

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
Programa de Pós-Graduação em Química

**ROBERTO SUSUMU UTSUNOMIYA**

***Biorreciclagem de hexano e estudo de reações  
de óxido-redução usando plantas comestíveis***

São Paulo

Data do depósito na SPG:  
11/02/2008

**ROBERTO SUSUMU UTSUNOMIYA**

***Biorreciclagem de hexano e estudo de reações de  
óxido-redução usando plantas comestíveis***

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

Orientador: Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade

São Paulo  
2008

## DEDICATÓRIA

Especialmente à ***minha família***, pelo apoio incondicional e por ter compreendido a  
minha ausência em muitos momentos especiais.

## AGRADECIMENTOS

Ao professor orientador Dr. Leandro Helgueira de Andrade pela dedicada e primorosa orientação, pelos inestimáveis conselhos e ensinamentos e pela serenidade mantida durante todo o trabalho.

Aos professores Dr. João Valdir Comasseto e Dr. André Luis Meleiro Porto pelas preciosas discussões, sugestões e essenciais contribuições.

À Dra. Patrícia Busko Di Vitta, que nos auxiliou nas análises cromatográficas;

Ao professor Dr. Cassius Vinicius Stevani, que nos possibilitou a quantificação das proteínas e a determinação da atividade enzimática relacionadas ao fungo *A. terreus*; ao professor Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno, que nos auxiliou com importantes discussões durante o estudo das reações de óxido-redução mediadas pelas plantas; à professora Dra. Liliana Marzorati pelas ricas discussões e sugestões.

Aos amigos Dr. Álvaro Takeo Omori e Dr. Artur Franz Keppler, Adriana O. Pacheco e Edna Kagohara, que sempre mantiveram uma atitude solícita, auxiliando-nos efetivamente durante todo o estudo e proporcionaram discussões imprescindíveis, momentos de descontração e um ambiente de trabalho agradável e organizado.

Aos amigos, colegas e funcionários do grupo do professor Leandro e do professor Comasseto: *Adriana O. Pacheco, Alcindo A. dos Santos, Alexandre S. Guarazemini, Alcía M. Tatar, Álvaro T. Omori, Artur F. Keppler, Bruno K. Bassora, Carlos E. Costa, Cristiano Raminelli, Dennis G. Diego, Edna Kagohara, Fabiano T. Toledo, Giuliano Clososki, Leandro Piovan, Leonardo F. Assis, Luis C. Ricci, Priscila Castelani, Roberta Polak, Rodrigo L. O. R. Cunha, Thais Martins, Rosa M. Nascimento.*

Ao CNPq pela Bolsa de Mestrado concedida.

# SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12

## PARTE 1 - BIORRECICLAGEM DE HEXANO

CAPÍTULO 1 - BIORRECICLAGEM DE HEXANO – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	15
---	----

1.1 Introdução.....	15
1.1.1 A reciclagem de hexano.....	17
1.1.2 As lipases.....	17
1.1.3 Mecanismo das reações de hidrólise mediadas pelas lipases .....	20
1.1.4 Fatores que interferem na atividade enzimática.....	21
1.1.5 Objetivos do estudo.....	23

CAPÍTULO 2 - BIORRECICLAGEM DE HEXANO - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
---	----

2.1 Determinação de uma curva-padrão para as reações de biorreciclagem.....	25
2.2 Biorreciclagem usando microrganismos.....	26
2.2.1 Estudo do efeito da variação da quantidade de açúcar no meio de cultura de crescimento do <i>A. terreus</i> .....	27
2.2.2 Estudo do efeito da variação do pH inicial da biorreciclagem utilizando <i>A. terreus</i> ....	28
2.2.3 Determinação do rendimento da biorreciclagem utilizando <i>A. terreus</i> .....	29
2.2.4 Estudo da cinética da biorreciclagem utilizando <i>A. terreus</i> .....	29
2.2.5 Determinação da concentração de proteínas e atividade enzimática.....	31
2.3 Biorreciclagem usando enzimas comerciais.....	32
2.4 Biorreciclagem em reator tubular de leito fixo.....	35
2.4.1 Estudo do efeito da variação do pH na biorreciclagem em reator de leito fixo.....	37
2.4.2 Estudo do efeito da variação do tipo de solução tampão na biorreciclagem em reator de leito fixo.....	38
2.4.3 Estudo do efeito da variação da vazão da solução tampão na biorreciclagem em reator de leito fixo.....	38
2.4.4 Avaliação da estabilidade da CAL-B na biorreciclagem em reator de leito fixo.....	39

