendo o átomo de flúor em suas estruturas vem aumentando significativamente. Segundo o World Drug Index, dos 31 novos fármacos aprovados em 2002, 9 continham o átomo de flúor e, em junho de 2007, havia 44 possíveis moléculas contendo o átomo de flúor em fase III de pesquisa clínica e 115 em estudos de fase II (HAGMANN, 2008). Na figura 31, é apresentado dois exemplos de fármacos bem conhecido contendo o átomo de flúor, o CIPRO[®] (antibacteriano) e PROZAC[®] (antidepressivo).

Figura 31 - Estruturas de CIPRO[®] e PROZAC[®]

O crescente investimento da área de Pesquisa e Desenvolvimento das indústrias farmacêuticas visa explorar as propriedades do flúor como sua alta eletronegatividade, pequeno raio atômico e a baixa polarizabilidade. A presença de flúor em determinadas posições da molécula pode aumentar sua meia vida no organismo, ou modular suas propriedades físico-químicas, como acidez, basicidade e lipofilicidade, além de aumentar a afinidade das ligações das moléculas em uma proteína-alvo e, por uma combinação de fatores, interferir em ações enzimáticas específicas (DOLBIER, 2005).

A biotransformação de compostos contendo o átomo de flúor por micro-organismos pode ser uma alternativa para preparar moléculas de interesse que possam ser inseridas nas estruturas químicas dos fármacos potencializando suas propriedades terapêuticas.

- Análises espectrais do ácido 4-fluorofenilacético **2a**

No espectro de absorção de infravermelho (KBr, cm^{-1}), foi observado uma banda larga na faixa de 3116 a 2563 cm^{-1} , compatível com estiramento O-H para ácidos carboxílicos, sobrepondo parcialmente banda em 3029 cm^{-1} compatível a estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H sp^2 aromático e bandas em 2958 a 2921 cm^{-1} de estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H

sp^3 , banda em 1697 cm^{-1} de estiramento C=O de ácidos carboxílicos, bandas em 1612 e 1514 cm^{-1} de estiramento C=C em anéis aromáticos, além de banda em 1232 cm^{-1} de estiramento C-F aromático ou estiramento C-O de ácido carboxílico, banda em 825 cm^{-1} compatível a anéis *para*-disubstituído (Figura 32). Essas absorções confirmam os grupos funcionais presentes no composto **2a**.

O espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) apresentou um sinal em δ_{H} 3,62 (s, 2H, H_2), sinais referentes a multipletos na região de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 6,95-7,07 (m, 2H, H_4 e H_8) e em δ_{H} 7,19-7,29 (m, 2H, H_5 e H_7) (Figura 33).

No espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) observou-se sinais referentes a três dubletos correspondentes aos deslocamentos químicos em δ_{C} 164,6 e 159,7 (d, $^1J_{\text{FC}} = 244,5\text{ Hz}$); 131,0 e 130,9 (d, $^3J_{\text{FC}} = 7,5\text{ Hz}$) e 115,7 e 115,3 (d, $^2J_{\text{FC}} = 21,0\text{ Hz}$) devido ao acoplamento com o átomo de flúor. Além, do sinal referente a carbono sp^3 em δ_{C} 40,1 e um sinal em δ_{C} 177,6; segundo a literatura, compatível a com carbonila de ácido carboxílico (Figura 34) (MCNULTY e DAS, 2009).

Com base nos dados discutidos e incluindo os dados da literatura conclui-se que o produto biotransformado da 4-fluorofenilacetonitrila **2** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934 foi o ácido 4-fluorofenilacético **2a** (MCNULTY e DAS, 2009).

Figura 32 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr, cm^{-1}) para o ácido 4-fluorofenilacético **2a**.

Figura 33 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do ácido 4-fluorofenilacético **2a** obtido da biotransformação da 4-fluorofenilacetetonitrila **2** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Figura 34 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do ácido 4-fluorofenilacético **2a** obtido da biotransformação da 4-fluorofenilacetetonitrila **2** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

4.4.2 4-Clorofenilacetonnitrila **3**

O comportamento da nitrila **3** frente ao sistema enzimático do fungo *A. sydowii* CBMAI 934 mostrou-se semelhante a nitrila **2**. Pelas análises por GC-FID em relação às diferentes quantidades de 4-clorofenilacetonnitrila **3** adicionadas (20, 40 e 60 µL) ao meio reacional observou-se a biotransformação total em 24h de reação.

Para caracterizar e determinar o rendimento do produto da biotransformação da nitrila **3** foram preparados 6 experimentos com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 na presença de fenilacetonnitrila **1** (60 µL). Após completar 96h de reação, adicionou-se a 4-clorofenilacetonnitrila **3** (60 µL). Pelas análises por GC-FID observou-se a biotransformação total da fenilacetonnitrila **1**, como também, da nitrila **3** para todos as reações (Figura 35) (Tabela 13). Após o produto ser purificado por cromatografia em coluna foi submetido à análise por GC-MS e os dados da biblioteca Nist e Nist 5 indicaram que o produto obtido foi o ácido 4-clorofenilacético **3a** (Figura 36). Nas análises realizadas por GC-FID e GC-MS não detectou a presença de nenhum produto intermediário para os compostos biotransformados (Esquema 35).

Esquema 35 - Biotransformação da fenilacetonnitrila **1** e 4-clorofenilacetonnitrila **3** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934

O rendimento do produto biotransformado foi de 55% (235,62 mg, 1,38 mmol) e apresentou-se fisicamente com um aspecto sólido de cor amarela (p.f.: 104-106°C; lit.: 104-105°C) (MCNULTY e DAS, 2009).

Tabela 13 - Biotransformação da fenilacetonnitrila **1** e 4-clorofenilacetonnitrila **3** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Tempo (h)	c (%) 1	c (%) 3	c (%) 1b	c (%) [R] (%) 3a
24	100	-	-	-
96 ^a	-	100	100	-
120	-	-	10	90 [55]

^aApós completar 96h de reação foi adicionada a 4-clorofenilacetonnitrila **3** e a reação permaneceu por mais 24h

c (%): conversão determinada por GC-FID

[R] = rendimento isolado

Figura 35 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 4-clorofenilacetnitrila **3**.

(a) Padrão da fenilacetnitrila **1**. (b) Padrão da 4-clorofenilacetnitrila **3**. (c) Padrão do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**. (d) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 60 μL de 4-clorofenilacetnitrila **3** com 24h. (e) Produto da biotransformação após ser purificado por CC.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 100^\circ C$ (1min), $T_f = 210^\circ C$ (5min), $r = 10^\circ C/min$, $t_c = 17min$

Figura 36 - Espectro de massas (70 eV) do ácido 4-clorofenilacético **3a** obtido pela biotransformação da 4-clorofenilacetnitrila **3** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

- Análises espectrais de 4-clorofenilacético **3a**

No espectro de absorção de infravermelho (KBr, cm^{-1}), foi observado uma banda larga na faixa de 3097 a 2557 cm^{-1} , compatível com estiramento O-H para ácidos carboxílicos, sobrepondo parcialmente banda em 3024 cm^{-1} compatível a estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H sp^2 aromático e bandas na faixa de 2962 a 2914 cm^{-1} de estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H sp^3 . Além de banda em 1701 cm^{-1} de estiramento C=O de ácidos carboxílicos, bandas em 1600 e 1492 cm^{-1} de estiramento C=C em anéis aromáticos, banda em 1089 cm^{-1} de estiramento C-Cl aromático e banda em 806 cm^{-1} para anéis *para*-dissubstituído (Figura 37). Estas absorções confirmam os grupos funcionais presentes no composto **3a**.

O espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) apresentou um sinal de δ_{H} 3,64 (s, 2H, H_2), sinais referentes a dois dubletos na região de δ_{H} 7,20 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, H_5 e H_7) e 7,30 (d, 2H, 8.0 Hz, H_4 e H_8) (Figura 38)

No espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) foram observados 6 linhas espectrias, entre as quais, uma referente a carbono sp^3 com sinal em δ_{C} 40,3 e cinco referentes a carbono sp^2 (δ 177,6; 133,3; 131,5; 130,7 $\text{C}_{4,8}$; 128,7 $\text{C}_{5,7}$), cujo sinal em δ 177,6, segundo a literatura, compatível a carbonila de ácido carboxílico (Figura 39) (MCNULTY e DAS, 2009).

Com base em todos os dados discutidos e incluindo os dados da literatura conclui-se que o produto biotransformado da 4-clorofenilacetoneitrila **3** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934 foi o ácido 4-clorofenilacético **3a** (MCNULTY e DAS, 2009).

Figura 37 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr, cm^{-1}) para o ácido 4-clorofenilacético **3a**.

Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do ácido 4-clorofenilacético **3a** obtido da biotransformação da 4-clorofenilacetonitrila **3** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Figura 39 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do ácido 4-clorofenilacético **3a** obtido da biotransformação da 4-clorofenilacetonitrila **3** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

4.4.3 4-Metoxifenilacetoniitrila 4

Através das análises por GC-FID observou-se que a nitrila **4** foi biotransformada em todas as reações nas diferentes quantidades (20, 40 e 60 µL) em 96h, diferentemente das nitrilas **2** e **3** que foram biotransformadas em 24h.

Para caracterizar e determinar o rendimento do produto da biotransformação da nitrila **4** foram preparados 6 experimentos com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 na presença de fenilacetonnitrila **1** (60 µL). Após completar 96h de reação, adicionou-se a 4-metoxifenilacetonnitrila **4** (60 µL). Pelas análises por GC-FID observou-se a biotransformação total da fenilacetonnitrila **1** e da nitrila **4** para todas as reações realizadas (Figura 40) (Tabela 14). Após o produto ser purificado por cromatografia em coluna foi submetido à análise por GC-MS e os dados da biblioteca Nist e Nist 5 indicaram que o produto biotransformado foi correspondente ao ácido 4-metoxifenilacético **4a** (Figura 41). Ainda pelas análises realizadas por GC-FID e GC-MS não se verificou a presença de nenhum produto intermediário para os compostos biotransformados (Esquema 36).

Esquema 36 - Biotransformação da fenilacetoneitrila **1** e 4-metoxifenilacetoneitrila **4** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934

O rendimento do produto biotransformado foi de 43% (167,9 mg, 1,01 mmol) e apresentou-se fisicamente com um aspecto sólido de cor amarela (p.f.: 83-85°C; lit.: 84-86°C) (MCNULTY e DAS, 2009).

Tabela 14 - Biotransformação da fenilacetoneitrila **1** e 4-metoxifenilacetoneitrila **4** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Tempo (h)	c (%) 1	c (%) 4	c (%) 1b	c (%) [R] (%) 4a
24	100	-	-	-
96 ^a	-	100	100	-
120	-	50	28	22
192	-	-	12	88 [43]

^aApós completar 96h de reação foi adicionada a 4-metoxifenilacetonnitrila **4** e a reação permaneceu por mais 96h

c (%): conversão determinada por GC-FID

[R] = rendimento isolado

Figura 40 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 4-metoxifenilacetnitrila **4**.

(a) Padrão da 4-metoxifenilacetnitrila **4**. (b) Padrão da fenilacetnitrila **1**. (c) Padrão do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**. (d) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 60 μL de 4-metoxifenilacetnitrila **4** com 24h. (e) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 60 μL de 4-metoxifenilacetnitrila **4** com 96h. (f) Produto da biotransformação após ser purificado por CC.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 120^\circ C$ (1min), $T_f = 210^\circ C$ (5min), $r = 10^\circ C/min$, $t_c = 15min$

Figura 41 - Espectro de massas (70 eV) do ácido 4-metoxifenilacético **4a** obtido pela biotransformação da 4-metoxifenilacetnitrila **4** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

- Análises espectrais do ácido 4-metoxifenilacético **4a**

No espectro de absorção de infravermelho (KBr, cm^{-1}), foi observado uma banda larga na faixa de 3124 a 2650 cm^{-1} , compatível com estiramento O-H para ácidos carboxílicos, sobrepondo parcialmente banda em 3039 cm^{-1} compatível a estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H sp^2 aromático e bandas na faixa de 2966 a 2839 cm^{-1} de estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H sp^3 , banda em 1704 cm^{-1} de estiramento C=O de ácidos carboxílicos, bandas em 1612 e 1583 cm^{-1} de estiramento C=C em anéis aromáticos, além de banda em 1245 cm^{-1} de deformação axial assimétrica de C-O-C, banda em 1026 cm^{-1} de deformação axial assimétrica de C-O-C e banda em 815 cm^{-1} para anéis *para*-disubstituídos (Figura 42). Estas absorções confirmam os grupos funcionais presentes no composto **4a**.

O espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) apresentou um sinal referente a grupo metileno em δ_{H} 3,61 ppm (s, 2H, H_2), sinal referente a grupo metila em δ_{H} 3,81 ppm (s, 3H, H_4), além de sinais referentes a dois dubletos em δ_{H} 6,89 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, H_5 e H_7) e 7,22 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, H_4 e H_8) (Figura 43).

No espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) foram observados 7 linhas espectrias, entre as quais, dois referentes a carbono sp^3 com sinal em δ_{C} 40,1 e em δ_{C} 55,2 e cinco referentes a carbono sp^2 (δ 178,3; 158,7; 130,3; 125,2 $\text{C}_{4,8}$; 114,0 $\text{C}_{5,7}$), cujo sinal em δ 178,3, segundo a literatura, compatível a carbonila de ácido carboxílico (Figura 44) (MCNULTY e DAS, 2009).

A 4-metoxifenilacetoneitrila **4** e a 4-clorofenilacetoneitrila **3** foram biotransformadas aos correspondentes ácidos carboxílicos pela nitrilase (sem indutor) e às correspondentes amidas pela nitrila hidratase induzida pela ϵ -caprolactama a partir da bactéria *Bacillus subtilis* ZJB-063 (CHEN, ZHENG e SHEN, 2008; ZHENG et al., 2008).

Figura 42 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr, cm^{-1}) para o ácido 4-metoxifenilacético **4a**.

Figura 43 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do ácido 4-metoxifenilacético **4a** obtido da biotransformação da 4-metoxifenilacetonitrila **4** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Figura 44 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do ácido 4-metoxifenilacético **4a** obtido da biotransformação da 4-metoxifenilacetonitrila **4** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

4.4.4 2-Metilfenilacetonitrila **5**, 3-metilfenilacetonitrila **6** e 4-metilfenilacetonitrila **7**

Os resultados alcançados com as arilacetonitrilas **2**, **3** e **4** foram bastante satisfatórios diante do fungo marinho *A. sydowii* CBMAI 934, tanto com grupo retirador, quanto com grupo doador de elétrons ligados na posição *para* do anel aromático. Destacando-se que os correspondentes ácidos carboxílicos das nitrilas **2**, **3** e **4** não foram hidroxilados.

Posteriormente, iniciaram-se estudos com arilcetonitrilas com o mesmo substituinte em diferentes posições do anel aromático (*o*, *m* e *p*).

Pelas análises realizadas no GC-FID para as reações com metilfenilacetonitrilas **5**, **6** e **7** em diferentes quantidades (20, 40 e 60 μL) observou-se que na presença de 20 μL com 24h todas as nitrilas foram totalmente biotransformadas pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934. Enquanto, nas quantidades 40 e 60 μL após completar 96h de reação não ocorreu a biotransformação, e as nitrilas permaneceram no meio reacional (Figuras 45-47).

Para isolar e caracterizar os correspondentes produtos biotransformados das referentes nitrilas pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934 foram adicionados 20 μL de cada substrato por experimento. Assim, foram preparados 6 experimentos na presença de fenilacetonitrila **1**.

Após os produtos serem purificados por cromatografia em coluna foram submetidos às análises por GC-MS e os dados da biblioteca Nist e Nist 5 indicaram que os produtos biotransformados pelas 2-metilfenilacetoneitrila **5**, 3-metilfenilacetoneitrila **6** e 4-metilfenilacetoneitrila **7** foram os correspondentes ácidos carboxílicos **5a-7a** (Figuras 48-53).

Tanto as análises por GC-FID, quanto por GC-MS não foi observado nenhum produto intermediário, ou seja, a biotransformação ocorreu diretamente aos ácidos carboxílicos, como também, observou-se a biotransformação total da fenilacetoneitrila **1** ao ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b** (item 4.3, pág. 60) (Tabela 15) (Esquema 37).

Esquema 37 - Biotransformação da fenilacetoneitrila **1** e das metilfenilacetoneitrilas **5-7** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934

Os produtos biotransformados da 2-metilfenilacetoneitrila **5**, 3-metilfenilacetoneitrila **6** e 4-metilfenilacetoneitrila **7** apresentaram-se fisicamente com um aspecto sólido amarelo claro, com os respectivos rendimentos 76% (96,3 mg, 0,64 mmol), 52% (62,52 mg, 0,42 mmol) e 46% (54,75 mg, 0,34 mmol) e pontos de fusão (p.f.: 85-87°C, lit.: 86-87°C; p.f.: 65-66°C, lit.: 63-64°C; p.f.: 89-92°C, lit.: 91-93°C) (BAIOCCHI e GIANNANGELI, 1979; VAN DER STELT, HARMS e NAUTA, 1961).

Tabela 15 - Biotransformação da fenilacetoneitrila **1** e metilfenilacetoneitrilas **5-7** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Tempo (h)	c (%)	c (%)	c (%)	c (%) [R] (%)
#	1	5	1b	5a
24	100	-	-	-
96 ^a	-	100	100	-
120	-	-	11	89 [76]
#	1	6	1b	6a
24	100	-	-	-
96 ^a	-	100	100	-
120	-	-	22	78 [52]
#	1	7	1b	7a
24	100	-	-	-
96 ^a	-	100	100	-
120	-	-	11	89 [46]

^aApós completar 96h de reação foi adicionada as nitrilas **5**, **6** e **7** (20 µL) e as reações permaneceram por mais 24h

c (%): conversão determinada por GC-FID; [R] = rendimento isolado

Figura 45 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 2-metilfenilacetoneitrila **5**.

(a) Padrão da 2-metilfenilacetoneitrila **5**. (b) Padrão da fenilacetoneitrila **1**. (c) Padrão do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**. (d) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 20 µL de 2-metilfenilacetoneitrila **5** com 24h. (e) Reação com o fungo *A. sydowii* CCMAI 934 com 40 µL de 2-metilfenilacetoneitrila **5** com 96h. (f) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 60 µL de 2-metilfenilacetoneitrila **5** com 96h. (g) Produto biotransformado da 2-metilfenilacetoneitrila **5** após ser purificado por CC.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 100^\circ\text{C}$ (2min), $T_f = 160^\circ\text{C}$ (2min), $r = 5^\circ\text{C/min}$, $t_c = 16\text{min}$

Figura 46 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 3-metilfenilacetoneitrila **6**.

(a) Padrão da 3-metilfenilacetoneitrila **6**. (b) Padrão da fenilacetoneitrila **1**. (c) Padrão do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**. (d) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 20 μ L de 3-metilfenilacetoneitrila **6** com 24h. (e) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 40 μ L de 3-metilfenilacetoneitrila **6** com 96h. (f) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 60 μ L de 3-metilfenilacetoneitrila **6** com 96h. (g) Produto biotransformado da 3-metilfenilacetoneitrila **6** após ser purificado por CC.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 100^\circ\text{C}$ (2min), $T_f = 160^\circ\text{C}$ (2min), $r = 5^\circ\text{C/min}$, $t_c = 16\text{min}$

Figura 47 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 4-metilfenilacetoneitrila **7**.

(a) Padrão da 4-metilfenilacetoneitrila **7**. (b) Padrão da fenilacetoneitrila **1**. (c) Padrão do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**. (d) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 20 µL de 4-metilfenilacetoneitrila **7** com 24h. (e) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 40 µL de 4-metilfenilacetoneitrila **7** com 96h. (f) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 60 µL de 4-metilfenilacetoneitrila **7** com 96h. (g) Produto biotransformado da 4-metilfenilacetoneitrila **7** após ser purificado por CC.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 100^\circ\text{C}$ (2min), $T_f = 160^\circ\text{C}$ (2min), $r = 5^\circ\text{C/min}$, $t_c = 16\text{min}$

Figura 48 - Cromatograma obtido por GC-MS do ácido 2-metilfenilacético **5a** biotransformado pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934 após ser purificado.

Figura 49 - Espectro de massas (70 eV) do ácido 2-metilfenilacético **5a** obtido da biotransformação da 2-metilfenilacetonitrila **5** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Figura 50 - Cromatograma obtido por GC-MS do ácido 3-metilfenilacético **6a** biotransformado pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934 após ser purificado.

Figura 51 - Espectro de massas (70 eV) do ácido 3-metilfenilacético **6a** obtido da biotransformação de 3-metilfenilacetonitrila **6** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Figura 52 - Cromatograma obtido por GC-MS do ácido 4-metilfenilacético **7a** biotransformado pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934 após ser purificado.

Figura 53 - Espectro de massas (70 eV) do ácido 4-metilfenilacético **7a** obtido da biotransformação da 4-metilfenilacetonitrila **7** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

A 4-metilfenilacetonitrila **7** foi biotransformada ao correspondente ácido pela nitrilase (sem indutor) e à correspondente amida pela nitrila hidratase induzida pela ϵ -caprolactama a partir da bactéria *Bacillus subtilis* ZJB-063 (ZHENG et al., 2008).

Na literatura, dados de RMN de ^1H para o ácido 2-metilfenilacético **5a**, e dados correspondentes aos pontos de fusão para os ácidos **5a-7a** corroboram com os dados apresentados pelos compostos biotransformados pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934 (LI e ALPER, 1986; BAIUCHI e GIANNANGELI, 1979; VAN DER STELT, HARMS e NAUTA, 1961). Para os ácidos **5a**, **6a** e **7a**, além de análises de IV, RMN de ^1H e de ^{13}C , também, foram realizadas análises de HRMS (Figuras 54, 55 e 56).

Um fator interessante observado para as reações realizadas com as metilfenilacetonitrilas **5-7** foi o comportamento da 2-metilfenilacetonitrila **5**, a qual contém um grupo metila na posição *orto* do anel aromático, ter sido quantitativamente biotransformada ao ácido carboxílico **5a** em 24h. Em geral, as reações enzimáticas em compostos aromáticos contendo grupos substituintes na posição *orto* não ocorrem ou são pouco favorecidas. Por exemplo, a biorredução da *orto*-iodoacetofenona com células inteiras de fungos marinhos forneceu o correspondente álcool com baixa conversão ($c = 6\%$, 168h). O mesmo foi observado na resolução quimioenzimática do *orto*-

iodofeniletanol ($c = 25\%$, 24h), *meta*- e *para*-iodofeniletanol ($c = 50\%$, 2h) por lipase de *Candida antarctica* (ROCHA et al., 2012; ROCHA et al., 2010).

Reilly e Turner relataram que, em geral, as nitrilases têm preferência por substratos com substituintes na posição *meta* e *para* do anel aromático, e que estas enzimas apresentam baixas ou nenhuma atividade com substratos contendo grupo substituinte na posição *orto*. Este efeito pode estar relacionado ao impedimento estérico proporcionado pelos grupos substituintes (REILLY e TURNER, 2003). Contudo, a partir dos estudos realizados com o fungo marinho *A. sydowii* CBMAI 934 ocorreu total biotransformação da 2-metilfenilacetoni-trila **5** ao ácido **5a**.

Ressalta-se também que a partir dos produtos biotransformados das nitrilas **2-7** foi possível uma melhor compreensão na rota de obtenção do produto de biotransformação da fenilacetoni-trila **1** ao ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**. Foi proposto no esquema 31 (Pág. 68) que poderia ocorrer a hidrólise do grupo nitrila da fenilacetoni-trila **1**, como também, a hidroxilação na posição *orto* do anel aromático. Devido às reações com as nitrilas **5-7** contendo grupos substituintes nas posições *orto*, *meta* e *para* não levarem a formação de nenhum produto de hidroxilação. Estes resultados, além dos obtidos pelas reações de biotransformações das nitrilas **2-4**, permite sugerir que a hidrólise enzimática deve ocorrer primeiro, seguida da hidroxilação. A fenilacetoni-trila **1** foi hidroxilada, possivelmente, devido a ausência de grupo substituinte no anel aromático.

Através dos resultados obtidos da hidrólise das nitrilas **1-7**, cujas reações apresentaram comportamentos reacionais distintos de acordo com o grupo substituinte, é possível sugerir que há uma interação entre o sistema π -eletrônico dos substratos com os aminoácidos triptofano ou tirosina presentes no sítio ativo da nitrila hidratase (MIYANAGA et al., 2001). As nitrilas **2** e **3** contendo os substituintes halogenados (*p*-F e *p*-Cl) devem ser melhor acomodadas na zona de estereoespecificidade enzimática, proporcionando a reação de biotransformação mais rápida (24h). Já em relação à nitrila **4**, que dispõe de um grupo metoxi ligado na posição *para* do anel aromático, a interação do sistema π -eletrônico deve ser menos favorecida, logo, a reação foi mais lenta (96h).

Também na literatura há uma discussão sobre o efeito eletrônico dos grupos substituintes em posição *para* na hidrólise de derivados da fenilacetoni-trila (ZHENG et al., 2008). Porém, estes efeitos praticamente não devem ter influência na hidrólise do grupo ciano pelas enzimas, uma vez que não há conjugação do sistema π -eletrônico do anel aromático com o sistema π -eletrônico do grupo ciano.

Figura 54 - Espectro de HRMS do ácido 2-metilfenilacético **5a** obtido pela biotransformação da 2-metilfenilacetonitrila **5** pelos fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Figura 55 - Espectro de HRMS do ácido 3-metilfenilacético **6a** obtido pela biotransformação da 3-metilfenilacetonitrila **6** pelos fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Figura 56 - Espectro de HRMS do ácido 4-metilfenilacético **7a** obtido pela biotransformação da 4-metilfenilacetonitrila **7** pelos fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

- Análises espectrais realizadas para o ácido 2-metilfenilacético **5a**

No espectro de absorção do infravermelho (KBr, cm^{-1}), foi observado uma banda larga na faixa de $3064\text{--}2638\text{ cm}^{-1}$, compatível com estiramento O-H para ácidos carboxílicos, sobrepondo parcialmente a banda em 3014 cm^{-1} compatível a estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H sp^2 aromático e bandas em 2962 e 2923 cm^{-1} de estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H sp^3 , além de uma banda em 1693 cm^{-1} de estiramento C=O de ácidos carboxílicos, bandas em 1604 e 1496 cm^{-1} de estiramento C=C em anéis aromáticos e banda em 746 cm^{-1} para anéis *orto*-disubstituídos (Figura 57). Estas absorções confirmam os grupos funcionais presentes no composto **5a**.

O espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) apresentou sinal referente a um grupo metila em δ_{H} 2,33 (s, 3H, H_4) e um sinal referente a hidrogênios metilênicos em δ_{H} 3,67 (s, 2H, H_2). Como também, sinal referente a um multiplete na região de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,20 (m, 4H) e sinal referente a hidrogênio de ácido carboxílico em δ_{H} 10,28 (sl, 1H, H_1) (Figura 58).

No espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) foram observados 9 linhas espectrais, entre as quais, sete referentes a carbonos sp^2 (δ 177,9; 136,9; 131,9; 130,3; 130,2; 127,6; 126,1), dois referentes a carbonos sp^3 (δ 38,8; 19,5), sendo o sinal em δ 177,9 compatível com carbonila de ácidos carboxílicos (Figura 59).

Os deslocamentos químicos foram compatíveis com a literatura (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010; LI e ALPER, 1986).

- Análises espectrais realizadas para o ácido 3-metilfenilacético 6a

No espectro de absorção do infravermelho (KBr, cm^{-1}), foi observado uma banda larga na faixa de 3109 a 2534 cm^{-1} , compatível com estiramento O-H para ácidos carboxílicos, sobrepondo parcialmente a banda em 3026 cm^{-1} compatível a estiramento simétrico e assimétrico de ligação C-H sp^2 aromático, e bandas na faixa de 2960 a 2862 cm^{-1} de estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H sp^3 , além de uma banda em 1703 cm^{-1} de estiramento C=O de ácidos carboxílicos, bandas em 1610 e 1591 cm^{-1} de estiramento C=C em anéis aromáticos e bandas em 881, 792 e 678 cm^{-1} compatível a anéis *meta*-disubstituídos (Figura 60). Estas absorções confirmam os grupos funcionais presentes no composto **6a**.

O espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) apresentou sinal referente a um grupo metila em δ_{H} 2,40 ppm (s, 3H, H_5) e um sinal referente a hidrogênios metilênicos em δ_{H} 3,67 (s, 2H, H_2). Sinais referentes à multipletos na região de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,16 a 7,33 e sinal referente a hidrogênio ácido em δ_{H} 9,81 (sl, 1H, H_1) (Figura 61) (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010).

No espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) foram observados 9 linhas espectrais, dentre as quais, sete referentes a carbonos sp^2 (δ 178,0; 138,3; 133,1; 130,0; 128,5; 128,0; 126,3), dois referentes a carbonos sp^3 (δ 40,9; 21,3), sendo o sinal em δ 178,0 compatível com carbonila de ácidos carboxílicos (Figura 62) (SILVERSTEIN et al., 2007).

- Análises espectrais realizadas para o ácido 3-metilfenilacético 7a

No espectro de absorção de infravermelho (KBr, cm^{-1}), foi observado uma banda larga na faixa de 3097-2563 cm^{-1} , compatível com estiramento O-H para ácidos carboxílicos, sobrepondo as bandas em 3049 e 3022 cm^{-1} compatível a estiramento simétrico e assimétrico de ligação C-H sp^2 aromático e bandas em 2958 a 2856 cm^{-1} de estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H sp^3 , além de uma banda em 1701 cm^{-1} de estiramento C=O de ácidos carboxílicos, bandas em 1618 e 1517 cm^{-1} de estiramento C=C em anéis aromáticos e banda em 806 cm^{-1} para anéis *para*-disubstituído (Figura 63). Estas absorções confirmam os grupos funcionais presentes no composto **7a**.

O espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) apresentou sinal referente a um grupo metila em δ_{H} 2,37 (s, 3H, H_6) e um sinal referente a hidrogênios metilênicos em δ_{H} 3,64 (s, 2H, H_2). Sinais

referentes a dois dubletos na região de hidrogênios aromáticos em δ_H 7,17 (d, 8,0 Hz, 2H, H₄ e H₈) e δ_H 7,20 (d, 8,0 Hz, 2H, H₅ e H₇) (Figura 64).

No espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) foram observados 7 linhas espectrais, dentre as quais, cinco referentes a carbonos sp^2 (δ 178,2; 136,9; 130,1; 129,3; 129,2), duas referentes a carbonos sp^3 (δ 40,6; 21,0), sendo o sinal em δ 178,2 compatível com carbonila de ácidos carboxílicos (Figura 65) (SILVERSTEIN et al., 2007).

Com base nos resultados apresentados concluiu-se que os produtos biotransformados da 2-metilfenilacetoneitrila **5**, 3-metilfenilacetoneitrila **6** e 4-metilfenilacetoneitrila **7** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934 foram os ácidos 2-metilfenilacético **5a**, 3-metilfenilacético **6a** e 4-metilfenilacético **7a**.

Figura 57 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr, cm^{-1}) para o ácido 2-metilfenilacético **5a**.

Figura 58 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do ácido 2-metilfenilacético **5a** obtido da biotransformação pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Figura 59 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do ácido 2-metilfenilacético **5a** obtido da biotransformação pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Figura 60 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr, cm^{-1}) para o ácido 3-metilfenilacético **6a**. **Figura 61** - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do ácido 3-metilfenilacético **6a** obtido da biotransformação pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Chemical structure of **6a** is shown: 4-methyl-3-(4-oxo-4-phenylbut-3-en-1-yl)benzoic acid.

¹³C NMR spectrum (CDCl₃) of **6a** is displayed, showing peaks at 178.07, 138.30, 133.10, 130.09, 128.34, 128.09, 77.0 (triplet), 40.98, and 21.30 ppm. An inset shows the aromatic region from 127.0 to 128.5 ppm with peaks at 128.51 and 128.09 ppm.

Chemical structure of **7a** (4-methylbenzoic acid) is shown in the center of the plot.

Key peaks in the IR spectrum are labeled with their wavenumbers (cm⁻¹):

- 3097.45
- 3049.23
- 2920.01
- 2856.37
- 2729.07
- 2644.21
- 2563.21
- 1701.09
- 1618.16
- 1517.87
- 1411.79
- 1340.43
- 1257.5
- 1211.21
- 1172.63
- 925.76
- 896.33
- 806.19
- 767.61
- 713.61
- 678.89
- 534.24
- 486.03

Figura 64 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do ácido 4-metilfenilacético **7a** obtido da biotransformação pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Figura 65 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do ácido 4-metilfenilacético **7a** obtido da biotransformação pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

4.5 Biotransformação da 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonitrila **8** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934

Após ter realizado reações com uma série de nitrilas arilalifáticas e obter resultados satisfatórios, iniciou-se estudos com nitrilas alifáticas, a princípio com a 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonitrila **8**.

De forma análoga aos estudos anteriores realizou-se as reações para biotransformação da 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonitrila **8** variando-se a quantidade da nitrila **8** adicionada ao meio reacional (20, 40 e 60 μ L). Através destas reações foi possível observar pelas análises por GC-FID a biotransformação de 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonitrila **8**, a qual, porém não foi totalmente biotransformada no período de 96h (Figuras 66-68) (Tabela 16). Partindo destes resultados e a fim de obter uma melhor conversão do produto biotransformado, experimentos foram realizados, os quais após o crescimento microbiano na presença de fenilacetonitrila **1** foram reunidos proporcionando uma maior quantidade de células microbianas para posteriormente ser adicionada a 2-(1-ciclohexen-1-il)acetonitrila **8** (60 μ L, 0,470 mmol) (Parte experimental, item 3.13).

Através destes resultados observou-se que uma quantidade maior de células microbianas favoreceu na biotransformação da nitrila **8** (Figura 68) (Tabela 16). Com o intuito de isolar e caracterizar o produto biotransformado pela 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonitrila **8** foi realizado vários experimentos como descrito na parte experimental (item 3.13.1).

A fenilacetonitrila **1** adicionada para o crescimento microbiano foi totalmente biotransformada ao ácido 2-(2-hidroxifenil)acético e a 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonitrila **8** com 96h de reação foi biotransformada ao seu correspondente ácido carboxílico **8a**, segundo os dados fornecidos pelas bibliotecas Nist e Nist 5 (GC-MS) (Figura 69) (Esquema 38).

O produto biotransformado **8a**, após ser purificado por cromatografia em coluna, apresentou-se como um óleo viscoso de coloração amarela clara, fornecendo um rendimento de 28% (74 mg, 0,528 mmol).

Esquema 38 - Biotransformação da fenilacetonitrila **1** e 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonitrila **8** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Tabela 16 - Biotransformação da fenilacetone nitrila **1** e 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetone nitrila **8** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Tempo (h)	v (μL) 8	c (%) 1	c (%) 8	c (%) 1b	c (%) [R] (%) 8a
24	20	100	-	-	-
	40	100	-	-	-
	60	100	-	-	-
96 ^a	20	-	100	100	-
	40	-	100	100	-
	60	-	100	100	-
192	20	-	55	12	33
	40	-	75	10	15
	60	-	85	6	9
Adição da nitrila 8 (60 μL) após a massa micelial ser reunida					
24		100	-	-	-
96 ^a	60	-	100	100	-
192		-	32	8	60 [28]

^aApós completar 96h de reação foi adicionada a 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetone nitrila **8** e a reação permaneceu por mais 96h

c (%): conversão determinada por GC-FID

[R] = rendimento isolado

Figura 66 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonitrila **8** (20 μ L).

(a) Padrões da fenilacetona **1** e 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetona **8**. (b) Padrão do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**. (c) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 20 μ L de 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetona **8** com 24h. (d) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 20 μ L de 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetona **8** com 96h. (e) Produto biotransformado da 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetona **8** após ser purificação CC.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 100^\circ\text{C}$ (2min), $T_f = 160^\circ\text{C}$ (2min), $r = 5^\circ\text{C/min}$, $t_c = 16\text{min}$

Figura 67 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonitrila **8** (40 μ L).

(a) Padrões da fenilacetonitrila **1** e 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonitrila **8**. (b) Padrão do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**. (c) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 40 μ L de 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acético **8a** após 24h. (d) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 40 μ L de 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acético **8a** após 96h. (e) Produto biotransformado da 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonitrila **8** após ser purificação por CC.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 100^\circ\text{C}$ (2min), $T_f = 160^\circ\text{C}$ (2min), $r = 5^\circ\text{C/min}$, $t_c = 16\text{min}$

Figura 68 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonitrila **8** (60 μ L).

(a) Padrões da fenilacetoneitrila **1** e 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetoneitrila **8**. (b) Padrão do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**. (c) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 60 μ L de 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetoneitrila **8** com 96h sem reunião da massa micelial cultivada. (d) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 60 μ L de 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetoneitrila **8** com 96h, após reunião da massa micelial cultivada. (e) Produto biotransformado da 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetoneitrila **8** após ser purificação por CC.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 100^\circ\text{C}$ (2min), $T_f = 160^\circ\text{C}$ (2min), $r = 5^\circ\text{C/min}$, $t_c = 16\text{min}$

Figura 69 - Espectro de massas (70 eV) do ácido 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acético **8a** obtido da biotransformação da 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetoneitrila **8** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

- Análises espectrais do ácido 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acético **8a**

No espectro de absorção do infravermelho (KBr, cm^{-1}), foi observado uma banda larga de 3047 a 2659 cm^{-1} , compatível com estiramento O-H para ácidos carboxílicos, sobrepondo parcialmente bandas em 2929 a 2837 cm^{-1} de estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H sp^3 , banda em 1708 cm^{-1} de estiramento C=O de ácidos carboxílicos (Figura 70).

No espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), foi observado dois multipletos na região entre δ_{H} 1,54-1,68 [m, 4H, (H_6 e H_7)] e 2,01-2,04 [(m, 4H, (H_5 e H_8 , H_s alílicos), sinal referente a dois singletos em δ_{H} 2,98 (s, 2H, H_2) e em δ_{H} 5,59 (s, 1H, H_4). Não foi possível observar deslocamento químico referente ao hidrogênio de ácido carboxílico (Figura 71).

O espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) revelou oito linhas espectrais, entre as quais, três referentes a carbono sp^2 (δ 178,0; 130,5; 126,4) e cinco a carbono sp^3 (δ 43,2; 28,3; 25,2; 22,6; 21,8). O sinal em δ 178,0 foi atribuído ao carbono de ácido carboxílico e os sinais em δ 25,2 e 21,8 aos carbonos alílicos (PAIVA et al., 2010) (Figura 72).

A partir destas análises e ao comparar com dados da literatura conclui-se que o composto biotransformado a partir da 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonitrila **8** foi o ácido 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acético **8a** ((BELLEAU et al., 1984; MASSAMURE et al., 1980).

Até o momento, nenhum dado na literatura descreveu a biotransformação da 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetonitrila **8** por uso de enzimas, somente por metodologia sintética (BELLEAU et al., 1984; MASSAMURE et al., 1980).

Figura 70 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr, cm^{-1}) para o ácido 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acético **8a**

Figura 71 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do ácido 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acético **8a** obtido da biotransformação pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Figura 72 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do ácido 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acético **8a** obtido da biotransformação pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934

4.6 Biotransformação da 3-hidroxipentanodinitrila **9**

A fim de analisar a regioseletividade da enzima presente no fungo *A. sydowii* CBMAI 934 induzido pela fenilacetone nitrila **1**, pela dessimetização da di-nitrila 3-hidroxipentanodinitrila **9**, iniciou-se o estudo com a nitrila alifática **9**. A princípio, foi realizado um experimento com 20 mg de 3-hidroxipentanodinitrila **9**. Alíquotas foram retiradas e analisadas em diferentes tempos reacionais (10, 24, 48, 72 e 96h).

Pelas análises por GC-FID não se observou nenhum produto de biotransformado. A dinitrila permaneceu no meio reacional (Figura 73).

Figura 73 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 3-hidroxipentanodinitrila **9**.

(a) Padrão da 3-hidroxipentanodinitrila **9**. (b) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 3-hidroxipentanodinitrila **9** (20 μL /100 μL DMSO) com 10h. (c) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 3-hidroxipentanodinitrila **9** (20 μL /100 μL DMSO) com 24h. (d) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 3-hidroxipentanodinitrila **9** (20 μL /100 μL DMSO) com 96h.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 80^\circ\text{C}$ (1min), $T_f = 170^\circ\text{C}$ (1min), $r = 5^\circ\text{C}/1\text{min}$, $t_c = 15\text{min}$

Pelos resultados apresentados pelas nitrilas **8** e **9**, observa-se que esta classe de nitrilas alifáticas é mais difícil de ser biotransformada pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

4.7 Biotransformação da (±)-mandelonitrila **10**

Ainda com o intuito de avaliar a seletividade das enzimas presentes no fungo *A. sydowii* CBMAI 934 realizou-se estudos com a (±)-mandelonitrila **10**. Semelhante às demais reações, iniciou-se os experimentos com diferentes quantidades de (±)-mandelonitrila **10** (20, 40 e 60 μ L), após o crescimento microbiano na presença da fenilacetoneitrila **1** (96h).

Alíquotas foram retiradas a cada 24h em um período de 96h de reação e analisadas por GC-FID. Foi possível observar através das análises uma diferença bastante significativa na reação com 20 μ L em relação às reações com 40 e 60 μ L. Em 20 μ L com 48h o substrato **10** foi totalmente biotransformado, enquanto com 40 e 60 μ L a (±)-mandelonitrila **10** foi biotransformada gradativamente no período de 96h (Figura 74) (Tabela 17).

Figura 74 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da (±)-mandelonitrila **10**.

(a) Padrões da (±)-mandelonitrila **10**, benzaldeído **10b** e fenilacetoneitrila **1**. (b) Padrão do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**. (c) Padrão do álcool benzílico **10c**. (d) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 20 μ L de (±)-mandelonitrila **10** com 24h. (e) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 40 μ L de (±)-mandelonitrila **10** com 96h. (f) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 60 μ L de (±)-mandelonitrila **10** com 96h.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 100^\circ\text{C}$ (2min), $T_f = 160^\circ\text{C}$ (2min), $r = 5^\circ\text{C}/2\text{min}$, $t_c = 16\text{min}$

Tabela 17 - Biotransformação da fenilacetoneitrila **1** e (±)-mandelonitrila **10** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Tempo (h)	v (μL)	c (%) 1	c (%) 1b	c (%) ^b	c (%) 10c
24 ^a	20	-	17	3	80
96		-	12	-	88
24 ^a	40	-	14	51	35
96		-	13	26	61
24 ^a	60	-	11	74	15
96		-	10	63	27

^a Análise realizada por GC-FID após adição da (±)-mandelonitrila **10** com 24h de reação^b Corresponde à mistura de (±)-mandelonitrila **10** e benzaldeído **10b**

c (%): conversão determinada por GC-FID

Foram realizadas análises por GC-MS das reações correspondentes à 24h e 96h para cada uma das quantidades de (±)-mandelonitrila **10**. Através dos dados fornecidos pelas bibliotecas Nist e Nist 5 em relação as análises com 24h de reação para todas as quantidades (20, 40 e 60 μL) observou-se a presença do benzaldeído **10b** e seu correspondente produto de redução, o álcool benzílico **10c**, principalmente para a reação com 20 μL que praticamente não foi observado o benzaldeído, apenas o álcool benzílico (Esquema 39) (Figura 74).

Também se observou a biotransformação total da fenilacetoneitrila **1** ao ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**, como discutido no item 4.3.

Esquema 39 - Biotransformação da fenilacetoneitrila **1** e (±)-mandelonitrila **10** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Os padrões (±)-mandelonitrila **10** e benzaldeído **10b** analisados no GC-FID, tanto em coluna DB-5, quanto em coluna quiral β-ciclodextrina sobre os mesmos parâmetros, apresentaram tempo de retenções idênticos.

Partindo destes resultados foram realizadas reações de esterificações para cada extrato oriundo das reações de biotransformação nas diferentes quantidades da (±)-mandelonitrila **10** (20, 40 e 60 μL) para observar a possível formação do acetato a partir da (±)-mandelonitrila **10** remanescente.

A preparação do acetato **10a** foi necessária devido à (±)-mandelonitrila **10** não ter apresentado separação enantiomérica por análise em GC-FID na coluna quiral e por apresentar tempo de retenção igual ao benzaldeído **10b**. Enquanto, o acetato racêmico **10a** apresentou

separação enantiomérica em coluna quiral. A reação com 20 μL de ($\pm$)-mandelonitrila foi repetida para ser cessada ainda com presença do substrato (24h) para ser submetida à reação de esterificação.

Após derivatização com $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Pi}$, observou-se pelas análises por GC-FID em coluna quiral de β -ciclodextrina, a presença do acetato racêmico para as frações (40 e 60 μL) em baixas concentrações ($c \leq 8\%$). Na fração correspondente a 20 μL , devido à quantidade de ($\pm$)-mandelonitrila **10** remanescente ter sido muito pequena, não foi observado o acetato racêmico (Figura 75) (Tabela 18).

Figura 75 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da esterificação da ($\pm$)-mandelonitrila **10**.

(a) Padrões da ($\pm$)-mandelonitrila **10** e benzaldeído **10b**. (b) Padrão do acetato racêmico da mandelonitrila. (c) Padrão do álcool benzílico **10c**. (d) Padrão do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**. (e) Reação de esterificação ($\text{Ac}_2\text{O}/\text{Pi}$) do extrato bruto correspondente a reação de 20 μL de ($\pm$)-mandelonitrila **10** pelo o fungo *A. sydowii* CBMAI 934. (f) Reação de esterificação ($\text{Ac}_2\text{O}/\text{Pi}$) do extrato bruto correspondente a reação de 40 μL de ($\pm$)-mandelonitrila **10** pelo o fungo *A. sydowii* CBMAI 934. (g) Reação de esterificação ($\text{Ac}_2\text{O}/\text{Pi}$) do extrato bruto correspondente a reação de 60 μL de ($\pm$)-mandelonitrila **10** pelo o fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 100^\circ\text{C}$ a 175°C ; $r = 10^\circ\text{C}/2\text{min}$; $T_f = 180^\circ\text{C}$; $r = 5^\circ\text{C}/5\text{min}$; $t_c = 15,5\text{min}$

Tabela 18 - Resultados das esterificações dos extratos oriundos das reações com (±)-mandelonitrila **10** com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Volume (μL) 10	c (%) ^a	c (%) 10c	c (%) 1b	c (%) 10a
20	13	43	44	-
40	67	13	14	6
60	69	10	13	8

^a Corresponde à mistura de (±)-mandelonitrila **10** e benzaldeído **10b**

c (%): conversão determinada por GC-FID

Foi possível observar pelas reações da (±)-mandelonitrila **10** com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 uma maior produção do benzaldeído **10b**, pois no decorrer do tempo reacional observou-se um aumento na produção do álcool benzílico **10c**, principalmente na reação com 20 μL que em 24h praticamente não apresentava a (±)-mandelonitrila **10**. Logo, conclui-se que a (±)-mandelonitrila **10** foi biotransformada no benzaldeído **10b** e este reduzido ao álcool benzílico **10c**. Entretanto, não é possível afirmar que esta biotransformação tenha sido exclusivamente enzimática, pois pelo espectro de RMN de ¹H do padrão (±)-mandelonitrila **10** (Figura 98, em anexo) foi observado um sinal correspondente a hidrogênio de aldeído em δ_H 9,95, em pequena proporção (≤ 5%). Como também, pelas análises realizadas por HPLC dos padrões benzaldeído **10b** e (±)-mandelonitrila **10**, observou-se à presença do benzaldeído **10b** no padrão da (±)-mandelonitrila **10** (Figuras 99 e 100, em anexo). Logo, é possível afirmar que há uma conversão instantânea, um equilíbrio químico da (±)-mandelonitrila **10** ao benzaldeído **10b** (Esquema 40).

Esquema 40 - Sequência de produtos que foram biotransformados a partir da (±)-mandelonitrila **10** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Dentre as enzimas que catalisam nitrilas, inclui a hidroxinitrila liase (HNL) que converte cianoidrinas (α -hidroxinitrilas) a aldeído e ácido cianídrico, inclusive há relatos na literatura da atividade de HNL isolada da bactéria *Xylella fastidiosa* expressada em *Escherichia coli*, cuja enzima converteu a ($\pm$)-mandelonitrila ao benzaldeído (CARUSO et al., 2009). Logo, através dos resultados alcançados pela reação da ($\pm$)-mandelonitrila **10** com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 é possível sugerir a presença da enzima HNL, como também, a presença da enzima álcool desidrogenase que foi capaz de reduzir o benzaldeído **10b** ao álcool benzílico **10c**.

Baseado nos resultados das reações com a 3-hidroxipentanodinitrila **9** e ($\pm$)-mandelonitrila **10** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934 não foi possível avaliar a seletividade das enzimas presentes no sistema enzimático.

4.8 Biotransformação das nitrilas aromáticas 11-18 e hetero-aromáticas 19 e 20

4.8.1 Nitrilas aromáticas 11-18

Uma vez que o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 biotransformou o grupo ciano ligado a carbono sp^3 despertou-nos interesse em verificar seu comportamento enzimático diante de nitrilas contendo o grupo ciano ligado a carbono sp^2 . Para tanto, foi selecionado a benzonitrila e derivados, usando a mesma metodologia de crescimento e adaptação microbiana.

Através das análises pelo GC-FID observou-se que as nitrilas aromáticas: benzonitrila **11**, 2-clorobenzonitrila **12**, 4-hidroxibenzonitrila **13**, 4-metoxibenzonitrila **14**, 3,5-dimetoxibenzonitrila **15**, *orto*-nitrobenzonitrila **16**, *meta*-nitrobenzonitrila **17** e *para*-nitrobenzonitrila **18**, não foram biotransformadas, permanecendo no meio reacional (Figuras 76-83). Contudo, destaca-se que a fenilacetoneitrila **1** foi totalmente biotransformada. Logo a enzima responsável pela biotransformação do grupo ciano estava ativa nestas condições.

Figura 76 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da benzonitrila **11**.