CAPÍTULO 3 - BIORRECICLAGEM DE HEXANO - CONCLUSÕES.....	41
---	----

## PARTE 2 - REAÇÕES DE ÓXIDO-REDUÇÃO USANDO PLANTAS COMESTÍVEIS

### CAPÍTULO 4 - REAÇÕES DE ÓXIDO-REDUÇÃO USANDO PLANTAS COMESTÍVEIS – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....44

4.1	Introdução.....	44
4.1.1	O Conceito de química verde.....	45
4.1.2	Princípios da química verde.....	46
4.1.3	Importância dos álcoois quirais.....	48
4.1.4	Álcool desidrogenases.....	49
4.1.5	Reação de resolução enzimática.....	50
4.1.6	Reação de desracemização.....	52
4.2	Objetivos do Estudo.....	53

### CAPÍTULO 5 - REAÇÕES DE ÓXIDO-REDUÇÃO USANDO PLANTAS COMESTÍVEIS – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....54

5.1	Reações de redução .....	54
5.1.1	Redução de 1-feniletanona (1a).....	54
5.1.2	Redução de 1-(4-bromofenil)etanona (1b).....	56
5.1.3	Redução de 1-(4-metilfenil)etanona (1c) .....	58
5.1.4	Redução de 1-(4-nitrofenil)etanona (1d).....	60
5.1.5	Redução de 1-(4-metilselanil-fenil)etanona (1e).....	62
5.2	Reações de oxidação.....	64
5.2.1	Oxidação do (RS)-1-feniletanol (2a) .....	64
5.2.2	Oxidação de (RS)-1-(4-bromofenil)etanol (2b) .....	67
5.2.3	Oxidação de (RS)-1-(4-metilfenil)etanol (2c) .....	689
5.2.4	Oxidação de (RS)-1-(4-nitrofenil)etanol (2d).....	71
5.2.5	Oxidação de (RS)-1-(4-metilselanil-fenil)etanol (2e).....	73
5.3	Reações em escala preparativa.....	75

### CAPÍTULO 6 – REAÇÕES DE ÓXIDO-REDUÇÃO USANDO PLANTAS COMESTÍVEIS – CONCLUSÕES.....78

## CAPÍTULO 7 - PARTE EXPERIMENTAL

7.1	Biorreciclagem de hexano.....	79
7.1.1	Materiais e Métodos.....	79
7.1.2	Preparação dos meios de cultura.....	81
7.1.3	Procedimento das reações de hidrólise com microrganismos.....	81
7.1.4	Procedimento das reações de hidrólise com enzimas isoladas.....	82
7.1.5	Métodos para análise no cromatógrafo a gás.....	82
7.1.6	Quantificação das proteínas totais dos microrganismos.....	83
7.1.6.1	Crescimento dos fungos.....	83
7.1.6.2	Preparação do homogeneizado de células.....	83
7.1.6.3	Curva-padrão usando albumina.....	84
7.1.7	Determinação da atividade enzimática de lipase.....	85
7.2	Reações de óxido-redução usando plantas comestíveis.....	85
7.2.1	Métodos e Métodos.....	86
7.2.2	Plantas usadas como fontes de enzimas.....	87
7.2.3	Preparação dos substratos.....	87
7.2.3.1	Preparação da 1-(4-metilselanil-fenil)etanona ( <b>1e</b> ).....	88
7.2.3.2	Preparação dos alcóois racêmicos.....	90
7.2.4	Procedimento para as reações com as plantas.....	90
7.2.5	Reações em escala preparativa.....	91
7.2.6	Métodos para as análises no cromatógrafo a gás.....	92
7.2.7	Atribuição da configuração absoluta dos álcoois.....	97
	SÚMULA CURRICULAR.....	98
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Hidrólise da triacil-glicerol mediada por lipase.....	18
<b>Figura 2.</b> Reações catalisadas por lipases.....	19
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de ação da tríade catalítica de uma lipase.....	21
<b>Figura 4.</b> Biotransformação do acetato de etila.....	23
<b>Figura 5.</b> Biorreciclagem de hexano.....	24
<b>Figura 6.</b> Sistema contínuo com reator PBR.....	35
<b>Figura 7.</b> Possíveis configurações de múltiplos reatores.....	36
<b>Figura 8.</b> Produtos obtidos a partir do álcool ( <i>R</i> )- ou ( <i>S</i> )-3-hidroxi-butanoato de etila ( <b>I</b> ).....	48
<b>Figura 9.</b> Forma reduzida de Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NADH) e Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADPH).....	49
<b>Figura 10.</b> Mecanismo de ação do NADH em um composto carbonílico.....	50
<b>Figura 11.</b> Reação de resolução enzimática.....	51
<b>Figura 12.</b> Diagrama de energia de uma reação enantiosseletiva catalisada por enzima.....	51
<b>Figura 13.</b> Reação de desracemização.....	52
<b>Figura 14.</b> Redução da 1-feniletanona ( <b>1a</b> ).....	54
<b>Figura 15.</b> Redução da 1-(4-bromofenil)etanona ( <b>1b</b> ).....	56
<b>Figura 16.</b> Redução da 1-(4-metilfenil)etanona ( <b>1c</b> ).....	58
<b>Figura 17.</b> Redução da 1-(4-nitrofenil)etanona ( <b>1d</b> ).....	60
<b>Figura 18.</b> Formação da 1-(4-aminofenil)etanona.....	60
<b>Figura 19.</b> Redução da 1-(4-metilselanil-fenil)etanona ( <b>1e</b> ).....	62
<b>Figura 20.</b> Oxidação da ( <i>RS</i> )-1-feniletanol ( <b>2a</b> ).....	64
<b>Figura 21.</b> Oxidação do ( <i>RS</i> )-1-(4-bromofenil)etanol ( <b>2b</b> ).....	67
<b>Figura 22.</b> Oxidação da ( <i>RS</i> )-1-(4-metilfenil)etanol ( <b>2c</b> ).....	69
<b>Figura 23.</b> Oxidação do ( <i>RS</i> )-1-(4-nitrofenil)etanol ( <b>2d</b> ).....	71
<b>Figura 24.</b> Redução do nitrobenzeno pela <i>B. vulgaris</i> .....	71
<b>Figura 25.</b> Oxidação do ( <i>RS</i> )-1-(4-(metilselanil)fenil)etanol ( <b>2e</b> ).....	73
<b>Figura 26.</b> Redução da 1-feniletanona ( <b>1a</b> ) em escala preparativa.....	75
<b>Figura 27.</b> Cromatograma da reação da 1-feniletanona ( <b>1a</b> ) com <i>A. xanthorrhiza</i> .....	76
<b>Figura 28.</b> Oxidação do ( <i>RS</i> )-1-(4-metilfenil)etanol ( <b>2c</b> ) em escala preparativa.....	76
<b>Figura 29.</b> Cromatograma da reação de oxidação do ( <i>RS</i> )-1-(4-metilfenil)etanol ( <b>2c</b> ).....	77
<b>Figura 30.</b> Síntese da 1-(4-metilselanil-fenil)etanona ( <b>1e</b> ).....	88
<b>Figura 31.</b> Cromatogramas do ( <i>RS</i> )-1-feniletanol ( <b>2a</b> ) e 1-feniletanona ( <b>1a</b> ).....	92
<b>Figura 32.</b> Cromatogramas do ( <i>RS</i> )-1-(4-bromofenil)etanol ( <b>2b</b> ) e 1-(4-bromofenil)etanona ( <b>1b</b> ).....	93
<b>Figura 33.</b> Cromatogramas do ( <i>RS</i> )-1-(4-metilfenil)etanol ( <b>2c</b> ) e 1-(4-metilfenil)etanona. ( <b>1c</b> ).....	94
<b>Figura 34.</b> Cromatogramas do ( <i>RS</i> )-1-(4-nitrofenil)etanol ( <b>2d</b> ), da 1-(4-nitrofenil)etanona ( <b>1d</b> ) e da 1-(4-aminofenil)etanona.....	95
<b>Figura 35.</b> Cromatogramas do ( <i>RS</i> )-1-(4-(metilselanil)fenil)etanol ( <b>2e</b> ) e da 1-(4-metilselanil)fenil)etanona ( <b>1e</b> ).....	96



## Lista de gráficos

<b>Gráfico 1.</b> Curva-padrão para quantificação do AcOEt.....	25
<b>Gráfico 2.</b> Variação da concentração de AcOEt ao longo do tempo.....	30
<b>Gráfico 3.</b> Estabilidade da Novozyme 435 em processo contínuo.....	40