(a) Padrões da benzonitrila **11** e fenilacetoneitrila **1**. (b) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 20 μL de benzonitrila **11** com 24h. (c) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 20 μL de benzonitrila **11** com 96h.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 80^\circ C$ (1min), $T_f = 150^\circ C$ (5min), $r = 10^\circ C/min$, $t_c = 13min$

Figura 77 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 2-clorobenzonitrila **12**.

(a) Padrão da fenilacetoneitrila **1**. (b) Padrão da 2-clorobenzonitrila **12**. (c) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 20 mg de 2-clorobenzonitrila **12** em 100 μ L de DMSO com 24h. (c) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 20 mg de 2-clorobenzonitrila **12** em 100 μ L de DMSO com 96h.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 120^\circ\text{C}$ (1min), $T_f = 210^\circ\text{C}$ (5min), $r = 10^\circ\text{C/min}$, $t_c = 15\text{min}$

Figura 78 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 4-hidroxibenzonitrila **13**.

(a) Padrões da fenilacetoneitrila **1** e 4-hidroxibenzonitrila **13**. (b) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 20 mg de 4-hidroxibenzonitrila **13** em 100 μ L de DMSO com 24h. (c) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 20 mg de 4-hidroxibenzonitrila **13** em 100 μ L de DMSO com 96h.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 120^\circ\text{C}$ (1min), $T_f = 210^\circ\text{C}$ (5min), $r = 10^\circ\text{C/min}$, $t_c = 15\text{min}$

Figura 79 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 4-metoxibenzonitrila **14**.

(a) Padrão da 4-metoxibenzonitrila **14**. (b) Padrão da fenilacetona nitrila **1**. (c) Padrão da 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**. (d) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 20 mg de 4-metoxibenzonitrila **14** em 100 µL de DMSO com 24h. (e) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 20 mg de 4-metoxibenzonitrila **14** em 100 µL de DMSO com 96h.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 100^\circ\text{C}$ (1min) $T_f = 180^\circ\text{C}$ (5min), $r = 10^\circ\text{C}/\text{min}$, $t_c = 14\text{min}$

Figura 80 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 3,5-dimetoxibenzonitrila **15**.

(a) Padrão da fenilacetona nitrila **1**. (b) Padrão da 3,5-dimetoxibenzonitrila **15**. (c) Padrão do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**. (d) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 20 mg de 3,5-dimetoxibenzonitrila **15** em 100 µL de DMSO com 96h. Condições de análise no GC-FID: $T_i = 120^\circ\text{C}$ (1min), $T_f = 220^\circ\text{C}$ (5min), $r = 10^\circ\text{C}/\text{min}$, $t_c = 16\text{min}$

Figura 81 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 2-nitrobenzonitrila **16**.

- (a) Padrão da 2-nitrobenzonitrila **16**. (b) Padrão da fenilacetnitrila **1**. (c) Padrão do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**.
(d) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 20 mg de 2-nitrobenzonitrila **16** em 100 μ L de DMSO com 24h.
(e) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 20 mg de 2-nitrobenzonitrila **16** em 100 μ L de DMSO com 96h.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 130^\circ\text{C}$ (1min) $T_f = 210^\circ\text{C}$ (5min), $r = 10^\circ\text{C/min}$, $t_c = 14\text{min}$

Figura 82 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 3-nitrobenzonitrila **17**.

- (a) Padrão da fenilacetonnitrila **1**. (b) Padrão da 3-nitrobenzonitrila **17**. (c) Padrão do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**.
(d) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 20 mg de 3-nitrobenzonitrila **17** em 100 μ L de DMSO com 24h.
(e) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 20 mg de 3-nitrobenzonitrila **17** em 100 μ L de DMSO com 96h.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 130^\circ\text{C}$ (1min) $T_f = 210^\circ\text{C}$ (5min), $r = 10^\circ\text{C/min}$, $t_c = 14\text{min}$

Figura 83 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 4-nitrobenzonitrila **18**.

(a) Padrões da fenilacetona **1** e 4-nitrobenzonitrila **18**. (b) Padrão do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**. (c) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 20 mg de 4-nitrobenzonitrila **18** em 100 µL de DMSO com 24h. (d) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 20 mg de 4-nitrobenzonitrila **18** em 100 µL de DMSO com 96h.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 100^\circ\text{C}$ (1min) $T_f = 210^\circ\text{C}$ (5min), $r = 10^\circ\text{C}/\text{min}$, $t_c = 17\text{min}$

Nos cromatogramas (c) e (d) da figura 83 correspondente à reação com a nitrila **18** foi observado um terceiro pico ($t_r = 10,2\text{min}$). Pelas análises realizadas em GC-MS através dos dados fornecidos pelas bibliotecas Nist e Nist 5, observou-se uma discreta redução no grupo nitro ao grupo amino da *para*-nitrobenzonitrila **18**, assim a reação com a nitrila **18** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934 forneceu a 4-aminobenzonitrila **18a** (Esquema 41) (Figura 84).

Esquema 41 - Biotransformação da fenilacetona **1** e 4-nitrobenzonitrila **18** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Figura 84 - Espectros de massas (70 eV) da 4-aminobenzonitrila **18a** obtido pela redução da 4-nitrobenzonitrila **18** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Os nitrocompostos são precursores das correspondentes aminas por redução do grupo nitro (COMASETO et al., 2006). Possivelmente, o grupo nitro na posição *orto* e *meta* do anel aromático das nitrobenzonitrilas **15** e **16** não foi reduzido devido ao impedimento estéreo.

Pelos resultados alcançados é possível afirmar que as enzimas que hidrolisam nitrilas presente no fungo de origem marinha *A. sydowii* CBMAI 934, nestas condições de reação, catalisam preferencialmente nitrilas arilalifáticas.

Estudos realizados por Rustler et al. com a levedura *Exophiala oligosperma* R1 mostraram a alta atividade da hidrólise de nitrilas aromáticas através de experimentos realizados por indução pela 2-cianopiridina (RUSTLER et al., 2008). Anteriormente, este composto foi identificado por outros pesquisadores como um poderoso indutor de sistemas de hidrólise de nitrilas em diferentes fungos filamentosos, tais como: *Aspergillus niger* K10, *Fusarium oxysporum* CCF 1414, *F. oxysporum* CCF 483, *F. solani* O1 e *Penicillium multicolor* CCF 244 (KAPLAN et al., 2006b). Como também, estudos relataram o uso da 3-cianopiridina, como indutora da atividade enzimática de nitrilas. Segundo Snajdrová et al. a atividade hidrolítica intracelular do fungo *Aspergillus niger* K10 frente à benzonitrila foi induzida na presença da 3-cianopiridina, tanto na presença, quanto na ausência de nitrato de sódio. Quando na ausência de 3-cianopiridina, e apenas na presença de nitrato de sódio, não observaram a conversão da benzonitrila ao ácido benzóico (SNAJDROVÁ et al., 2004).

Segundo Kaplan et al. em um estudo sobre indução de nitrilases por fungos filamentosos, a 2-cianopiridina foi a melhor indutora em comparação a 3-cianopiridina e 4-cianopiridina (KAPLAN et al., 2006b).

Com base em nossos resultados diante das nitrilas aromáticas e estes apresentados pela literatura sobre indução de nitrilases aromáticas com cianopiridinas, outra metodologia foi estabelecida para que pudessemos avaliar a biotransformação de nitrilas aromáticas pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934. Para tanto, além da fenilacetoneitrila **1** foi utilizado a 2-cianopiridina **19** para induzir o sistema enzimático do fungo *A. sydowii* CBMAI 934 a biotransformar nitrilas aromáticas.

4.8.2 Benzonitrila **11** e 2-cianopiridina **19**

O fungo *A. sydowii* CBMAI 934 foi cultivado sobre as mesmas condições, induzido pela fenilacetone nitrila **1** (60 μ L). Após o crescimento microbiano (96h), foi adicionada a benzonitrila **11** e 2-cianopiridina **19**.

Pelas análises realizadas por GC-FID observou-se que a benzonitrila **11** foi praticamente consumida com 48h de reação, bem como, um gradativo consumo da 2-cianopiridina **19** fornecendo um produto de biotransformação (Figura 85) (Tabela 19). Alíquotas extraídas foram analisadas em GC-MS e os dados fornecidos pelas bibliotecas Nist e Nist 5 mostraram a obtenção da 2-piridinamida **19a** (Esquema 42).

Figura 85 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da benzonitrila **11** e 2-cianopiridina **19**.

(a) Padrões da benzonitrila **11**, 2-cianopiridina **19** e fenilacetone nitrila **1**. (b) Padrão do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**. (c) Padrão da 2-piridinamida **19a**. (d) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com benzonitrila **11** e 2-cianopiridina **19** (20 μ L) com 48h. (e) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com benzonitrila **11** e 2-cianopiridina **19** (20 μ L) com 96h.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 100^\circ\text{C}$ (2min), $T_f = 160^\circ\text{C}$ (2min), $r = 5^\circ\text{C/min}$, $t_c = 16\text{min}$

Tabela 19 - Biotransformação da fenilacetoneitrila **1**, benzonitrila **11** e 2-cianopiridina **19** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Tempo (h)	c (%) 1	c (%) 11	c (%) 19	c (%) 1b	c (%) 19a
24	100	-	-	-	-
96 ^a	-	100	100	100	-
144	-	22	65	9	4
192	-	-	61	7	32

^aApós completar 96h de reação foi adicionada a benzonitrila **11** e a 2-cianopiridina **19** e a reação permaneceu por mais 96h

c (%) = conversão determinada por GC-FID

Esquema 42 - Biotransformação da fenilacetoneitrila **1**, 2-cianopiridina **19** e benzonitrila **11** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

4.8.3 2-Cianopiridina **19**

Os experimentos foram realizados com o fungo previamente cultivado na presença de fenilacetoneitrila **1** e após 96h foi adicionada apenas a 2-cianopiridina **19** (20, 40 e 60 μ L), a cada reação para verificar se a benzonitrila **11** tinha alguma influência na formação do produto biotransformado da 2-cianopiridina **19**. Foi observado a reprodutibilidade da reação, ou seja, a formação da amida correspondente a 2-cianopiridina **19** em relação à reação que continha 20 μ L (Tabela 20) (Esquema 43). Porém, para as demais quantidades de 2-cianopiridina (40 e 60 μ L) não foi observado nenhum produto que correlacionasse ao produto biotransformado pela 2-cianopiridina **19** (Figura 86). Assim, foi possível afirmar que a benzonitrila **11** não influenciou na biotransformação da 2-cianopiridina **19**.

Todas as análises, tanto das reações realizadas na presença, quanto na ausência de benzonitrila **11** foram comparadas com o padrão sintético da amida correspondente por GC-FID e GC-MS (Figuras 85-90).

Esquema 43 - Biotransformação da fenilacetoneitrila **1** e 2-cianopiridina **19** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Tabela 20 - Biotransformação da fenilacetoneitrila **1** e 2-cianopiridina **19** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Tempo (h)	c (%) 1	c (%) 19	c (%) 1b	c (%) 19a
24	100	-	-	-
96 ^a	-	100	100	100
192	-	19	53	28

^aApós completar 96h de reação foi adicionada a 2-cianopiridina **19** (20 µL) e a reação permaneceu por mais 96h

c (%) = conversão determinada por GC-FID

Figura 86 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da 2-cianopiridina **19**.

(a) Padrão da 2-cianopiridina **19**. (b) Padrão da fenilacetoneitrila **1**. (c) Padrão do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**. (d) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 2-cianopiridina **19** (20 µL) (sem adição da benzonitrila) com 96h. (e) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 2-cianopiridina **19** (40 µL) (sem adição da benzonitrila) com 96h. (f) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com 2-cianopiridina **19** (60 µL) (sem adição da benzonitrila) com 96h.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 100^\circ\text{C}$, 2min; $T_f = 160^\circ\text{C}$, 2min; $r = 5^\circ\text{C}/2 \text{ min}$, $t_c = 16 \text{ min}$

Figura 87 - Cromatograma obtido por GC-MS da reação de biotransformação da 2-cianopiridina **19** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Figura 88 - Espectro de massas (70 eV) da 2-piridinamida **19a** obtida da biotransformação da 2-cianopiridina **19** pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Figura 89 - Cromatograma obtido por GC-MS do padrão sintético da 2-piridinamida **19a**.

Figura 90 - Espectro de massas (70 eV) do padrão sintético da 2-piridinamida **19a**.

4.8.4 Benzonitrila **11** e 4-cianopiridina **20**

A reação foi realizada seguindo os mesmos procedimentos do item 4.8.2, porém, pelas análises por GC-FID, tanto a benzonitrila **11**, quanto a 4-cianopiridina **20** permaneceram no meio reacional (Figura 91). Ressaltando que a fenilacetoneitrila **1** foi totalmente biotransformada.

Figura 91 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da benzonitrila **11** e 4-cianopiridina **20**.