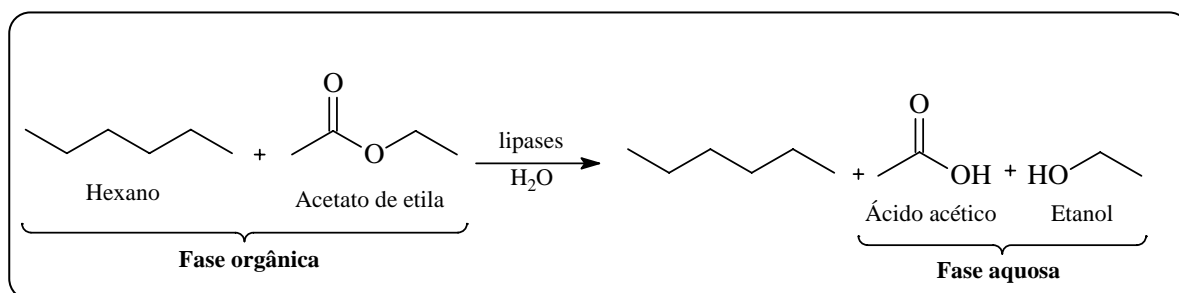
## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Triagem dos microrganismos para biorreciclagem de hexano.....	27
<b>Tabela 2.</b> Variação da concentração de açúcar no meio de crescimento do <i>A. terreus</i> .....	28
<b>Tabela 3.</b> Variação de pH da biorreciclagem utilizando <i>A. terreus</i> .....	29
<b>Tabela 4.</b> Concentração de proteínas e atividade enzimática do <i>A. terreus</i> .....	31
<b>Tabela 5.</b> Hidrólise de acetato de etila presente no resíduo (Hexano/acetato de etila) usando água destilada (pH = 5,7).....	33
<b>Tabela 6.</b> Hidrólise de acetato de etila presente no resíduo (Hexano/acetato de etila) usando solução tampão com pH = 7,0.....	33
<b>Tabela 7.</b> Hidrólise de acetato de etila presente no resíduo (Hexano/acetato de etila) usando solução tampão com pH = 10,0.....	34
<b>Tabela 8.</b> Efeito da variação do pH na taxa de hidrólise de acetato de etila mediada por CAL-B em reator de leito fixo.....	37
<b>Tabela 9.</b> Efeito da variação do tipo de solução tampão na reação de hidrólise de acetato de etila mediada por CAL-B em reator de leito fixo.....	38
<b>Tabela 10.</b> Efeito da variação da vazão do tampão durante a biorreciclagem de hexano em reator de leito fixo.....	39
<b>Tabela 11.</b> Redução da 1-feniletanona ( <b>1a</b> ).....	55
<b>Tabela 12.</b> Redução da 1-(4-bromofenil)etanona ( <b>1b</b> ).....	57
<b>Tabela 13.</b> Redução da 1-(4-metilfenil)etanona ( <b>1c</b> ).....	59
<b>Tabela 14.</b> Redução da 1-(4-nitrofenil)etanona ( <b>1d</b> ).....	61
<b>Tabela 15.</b> Redução da 1-(4-metilselanilfenil)etanona ( <b>1e</b> ).....	63
<b>Tabela 16.</b> Oxidação do ( <i>RS</i> )-1-feniletanol ( <b>2a</b> ).....	66
<b>Tabela 17.</b> Oxidação do ( <i>RS</i> )-1-(4-bromofenil)etanol ( <b>2b</b> ).....	68
<b>Tabela 18.</b> Oxidação do ( <i>RS</i> )-1-(4-metilfenil)etanol ( <b>2c</b> ).....	70
<b>Tabela 19.</b> Oxidação do ( <i>RS</i> )-1-(4-nitrofenil)etanol ( <b>2d</b> ).....	72
<b>Tabela 20.</b> Oxidação do ( <i>RS</i> )-1-(4-metilselanil-fenil)etanol ( <b>2e</b> ).....	74
<b>Tabela 21.</b> Volumes usados para traçar a curva-padrão para quantificação de proteínas.....	84
<b>Tabela 22.</b> Nome das plantas usadas nas reações de óxido-redução.....	87

## RESUMO

Utsunomiya, R. S. Biorreciclagem de hexano e estudo de reações de óxido-redução usando plantas comestíveis. 2008. 102p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

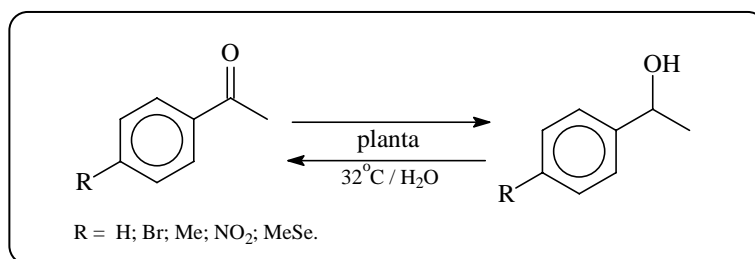
O presente trabalho teve como objetivos principais utilizar reações enzimáticas para a degradação de resíduos de laboratório e na síntese de álcoois quirais. Na primeira parte foi realizada uma triagem de microrganismos e enzimas hidrolíticas, objetivando a biorreciclagem de hexano presente no resíduo contendo uma mistura hexano-acetato de etila. Esta mistura é largamente utilizada para purificação de compostos químicos por cromatografia líquida. O método de biorreciclagem, em sistema bifásico, consistiu na hidrólise enzimática do acetato de etila, viabilizando, dessa forma, a recuperação do hexano puro de forma simples e rápida, pois os produtos dessa reação são altamente solúveis na fase aquosa (Esquema 1).



**Esquema 1.** Hidrólise do acetato de etila para a biorreciclagem de hexano.

Para avaliar a possibilidade de se tratar grandes quantidades de efluentes, foram realizados também alguns ensaios em um sistema contínuo com reator tubular de leito fixo usando a lipase imobilizada de *Candida antartica* (CAL-B, Novozyme 435), a qual mostrou ser bastante promissora para essa finalidade. Nesse sistema alcançaram-se taxas de hidrólise em torno de 70%, sem perda da estabilidade enzimática durante 6 horas de trabalho.

Na segunda parte do trabalho, avaliamos o potencial catalítico de diversas plantas comestíveis em reações orgânicas de óxido-redução visando à síntese enantiosseletiva de álcoois quirais. As reações escolhidas, para tal propósito, foram a redução de cetonas pró-quirais e a resolução cinética de álcoois via oxidação enantiosseletiva (Esquema 2).



**Esquema 2.** Reações de óxido-redução catalisadas por plantas.

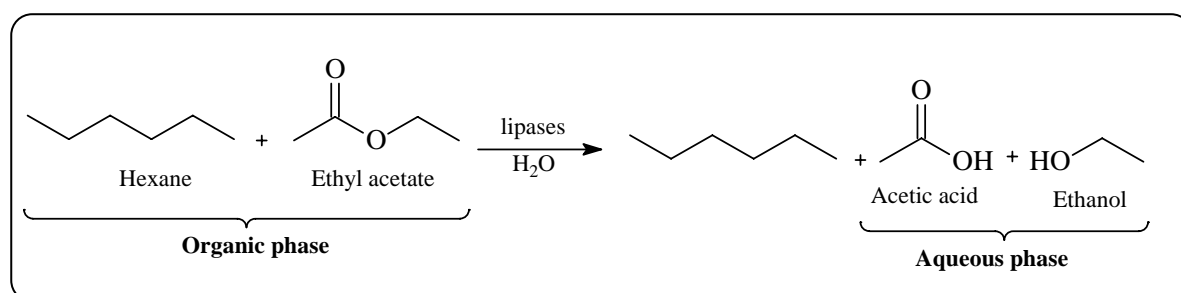
Em muitos casos, os enantiômeros foram obtidos, separadamente, com pureza enantiomérica de até 99% dependendo da planta utilizada como biocatalizador. Por exemplo, a *Arracacia xanthorrhiza* B. (mandioquinha) promoveu uma eficiente redução enantiosseletiva da 1-(4-bromofenil)etanona, fornecendo o (S)-1-(4-bromofenil)etanol com 98% de e.e. (excesso enantiomérico), enquanto que a *Manihot esculenta* (mandioca) forneceu o (R)-1-(4-bromofenil)etanol com 90% de e.e. Algumas plantas mostraram uma boa capacidade oxidativa. Por exemplo, o *Coriandrum sativum* L. (coentro) levou a oxidação quantitativa do 1-(4-metilfenil)etanol a 1-(4-metilfenil)etanona.

**Palavras-chave:** Biorreciclagem, hexano, lipases, oxidação, redução, plantas comestíveis.

# ABSTRACT

Utsunomiya, R. S. Biorecycling of hexane and study of oxido-reduction reactions using edible plants. 2008. 102p. Masters Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

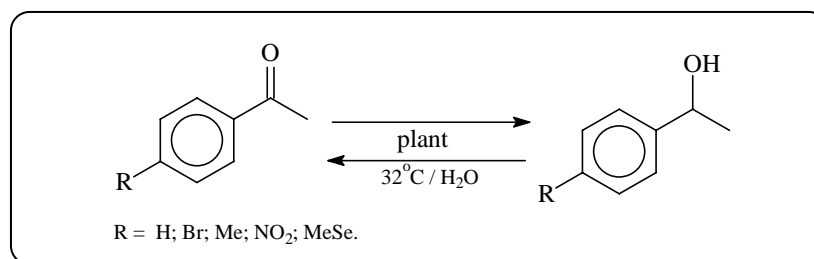
The present work had as main goals the use of enzymatic reactions to degrade laboratory residues and to synthesize chiral alcohols. In the first part, it was carried out a screening of microorganisms and hydrolytic enzymes aiming the biorecycling of hexane from laboratory residues (a mixture of hexane-ethyl acetate). This mixture is widely employed to purify chemicals by liquid chromatography. The biorecycling consists of enzymatic hydrolysis of ethyl acetate in a biphasic system. Due to the high solubility of the undesired products from this reaction in the aqueous phase, the hexane was easily recovered (Scheme 1).