(a) Padrões da benzonitrila **11**, 4-cianopiridina **20** e fenilacetoneitrila **1**. (b) Padrão do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**. (c) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com benzonitrila **11** e 4-cianopiridina **20** (20 µL) com 96h.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 100^\circ\text{C}$, 2min; $T_f = 160^\circ\text{C}$, 2min; $r = 5^\circ\text{C}/2\text{min}$, $t_c = 16\text{min}$

Vale ressaltar, que a benzonitrila **11** foi totalmente consumida quando na presença de 2-cianopiridina **19** e fenilacetoneitrila **1** (Figura 85, pág. 123), enquanto a reação realizada na ausência de 2-cianopiridina **19**, a benzonitrila **11** permaneceu no meio reacional (Figura 76, pág. 105), logo foi possível sugerir a biotransformação da benzonitrila **11** quando foi adicionada ao sistema reacional junto com a 2-cianopiridina **19**. Porém, não foi possível detectar seu correspondente produto biotransformado, possivelmente deve ter sido rapidamente biodegradado pelo micro-organismo. Para tanto, foi realizado o experimento adicionando além da benzonitrila **11** e a cianopiridina **19**, o ácido benzóico, para verificar se o mesmo era degradado pelo fungo. Pelas

análises por GC-FID, observou-se que o ácido benzóico foi biodegradado durante o tempo reacionl (48h) (Figura 92).

Figura 92 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biotransformação da benzonitrila **11**, 2-cianopiridina **19** e ácido benzóico.

(a) Padrões da benzonitrila **11**, 2-cianopiridina **19** e fenilacetnitrila **1**. (b) Padrão do ácido benzóico. (c) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com benzonitrila, 2-cianopiridina e ácido benzóico com 3h. (d) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com benzonitrila, 2-cianopiridina e ácido benzóico com 24h. (e) Reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 com benzonitrila, 2-cianopiridina e ácido benzóico com 48h.

Condições de análise GC-FID: $T_i = 100^\circ\text{C}$, 2min; $T_f = 160^\circ\text{C}$, 2min; $r = 5^\circ\text{C}/2\text{min}$, $t_c = 16\text{min}$

Segundo estudos realizados por Snajdrová et al. com diversos tipos de nitrilas, a benzonitrila **11** foi o melhor substrato a biotransformar-se no correspondente ácido carboxílico, entretanto, o ácido benzóico foi consumido pelo fungo no decorrer da reação, como observado com o fungo marinho *A. sydowii* CBMAI 934 (SNAJDROVÁ et al., 2004).

Diante destes resultados para as reações com a benzonitrila **11** e 2-cianopiridina **19**, o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 foi induzido ao crescimento em meio sólido mineral suplementado

com glicose e 2-cianopiridina **19** (5,0 μ L; 0,052 mmol), o qual apresentou um discreto crescimento na placa (Figura 93).

Figura 93 - Indução em meio sólido do fungo *A. sydowii* CBMAI 934 pela 2-cianopiridina **19**.

Para verificar se a 2-cianopiridina **19** teve um papel indutor na biotransformação da benzonitrila **11**, um experimento foi realizado em meio líquido mineral suplementado com glicose e 2-cianopiridina **19** (20,0 μ L; 0,21 mmol) com o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 previamente cultivado na presença de 2-cianopiridina **19**, cuja benzonitrila **11** foi adicionada após 96h.

Pelas análises por GC-FID observou-se que tanto a 2-cianopiridina **19**, quanto à benzonitrila **11** permaneceram no meio reacional. Assim, confirmamos a influência da fenilacetona **1** na indução do fungo *A. sydowii* CBMAI 934, e que as duas nitrilas, tanto a fenilacetona **1**, quanto a 2-cianopiridina **19** foram importantes para promover a biotransformação da benzonitrila **11**.

Com o objetivo de detectar a enzima responsável/presente pela biotransformação das nitrilas foram realizados vários experimentos seguindo protocolos descritos na literatura para extração e purificação de nitrilases e/ou nitrila hidratase por análises de eletroforese capilar por gel de poliacrilamida (PAGE) (KAPLAN et al., 2006c; VEJVODA et al., 2008). Entretanto, não foi obtido resultado satisfatório.

5 CONCLUSÃO

Através de um *screening* com 12 cepas de fungos de origem marinha em meio sólido mineral suplementado com glicose e fenilacetoneitrila **1**, como única fonte de nitrogênio, foi possível selecionar 8 linhagens, dentre estas, todas mostraram uma boa adaptação em meio líquido mineral na presença de 20, 40 e 60 µL de fenilacetoneitrila **1**. Aos experimentos controles (ausência de fenilacetoneitrila **1**) não houve crescimento microbiano, evidenciando, assim, a grande influência da fenilacetoneitrila **1** como indutora do crescimento dos micro-organismos.

A fenilacetoneitrila **1** foi biotransformada ao ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b**. Portanto, os fungos selecionados apresentaram potencial para biotransformar derivados da fenilacetoneitrila **1**.

As nitrilas arilalifáticas; 4-fluorofenilacetoneitrila **2**, 4-clorofenilacetoneitrila **3**, 4-metoxifenilacetoneitrila **4**, 2-metilfenilacetoneitrila **5**, 3-metilfenilacetoneitrila **6** e 4-metilfenilacetoneitrila **7** foram biotransformadas aos seus correspondentes ácidos 4-fluorofenilacético **2a**, 4-clorofenilacético **3a**, 4-metoxifenilacético **4a**, 2-metilfenilacético **5a**, 3-metilfenilacético **6a** e 4-metilfenilacético **7a** com 100% de conversão e sem nenhum produto intermediário. Como também, a nitrila alifática 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acetoneitrila **8** foi biotransformada ao ácido 2-(1-ciclo-hexen-1-il)acético **8a** sem apresentar nenhum produto intermediário.

Através dos resultados apresentados pelas biotransformações das nitrilas arilalifáticas **2-7** foi possível sugerir uma melhor compreensão do caminho enzimático para a formação do ácido 2-(2-hidroxifenil)acético **1b** oriundo da biotransformação da fenilacetoneitrila **1**, ou seja, primeiramente ocorreu a reação de hidrólise do grupo nitrila, e posteriormente, a hidroxilação (inserção da hidroxila na posição *orto* do anel aromático), pois aos correspondentes ácidos carboxílicos **2a-7a** apenas ocorreu a reação de hidrólise do grupo ciano. Como também, sugere-se que a hidroxilação pode ocorrer, simultaneamente, à reação de hidrólise, haja vista que a reação em relação ao ácido fenilacético **1a** não ocorreu a hidroxilação deste composto. E, esta reação de hidroxilação pode estar sendo realizada por ação de uma mono-oxigenase presente no sistema enzimático.

A fenilacetoneitrila **1** foi metabolizada e utilizada como fonte de nitrogênio, como também foi indutora na atividade de conversão de nitrilas ligada a carbono sp^3 e sp^2 , tanto para nitrila aromática **11**, quanto nitrila hetero-aromática **19**. A biotransformação da benzonitrila **11** só foi possível quando o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 foi induzido pela fenilacetoneitrila **1** e ao sistema reacional foi adicionado a 2-cianopiridina **19**, evidenciando que as enzimas capazes de hidrolisar nitrilas presente no fungo são do tipo construtivas.

Pela bioconversão das nitrilas **2-8** aos seus correspondentes ácidos carboxílicos **2a-8a** é possível sugerir que estas nitrilas estão sendo ativadas pelas enzimas nitrilases e/ou nitrila hidratases. E, possivelmente a conversão da 2-cianopiridina **19** a correspondente 2-piridinamida **19a** seja pela ação da nitrila hidratase.

No complexo sistema enzimático presente no fungo *A. sydowii* CBMAI 934 através das reações realizadas, também foi possível sugerir a presença da hidroxinitrila liase pela conversão da ($\pm$)-mandelonitrila **10** ao benzaldeído **10b** e álcool desidrogenase pela redução do benzaldeído **10b** ao álcool benzílico **10c**.

Os resultados alcançados neste trabalho, o primeiro estudo de hidrólise de nitrilas por micro-organismos de origem marinha no Brasil foram bastante satisfatórios. O fungo marinho *A. sydowii* CBMAI 934 mostrou ser uma ótima fonte de enzimas que hidrolisam nitrilas.

REFERÊNCIAS

- ASANO, Y.; TANI, Y.; YAMADA, H. A new enzyme "Nitrile Hydratase" which degrades acetonitrile in combination with amidases. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, p. 2251-2252, 1980.
- ALLOUCHE, N.; SAYADI, S. Synthesis of hydroxytyrosol, 2-hydroxyphenylacetic acid, and 3-hydroxyphenylacetic acid by differential conversion of tyrosol isomers using *Serratia marcescens* strain. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6525-6530, 2005.
- BANERJEE, A.; SHARMA, R.; BANERJEE, U. C. The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 33-44, 2002.
- BAIOCCHI, L.; GIANNANGELI, M. Aromatization of aliphatic compounds, *o*- and *m*-tolylacetic acids. **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 4499-4500, 1979.
- BASU, M. K.; LUO, F-T. Efficient transformation of nitrile into amide under mild condition. **Tetrahedron Letters**, v. 39, p. 3005-3006, 1998.
- BENZ, P.; MUNTWYLER, R.; WONLGEMUTH, R. Chemoenzymatic synthesis of chiral carboxylic acids via nitriles. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 1087-1098, 2007.
- BELLEAU, B.; GULINI, U.; GOUR-SALIN, B.; AHMED, F. R. Synthesis and crystal structure of 17-deaza-17-methyl thionium isomorphinan (isosulforphanol) perchlorate, an isostere of the opiate isolevorphanol. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 63, p. 1269-1274, 1985.
- BERGERON, S.; CHAPLIN, D. A.; EDWARDS, J. H.; ELLIS, B. S. W.; HILL, C. L.; HOLT-TIFFIN, K.; KNIGHT, J. R.; MAHONEY, T.; OSBORNE, A. P.; RUECROFT, G. Nitrilase catalysed desymmetrisation of 3-hydroxyglutaronitrile: preparation of a statin side-chain intermediate. **Organic Process Research & Development**, v. 10, p. 661-665, 2006.
- BESHAY, U.; MOREIRA, A. Protease production from marine microorganism by immobilized cells. In: AIChE ANNUAL MEETING, 39., 2004, **Proceedings...** Austin: Computer Optical, 2004. p. 488G/1-488G/13.
- BIRNBAUM, J.; KAHAN, F.; KROPP, H.; MACDONALD, J. S. Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics – discovery and development of Imipenen/Cilastatin. **The American Journal of Medicine**. v. 78, p. 3-21, 1985.
- BORNSCHEUER, T. U.; KAZLAUSKAS, R. J. **Hydrolases in organic synthesis**. 2 ed. Weinheim: WILEY-VCH, 2006. 355 p.
- BRADY, D.; BEETON, A.; ZEEVAART, J.; KGAJE, C.; RANTWIJK, E.; SHELDON, R. A.; Characterisation of nitrilase and nitrile hydratase biocatalytic systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 76-85, 2004.
- BUGNI, T. S.; IRELAND, C. M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 21, p. 143-163, 2004.

- CARUSO, C. S.; TRAVENSOLO, R. F.; BICUDO, R. C.; LEMOS, E. G. M.; ARAÚJO, A. P. U.; CARRILHO, E. α -Hydroxyliase lyase protein from *Xylella fastidiosa*: Cloning, expression, and characterization. **Microbial Pathogenesis**, v. 47, p. 118-127, 2009.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, p.146-156, 2004.
- CHANDRASEKARAN, M.; KUMAR, R. Marine microbial enzymes. In: **ENCYCLOPEDIA of life support systems**. Paris: EOLSS, 2009. v. 9.
- CHEN, J.; ZHENG, R-C.; ZHENG, Y-G.; SHEN, Y-C. Microbial Transformation of nitriles to high-value acids or amides. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.113, p. 33-77, 2009.
- CHEN, J.; ZHENG, Y-G.; SHEN, Y-C. Biotransformation of *p*-methoxyphenylacetonitrile into *p*-methoxyphenylacetic acid by resting cells of *Bacillus subtilis*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 50, p. 147-153, 2008.
- COMASSETO, J. V.; ASSIS, L. F.; ANDRADE, L. H.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; PORTO, A. L. M.; Biotransformations of *ortho*-, *meta*- and *para*-aromatic nitrocompounds by strains of *Aspergillus terreus*: Reduction of ketones and deracemization of alcohols. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 24-30, 2006.
- COSTA, V. E.; AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v. 22, p. 863-873, 1999.
- DESANTIS, G.; ZHU, Z.; GREENBERG, A.; WONG, K.; CHAPLIN, J.; HANSON, S. R.; FARWELL, B.; NICHOLSON, L. W.; RAND, C.L.; WEINER, D. P.; ROBERTSON, D. E.; BURK, M. J. An enzyme library approach to biocatalysis: development of nitrilases for enantioselective production of carboxylic acid derivatives. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, p. 9024-9025, 2002.
- DEVI, P.; NAIK, C. G.; RODRIGUES, C. Biotransformation of citrinin to decarboxycitrinin using an organic solvent-tolerant marine bacterium, *Moraxella* sp. MB1. **Marine Biotechnology**, v. 8, p. 129-138, 2006.
- DOLBIER, JUNIOR. W. R. Fluorine chemistry at the millennium. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 126 p. 157-163, 2005.
- EFFENBERGER, F.; OBWALD, S. Enantioselective hydrolysis of (*R,S*)-2-fluoroarylacetonitriles using nitrilases from *Arabidopsis thaliana*. **Tetrahedron:Asymmetry**, v. 12, p. 279-285, 2001.
- EICHHORN, E.; RODUIT, J. P.; SHAW, N.; HEINZMANN, K.; KIENER, A. Preparation of (*S*)-piperazine-2-carboxylic acid, (*R*)-piperazine-2-carboxylic acid, and (*S*)-piperazine-2-carboxylic acid, by kinetic resolution of the corresponding racemic carboxamides with stereoselective amidases in whole bacterial cells. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 8, p. 2533-2536, 1997.