**Scheme 1.** Hydrolysis of ethyl acetate to biorecycling of hexane.

To evaluate the possibility of treatment of effluents in a high amount, we carried out the biorecycling in a continuous system with tubular reactor using immobilized lipase (Novozyme 435). By the use of this system, the hydrolysis ratio was around 70% with no lost of enzyme stability along 6 hours work.

In the second part of the work, we evaluated the catalytic potential of several edible plants in oxido-reduction reactions aiming the enantioselective synthesis of chiral alcohols. The chosen reactions were the reduction of prochiral ketones and the kinetic resolution by enantioselective oxidation (Scheme 1).



**Scheme 2.** Oxido-reduction reaction catalyzed by plants.

In several cases, depending of the plant employed as biocatalyst, the (*R*) or (*S*)-enantiomer were obtained in high enantiomeric purity (up to 99%). For example, the *Arracacia xanthorrhiza* B. (*mandioquinha*) performed an efficient enantioselective reduction of 1-(4-bromophenyl)ethanone to the (*S*)-1-(4-bromophenyl)ethanol with 98% e.e. (enantiomeric excess), while the a *Manihot esculenta* (*mandioca*) gave the (*R*)-1-(4-bromophenyl)ethanol with 90% e.e. Some plants showed a good oxidative performance. For example, *Coriandrum sativum* L. (*coentro*) gave the quantitative oxidation of 1-(4-methylphenyl)ethanol to the 1-(4-metilphenyl)ethanona.

**Keywords:** Biorecycling, hexane, lipases, oxidation, reduction, edible plants.

# **PARTE 1: BIORRECICLAGEM DE HEXANO**

# CAPÍTULO 1 – BIORRECICLAGEM DE HEXANO – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

## 1.1 Introdução

Nos últimos cem anos, o padrão de desenvolvimento que foi escolhido começou a provocar devastadoras mudanças ambientais no fino e delicado *habitat* da terra, ameaçando o futuro do planeta e do homem. O modelo de acumulação que rege o capitalismo global exige contínuo aumento de consumo e sucateamento de produtos, acelerando brutalmente o uso de recursos naturais escassos. A queima de petróleo, carvão e gás elevaram a concentração de CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono) na atmosfera de 280 ppm (partes por milhão) em 1860 para 365 ppm em 1990; é provável que atinja 700 ppm em 2100. Assim, os solos ficarão mais secos e as fortes estiagens serão em maiores número e intensidade. A temperatura média global pode subir até 6 °C nos próximos 100 anos. O gelo polar derreterá e poderá elevar o nível dos oceanos em até 94 cm, o que exigiria a remoção de mais de 90 milhões de pessoas. Na Europa e nos Estados Unidos, por volta de 50% dos lagos e rios estão gravemente poluídos. De todos os ecossistemas mundiais, pelo menos 60% estão sendo explorados de maneira não-sustentáveis ocasionando um processo de degradação, que pode ser irreversível em 50 anos. A expansão agrícola de 1945 até 2004 foi superior à soma dos séculos 18 e 19; a destruição ambiental resultante agrava o percentual de plantas, mamíferos, aves e anfíbios em extinção; algumas dessas espécies nem sequer foram catalogadas<sup>1</sup>. Em vista disso, a maioria da comunidade mundial tem dado atenção à proteção ambiental.

A implementação de soluções necessárias à minimização do uso dos recursos não renováveis e da geração de resíduos no processo produtivo é de

grande importância e, usualmente, são empregadas as seguintes ações ordenadas de maior a menor hierarquia, denominado “**3R**”: **Reduzir**, **Reutilizar** e **Reciclar**.

Reduzir é a ação mais importante, entretanto ela está fortemente ligada à conscientização da sociedade como um todo, desde a necessidade de produção de um determinado produto até seu consumo adequado. Dentro do contexto de processos industriais, a redução deve ser empregada fortemente, pois com isso é possível aplicar tecnologia limpa, por exemplo, para evitar o uso de energia, excesso de reagentes, solventes e reagentes tóxicos.

Uma preocupação natural da sociedade é que se o consumo de bens e serviços regredir, apenas como hipótese, precisamos refletir o que isto significaria em termos de redução adicional de postos de trabalho, além dos que já estão sendo cortados pela racionalização proporcionada pelo desenvolvimento tecnológico e que a competição e a busca permanente de ganhos de produtividade promovem. Quanto aos dois outros “R”, na verdade podem ser tratados como um só: **reciclagem**.

A reciclagem é um conceito promissor e um fato importante que surgiu no setor de meio ambiente nos últimos anos. Visto de forma pragmática, é a forma de conciliar as tendências mundiais de globalização, que embute a tendência de universalização da sociedade de consumo e, por via de consequência, a ampliação da geração de resíduos, com a atividade econômica do processamento de resíduos<sup>2</sup>.

Em termos de sustentabilidade, processos de tratamento de resíduos que empregam microrganismos e enzimas isoladas têm recebido grande atenção<sup>3,4,5</sup>.



### 1.1.1 A reciclagem de hexano

As misturas compostas de hexano e acetato de etila são usadas nas indústrias farmacêuticas, químicas e em instituições de ensino e pesquisa para purificação de compostos através de técnicas cromatográficas. As misturas produzidas usando essas técnicas são compostas majoritariamente de hexano, que não é facilmente separado do acetato de etila (AcOEt) através de destilação devido à pequena diferença nos seus pontos de ebulição (acetato de etila:  $p_e = 77\text{ °C}$ ; hexano:  $p_e = 69\text{ °C}$ ) e à formação de mistura azeotrópica (*n*-hexano:  $x_i = 0,657$ ;  $T = 64,85\text{ °C}$ ;  $P = 101,3\text{ kPa}$ )<sup>6</sup>.

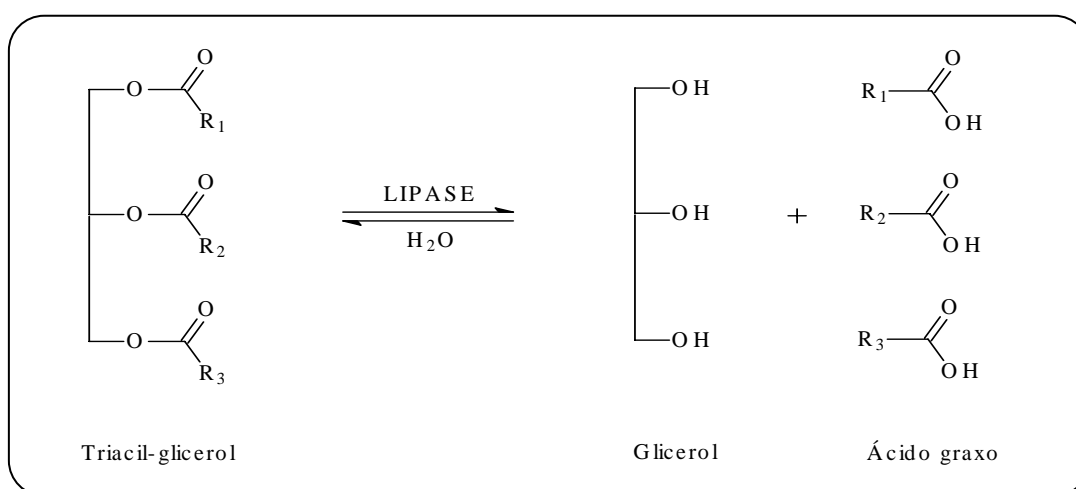
Algumas alternativas foram propostas a fim de evitar o descarte dessa mistura. Wilkinson<sup>7</sup> propôs a sua reutilização apenas efetuando uma destilação para eliminar as impurezas e, em seguida, quantificando via cromatografia a sua composição. Mais recentemente, a possibilidade de separação do *n*-hexano do acetato de etila foi estudada usando a técnica de destilação azeotrópica, um processo de difícil controle e, ainda, usa um terceiro composto como auxiliar de destilação<sup>8</sup>.

### 1.1.2 As lipases

Dentre as enzimas hidrolíticas de maior interesse estão as lipases, que podem ser encontradas em tecidos de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de microrganismos, tais como os fungos *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum* sp., por leveduras de *Tulopsis* sp. e *Candida* sp. e bactérias como *Pseudomonas* sp., *Achromobacter* sp. e *Staphylococcus* sp.<sup>9</sup>