- ELIOPOULOS, G. M.; WENNERSTEN, C. B.; MOELLERING, R. C. Comparative in vitro activity of levofloxacin and ofloxacin against Grampositive bacteria. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 25, p. 35-41, 1996.
- FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. 5.ed. Berlin: Springer-Verlag, 2004. 454 p.
- FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. 6.ed. Berlin: Springer-Verlag, 2011. 5p.
- FANG, Q. K.; GROVER, P.; HAN, Z.; MCCONVILLE, F. X.; ROSSI, R. F.; OLSSON, D. J.; KESSLER, D. W.; WALD, S. A.; SENANAYAKE, C. H. Practical chemical and enzymatic technologies for (S)-1,4-benzodioxan-2-carboxypiperizine intermediate in the synthesis of (S)-doxazosin mesylate. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 12, p. 2169–2174, 2001.
- FENG, Z.; NENKEP, V.; YUN, K.; ZHANG, D.; CHOI, H. D.; KANG, J. S.; SON, B. W. Biotransformation of bioactive (-)-mellein by a marine isolate of bacterium *Stappia* sp. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 985-987, 2010.
- FESSNER, W.-D.; TURNER, N. J.; WANG, M.-X. Biocatalysis – A Gateway to Industrial Biotechnology. **Advances Synthesis & Catalysis**, v. 353, p. 2189-2190, 2011.
- FERREIRA, H. V. **Resolução enzimática de álcoois racêmicos com lipase de *Candida antarctica* e redução de cetonas com fungos de origem marinha**. 2008. 130f. Dissertação (Mestrado em Fisico-Química)-Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- FOURNAND, D.; ARNAUD, A. Aliphatic and enantioselective amidases: from hydrolysis to acyl transfer activity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 381-393, 2001.
- FUNDAÇÃO INSTITUTO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). **Sistema nacional de informações Tóxico-farmacológicas, plantas tóxicas no Brasil, 2009**. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home>. Acesso em: 08 ago. 2012.
- GRUNWALD, P. **Biocatalysis- biochemical fundamentals and applications**. London: Imperial College Press, 2009. 1053 p.
- GHOSH, D.; SAHA, M.; SANA, B.; MURKHERJEE, J. Marine enzymes. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 96, p. 189–218, 2005.
- HADDAR, A.; AGREBI, R.; BOUGATEF, A.; HMIDET, N.; SELLAMI-KAMOUN, A.; NASRI, M. Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent Additive. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3366–3373, 2009.
- HAEFNER, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. **Drug Discovery Today**, n. 8, p. 536–544, 2003.
- HAGMANN, W. K. The many roles for fluorine in medicinal chemistry. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 4359-4369, 2008.

HE, Y. C.; XU, J. H.; XU, Y.; OUYANG, L. M.; PAN, J. Biocatalytic synthesis of (R)-(-)-mandelic acid from racemic mandelonitrile by a newly isolated nitrilase-producer *Alcaligenes* sp. ECU0401. **Chinese Chemical Letters**, v. 18, p. 677-680, 2007.

HE, Y.-C.; XU, J.-H.; SU, J.-H.; ZHOU, L. Bioproduction of glycolic acid from glycolonitrile with a new bacterial isolate of *Alcaligenes* sp. ECU0401. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p.1428-1440, 2010.

HOWDEN, A., PRESTON, G. M. Nitrilase enzymes and their role in plant-microbe interactions. **Microbial Biotechnology**, v. 2, p.441-451, 2009.

JOHNSON, D.; ZABELINSKAJA-MACKOVA, A.; GRIENGL, H. Oxynitrilases for asymmetric C-C bond formation. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, p. 103-109, 2000.

KAPLAN, O.; NIKOLAOU, K.; PISVEJCOVÁ, A.; MARTINKOVÁ, L. Hydrolysis of nitriles and amides by filamentous fungi. **Enzyme Microbial Technology**, v. 38, p. 260-264, 2006a.

KAPLAN, O.; VEJVODA, V.; CHARVATOVA-PISVEJEJOVA, A.; MARTINKOVA, L. Hyperinduction of nitrilases in filamentous fungi. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 33, p. 891-896, 2006b.

KAPLAN, O.; VEJVODA, V.; PLIHAL, O.; POMPACH, P.; KAVAN, D.; BOJAROVÁ, P.; BEZOUSKA, K.; MACKOVÁ, M.; CANTARELLA, M.; JIRKU, V.; KREN, V.; MARTINKOVÁ, L. Purification and characterization of a nitrilases from *Aspergillus niger* K10, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p. 567-575, 2006c.

KATO, Y.; OOI, R.; ASANO, Y. Distribution of aldoxime dehydratase in microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2290-2296, 2000.

KIELBASINSKI, P.; RACHWALSKI, M.; MIKOLAJCZYK, M.; RUTJES, F. P. J.T. Nitrilase-catalysed hydrolysis of cyanomethyl *p*-tolyl sulfoxide: stereochemistry and mechanism. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 19, p. 562-567, 2008.

KIELBASINSKI, P.; RACHWALSKI, M.; MIKOLAJCZYK, M.; SZYREJ, M.; WIECZOREK, M. W.; WIJTMANS, R.; RUTJES, F. P. J.T. Enzyme-promoted desymmetrisation of prochiral bis(cyanomethyl)sulfoxide. **Advances Synthesis & Catalysis**, v. 349, p. 1387-1392, 2007.

KIM, J. T.; KANG, S. G.; WOO, J.-H.; LEE, J.-H.; JEONG, B. C.; KIM, S.-J. Screening and its potential application of lipolytic activity from a marine environment: characterization of a novel esterase from *Yarrowia lipolytica* CL180. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 820-828, 2007.

KOBAYASHI, M.; NAGASAWA, T.; YAMADA, H. Enzymatic synthesis of acrylamide: success story not yet over. **Trends Biotechnology**, v. 10, p. 402-408, 1992.

KOBAYASHI, M.; SHIMIZU, S. Nitrile hydrolases. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, p. 95-102, 2000.

KOKURYO, Y.; KAWATA, K.; NAKATANI, T.; KUGIMIYA, A.; TAMURA, Y.; KAWADA, K.; MATSUMOTO, M.; SUZUKI, R.; KUWABARA, K.; HORI, Y.; OHTANI, M. Synthesis and

evaluation of novel fluorinated methotrexate derivatives for application to rheumatoid arthritis treatment. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 3280-3291, 1997.

KOSSUGA, M. H.; ROMMINGER, S.; XAVIER, C.; MILANETTO, M. C.; VALLE, M. Z.; PIMENTA, E. F.; MORAIS, R. P.; CARVALHO, E.; MIZUNO, C. M.; CORADELLO, L. F. C.; BARROSO, V. M.; VACONDIO, B.; JAVAROTI, D. C. D.; SELEGHIM, M. H. R.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; LIMA, B. L.; GONÇALVES, R.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; SETTE, L. D.; BERLINCK, R. G. S. Evaluating methods for the isolation of marine-derived fungal strains and production of bioactive secondary metabolites. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, p. 257-267, 2012.

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

LI, P.; ALPER, H. Poly(ethylene glycol) promoted reactions of vinylic dibromides dehydrohalogenation and palladium(0)-catalyzed formal oxidative homologation. **Journal Organic Chemistry**, v. 51, p. 4354-4356, 1986.

LI, T.; LIU, J.; BAI, R.; OHANDJA, D-G.; WONG, F-S. Biodegradation of organonitriles by adapted activated sludge consortium with acetonitrile-degrading Microorganisms. **Water Research**, v. 41, p. 3465-3473, 2007.

LIU, J.; WANG, D-X.; ZHENG, Q-Y.; WANG, M-X. Biocatalytic synthesis of highly enantiopure 1,4-benzodioxane-2-carboxylic acid and amide. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 24, p. 1665-1668, 2006.

LOQUE, C. P. **Fungos agrícolas associados à macroalgas do litoral do Paraná e Península Antártica**. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Ciências Biológicas)- Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro preto, 2009.

MADDRELL, S. J.; TURNER, N. J.; KERRIDGE, A.; WILLETTS, A. J.; CROSBY, J. Nitrile hidratase enzymes in organic synthesis: enantioselective synthesis of the lactone moiety of the mevinic acids. **Tetrahedron Letters**, v. 37, p. 6001-6004, 1996.

MASAMUNE, T.; SATO, S.; ABIKO, A.; ONO, M.; MURAI, A. Steric effect in regioselective cyclization of 3,4-epoxy alcohols to oxetanes. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 53, p. 2895-2904, 1980.

MARTINS, M. P.; MOUAD, A. M.; BOSCHINI, L.; SELEGHIM, M. H. R.; SETTE, L. D.; PORTO, A. L. M. Marine fungi *Aspergillus sydowii* and *Trichoderma* sp. catalyze the hydrolysis of benzyl glycidyl ether. **Marine Biotechnology**, v. 13, p. 314-320, 2011.

MARTINS, M. P. **Biotransformação de epóxidos com fungos de origem marinha e síntese de cloroidrinas**. 2008. 107f. Dissertação (Mestrado em Fisico-Química)-Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

MARTINKOVA, L. Nitrile biotransformation by *Aspergillus niger*. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic.**, v. 29, p. 227-232, 2004.

MARTÍNKOVA, L.; VEJVODA, V.; KREN, V. Selection and screening for enzymes of nitrile metabolism. **Journal of Biotechnology**, v. 133, p. 318-326, 2008.

MARTÍNKOVA, L.; KREN, V. Biotransformations with nitrilases. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, p. 130-137, 2010.

MARTÍNKOVA, L.; VEJVODA, V.; KAPLAN, O.; KREN, V.; BEZOUSKA, K.; CANTARELLA, M. Nitrilases from filamentous fungi. In: FESSNER, W-D.; ANTHONSEN, T. (Ed.). **Modern biocatalysis**. Weinheim: Wiley-VCH, 2009a. p. 229-245.

MARTÍNKOVA, L.; VEJVODA, V.; KAPLAN, O.; KUBAC, D.; MALANDRA, A.; CANTARELLA, M.; BEZOUSKA, K.; KREN, V. Fungal nitrilases as biocatalysts: Recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 661-670, 2009b.

MASON, J. R. Oxygenase catalyzed hydroxylation of aromatic compounds: simple chemistry by complex enzymes. **Internacional Journal of Industrial Biotechnology**, v. 8, p. 19-24, 1998.

MATSUI, T.; ONAKA, T.; MARUHASHI, K.; KURANE, K. Benzo[b]thiophene desulfurization by *Gordonia rubropertinctus* strain T08, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 212-215, 2001.

MAUGER, J.; NAGASAWA, T.; YAMADA, H. Nitrile hydratase-catalyzed production of isonicotinamide, picolinamide and pyrazinamide from 4-cyanopyridine, 2-cyanopyridine and cyanopyrazine in *Rhodococcus rhodochrous* J1. **Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 87-95, 1988.

MCNULTY, J.; DAS, P. Development of a one-pot method for the homologation of aldehydes to carboxylic acids. **Tetrahedron**, v. 65, p. 7794-7800, 2009.

MCBRIDE, K. E.; KENNY, J. W.; STALKER, D. M. Metabolism of the herbicide bromoxynil by *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 32, p. 325-330, 1986.

MIYANAGA, A.; FUSHINOBU, S.; ITO, K.; WAKAGI, T. Crystal structure of cobalt-containing nitrile hydratase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 288, p. 1169-1174, 2001.

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

MOSS, S. T.; ROSS, I. K. Marine mycology. The biology of marine Fungi. **Science**, v. 237, p. 543-544, 1987.

MOUAD, A. M. **Biocatalisadores de origem marinha (algas, bactérias, e fungos) para redução estereosseletiva de cetonas**. 2009. 85 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química)-Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MULLER, D.; GABRIEL, J. Bacterial degradation of the herbicide bromoxynil by *Agrobacterium radiobacter* in biofilm. **Folia Microbiology**, v. 44, p. 377-379, 1999.

- NAGASAWA, T., NAKAMURA, T., YAMADA, H. Production of acrylic acid and methacrylic acid using *Rhodococcus rhodochorus* J1 nitrilases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 322-324, 1990.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de lehniger**. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1274 p.
- NIELSEN, D. U.; TAANING, R. H.; LINDHARDT, A. T.; GØGSIG, T. M.; SKRYDSTRUP, T. Palladium-catalyzed approach to primary amides using nongaseous precursors, **Organics Letters**, v. 13, p. 4454-4457, 2011.
- NISHISE, H., KURIHARA, M., TANI, Y. Microbial synthesis of a tranexamic acid intermediate from nitrile. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, p. 2613-2616, 1987.
- ORTEGA, S. N.; NITSCHKE, M.; MOUAD, A. M.; LANDGRAF, M.D.; REZENDE, M. O. O.; SELEGHIM, M. H. R.; SETTE, L. D.; PORTO, A. L. M. P. Isolation of Brazilian marine fungi capable of growing on DDD pesticide. **Biodegradation**, v. 22, p. 43-50, 2011.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 700 p.
- PETRÍCKOVÁ, A., VESELÁ, A. B., KAPLAN, O., KUBAC, D., UHNÁKOVÁ B., MALANDRA A., FELSBERG, J., RINÁGELOVÁ A., WEYRAUCH, P., KREN, V., BEZOUSKA, K., MARTÍNKOVÁ, L. Purification and characterization of heterologously expressed nitrilases from filamentous fungi, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1553–1561, 2012.
- PITT, J. I. **The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces***. London: Academic Press, 1979. 8 p.
- REILLY, C. O.; TURNER, P.D., The nitrilases family of CN hydrolyzing enzymes – a comparative study. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 1161-1174, 2003.
- ROCHA, L.C. **Redução de derivados de acetofenonas com fungos de origem marinha**. 2008. 126f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química)-Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
- ROCHA, L. C.; FERREIRA, H. V.; PIMENTA, E. F.; BERLINCK, R. G. S.; SELEGHIM, M. H. R.; JAVAROTI, D. C. D.; SETTE, L. D.; BONUGLI, R. C.; PORTO, A. L. M. Bioreduction of alphachloroacetophenone by whole cells of marine fungi. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1559-1563, 2009.
- ROCHA, L. C.; FERREIRA, H. V.; PIMENTA, E. F.; BERLINCK, R. G. S.; REZENDE, M. O. O.; LANDGRAF, M. D.; SELEGHIM, M. H. R.; SETTE, L. D.; PORTO, A. L. M. Biotransformation of α -bromoacetophenones by the marine fungus *Aspergillus sydowii*. **Marine Biotechnology**, v. 12, p. 552-557, 2010.
- ROCHA, L. C.; ROSSET, I. G.; RODRIGO, F. L.; RAMINELLI, C.; PORTO, A. L. M. Kinetic resolution of iodophenylethanols by *Candida antarctica* lipase and their application for the synthesis of chiral biphenyl compounds. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 21, p. 926–929, 2010.

ROCHA, L. C.; RODRIGO, F. L.; ROSSET, I. G.; RAMINELLI, C.; MIRNA H. R. SELEGHIM, H. R.M.; SETTE, L. D.; PORTO, A. L. M. Bioconversion of Iodoacetophenones by marine fungi. **Marine Biotechnology**, v. 14, p. 396–401, 2012.

RUSTLER, S.; STOLZ, A. Isolation and characterization of a nitrile hydrolysing acidotolerant black yeast - *Exophiala oligosperma* R1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 899–908, 2007.

RUSTLER, S.; CHMURA, A.; SHELDON, R. A.; STOLZ, A. Characterisation of the substrate specificity of the nitrile hydrolyzing system of the acidotolerant black yeast - *Exophiala oligosperma* R1. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 165–174, 2008.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food- and airborne fungi**. 6th ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. p. 321–331.

SAYED, K. A. E.; LAPHOOKHIEO, S.; BARAKA, H. N.; YOUSAF, M.; HEBERT, A.; BAGALEY, D.; RAINEY, F. A.; MURALIDHARAN, A.; THOMAS, S.; SHAH, G. V. Biocatalytic and semisynthetic optimization of the anti-invasive tobacco (1S,2E,4R,6R,7E,11E)-2,7,11-cembratriene-4,6-diol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 2886–2893, 2008.

SAN-MARTÍN, A.; ROVIROSA, J.; ASTUDILLO, L.; SEPÚLVEDA, B.; RUIZ, D.; SAN-MARTÍN, C. Biotransformation of the marine sesquiterpene pacifenol by a facultative marine fungus. **Natural Product Research**, v. 22, p. 1627–1632, 2008.

SNAJDROVA, R.; KRISTOVA-MYLEROVA, V.; CRESTIA, D.; NIKOLAOU, K.; KUZMA, M.; LEMAIRE, M.; GALLIENNE, E.; BOLTE, J.; BEZOUSKA, KAREL.; VLADIMIR, K.; SHAW, N. M.; ROBINS, K. T.; KIENER, A. Lonza: 20 Years of Biotransformations. **Advances Synthesis & Catalysis**, v. 345, p. 425–435, 2003.

SHAW, N. M. ROBINS K. T. KIENER, A. Lonza: 20 Years of Biotransformations, **Advances Synthesis & Catalysis**, v. 345, p. 425, 2003.

SINGHA, N. C.; SATHYANARAYANA, D. N. Proton and carbon-13 NMR studies of conformational preferences in N-(2-pyridinyl)-2-pyridinecarboxamides. **Spectrochimica Acta**, v. 54, p.1059–1065, 1998.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006. 490 p.

SILVERMAN, R. B. **The organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions**. San Diego: Academic Press, 2000. 717 p.

STAUDENMAIER, H. R.; HAUER, B.; LADNER, W.; PRESSLER, U.; MEYER, J. **Fermentative manufacture of 2-hydroxyphenylacetic acid**. US n. 5739017, 31 mar. 1994.

THUKU, R. N.; BRADY, D.; BENEDIK, M. J.; SEWELL, B. T. Microbial nitrilases: versatile, spiral forming, industrial enzymes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 703–727, 2009.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). National air toxics program: the integrated urban strategy report to congress. **Acrylonitrile**. Washington, [1999 ?]. p. A-15.

VAN DER STELT, C.; HARMS, A. F.; NAUTA, W. TH. The effect of alkylsubstitution in drugs. V. Synthesis and chemical properties of some dibenzo [a,d]1,4-cycloheptadienyl ethers **Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**, v. 4, p. 335-349, 1961.

VEJVODA, V.; KAPLAN, O.; BEZOUSKA, K.; POMPACH, P.; SULC, M.; CANTARELLA, M.; BENADA, O.; UHNAKOVA, B.; RINAGELOVA, A.; LUTZ-WAHL, S.; FISCHER, L.; KREN, V.; MARTINKOVA, L. Purification and characterization of a nitrilase from *Fusarium solani* O1, **Journal Molecular of Catalysis B: Enzymatic**, v. 50, p. 99-106, 2008.

VITA-MARQUES, A. M. ; LIRA, S. P. ; BERLINCK, R. G. S.; SELEGHIM, M. H. R.; SPONCHIADO, S. R. P.; TORNISIELO, S. M. T.; BARATA, M.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; SOUZA, A. O.; GALETTI, F. C. S.; SILVA, C. L.; SILVA, M.; PIMENTA, E. F.; THIEMANN, O.; PASSARINI, M. R. Z.; SETTE, L. D. A multi-screening approach for marine-derived fungal metabolites and the isolation of cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*. **Química Nova**, v. 31, p. 1-5, 2008.

VOSÁHLOVÁ, J.; PAVLU, L.; VOSÁHLO, J.; BRENNER, V. Degradation of Bromoxynil, Ioxynil, Dichlobenil and their Mixtures by *Agrobacterium radiobacter* 8/4. **Pesticide Science**. v. 49, p. 303-306, 1997.

WINKLER, M.; KAPLAN, O.; VEJVODA, V.; KLEMPIER, N.; MARTÍNKOVÁ, L. Biocatalytic application of nitrilases from *Fusarium solani* O1 and *Aspergillus niger* K10. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, p. 243-247, 2009.

WINKLER, M.; GLIEDER, A.; KLEMPIER, N. Enzyme stabilizer DTT catalyses nitrilases analogue hydrolysis of nitriles. **Chemical Communications**, p. 1298-1300, 2006.

WANG, H.; JIANLIANG, N.; XIAOJI, C.; GUOQING, Y. Study on biotransformation of natural coumarin by marine fungus *Mucor* sp. MNP801 and volatile composition. **Zhongguo Haiyang Yaowu**, v. 29, p. 6-9, 2010.

WYATT, J. M.; KNOWLES, C. J. Microbial degradation of acrylonitrile waste effluents: the degradation of effluents and condensates from the manufacture of acrylonitrile. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 35, p. 227-248, 1995.

XIA, S.; CHEN, Y.; XU, H.; HE, C. **Biocatalysis method for preparing 2-hydroxyphenylacetic acid**, CN n. 102586346, 18 jul. 2012.

XUE, Y-P.; LIU, Z-Q.; XU, M.; WANG, Y-J.; ZHENG, Y-G. Efficient separation of (R)-(-)-mandelic acid biosynthesized from (R,S)-mandelonitrile by nitrilase using ion-exchange process. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1920-1934, 2010.

XU, T.; ZHANG, L.; SU, E.; CUI, D.; WANG, X.; WEI, D. Disparity in productive binding mode of the slow-reacting enantiomer determines the novel catalytic behavior of *Candida antarctica* lipase B. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 288-296, 2010.

YANG, D.; FU, H. A Simple and practical copper-catalyzed approach to substituted phenols from aryl halides by using water as the solvent. **Chemistry - A European Journal**, v. 16, p. 2366-2370, 2010.

YAMAMOTO, K.; UENO, Y.; OTSUBO, K.; KAWAKAMI, K.; KOMATSU, K. Production of S-(+)-Ibuprofen from a nitrile compound by *Acinetobacter* sp. strain AK226. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3125-3129, 1990.

YAMAMOTO, K.; OISHI, K.; FUJIMATSU, I.; KOMATSU, K. Production of R-(-)-mandelic acid from mandelonitrile by *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 3028-3032, 1991.

ZHAN, C.; KIM, S-K. Research and Application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1920-1934, 2010.

ZHEN, Y-G.; CHEN, J.; LIU, Z-Q.; WU, M-H.; XING, L-Y.; SHEN, Y-C. Isolation, identification and characterization of *Bacillus subtilis* ZJB-063, a versatile nitrile-converting bacterium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 985-993, 2008.

ZHOU, G-B.; ZHANG, P-F.; PAN, Y-J. A novel method for synthesis of arylacetic acids from aldehydes, *N*-(2,3,3,6-tetra-*O*-pivaloylated-D-glucopyranosyl)amine and trimethylsilylcyanide. **Tetrahedron**, v. 61, p. 5671-5677, 2005.

ZHU, D.; MUKHERJEE, C.; YANG, Y.; RIOS, B. E.; GALLAGHER, D. T.; SMITH, N. N.; BIEHL, E. R.; HUA, L. A new nitrilase from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 gene cloning, biochemical characterization and substrate specificity. **Journal of Biotechnology**, v. 133, p. 327-333, 2008.

Figura 94 - Espectro na região do infravermelho (KBr cm^{-1}) do padrão ácido fenilacético **1a**. **Figura 95** - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do padrão ácido fenilacético **1a**.

Figura 96 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do padrão ácido fenilacético **1a**.

Figura 97 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do padrão da ($\pm$)-mandelonitrila **10**.

Figura 98 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do padrão da ($\pm$)-mandelonitrila **10**. **Figura 99** - Cromatograma e espectros UV obtidos por HPLC do padrão ($\pm$)-mandelonitrila **10**.

Figura 100 - Cromatograma e espectros UV obtidos por HPLC do padrão benzaldeído **10b**.

Figura 101 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do acetato **10a** da ($\pm$)-mandelonitrila **10**.

Figura 102 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do acetato **10a** da ($\pm$)-mandelonitrila **10**.

Figura 103 - Espectro na região do infravermelho (KBr, cm^{-1}) do padrão 2-piridinamida **19a**.

Figura 104 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do padrão 2-piridinamida **19a**. **Figura 105** - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) o padrão 2-piridinamida **19a**.