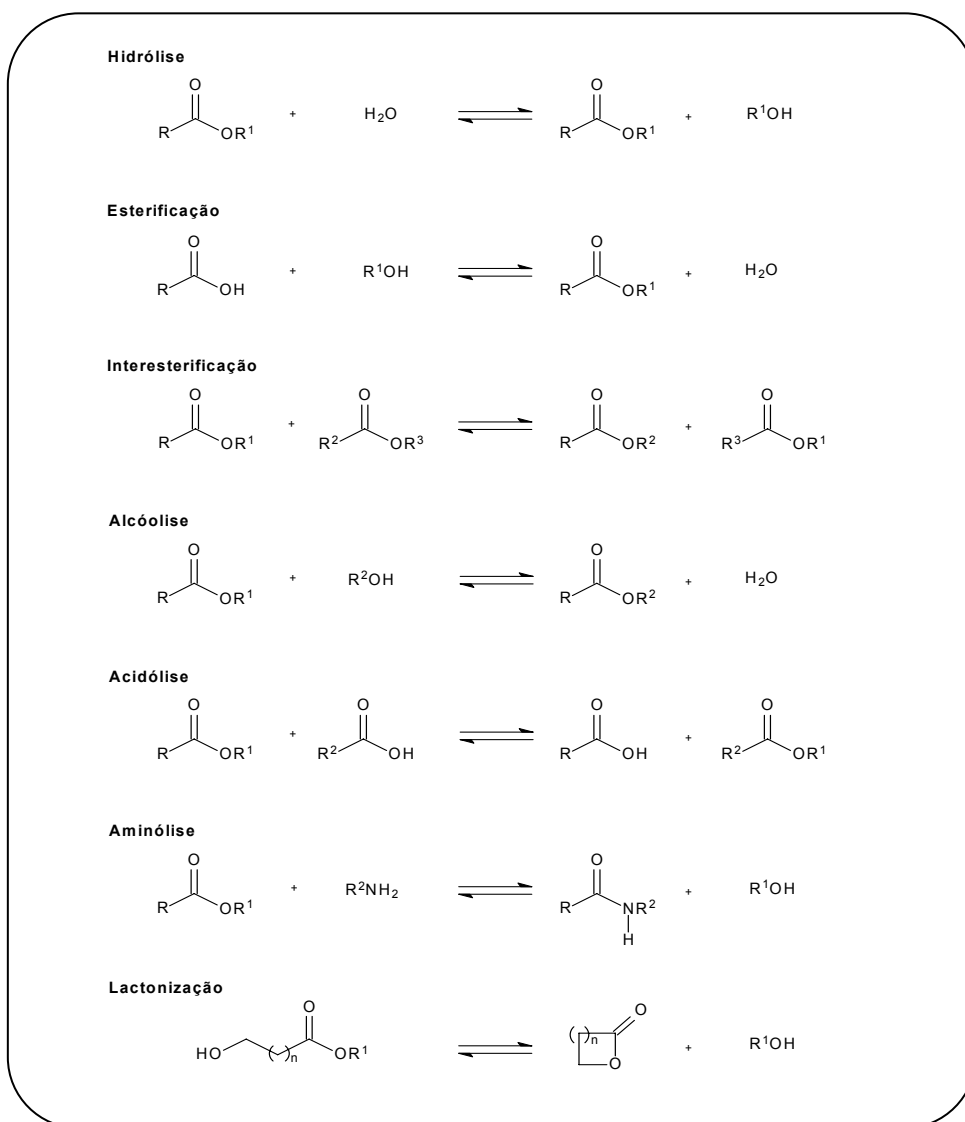
Do ponto de vista econômico e industrial, os fungos são especialmente valorizados porque as enzimas hidrolíticas por eles produzidas normalmente são extracelulares<sup>10</sup>, o que facilita sua recuperação do meio de fermentação e apresenta menor custo de isolamento.

Originalmente, as lipases são enzimas responsáveis por catalisar reações de hidrólise de acilgliceróis em ácidos graxos, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e glicerol (Figura 1).



**Figura 1.** Hidrólise da triacil-glicerol mediada por lipase.

No entanto, além da hidrólise, as lipases possuem a habilidade de catalisar reações de esterificação, transesterificações, interesterificação, alcoólise, acidólise, aminólise e lactonização (Figura 2). O deslocamento do equilíbrio na reação, no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese), pode ser controlado pela quantidade de água presente na mistura reacional papel<sup>11</sup>.



**Figura 2.** Reações catalisadas por lípases.

As lipases não requerem cofatores, atuam em uma faixa de pH relativamente grande, são muito estáveis neste meio, têm grande disponibilidade a baixo custo, e apresentam especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade. Devido a esses fatores, elas têm sido extensivamente investigadas e utilizadas em uma variedade de segmentos biotecnológicos, como em indústrias de alimentos (desenvolvimento de aromas e maturação de queijos), de detergentes, oleoquímica (hidrólise de óleos e gorduras, síntese de biosurfactantes) e para tratamento de resíduos oleosos provindos da indústria do couro e de papel<sup>12</sup>.

### 1.1.3 Mecanismo das reações de hidrólise mediadas pelas lipases

O sítio catalítico de uma lipase é formado pela tríade catalítica, composta por resíduos de aminoácidos de serina, histidina e aspartato (Ser-His-Asp) ou glutamato, que se repete em todas as estruturas e é, freqüentemente, protegido na molécula por uma “tampa” hidrofóbica ou “lid” que ao interagir com a interface lipídeo/água sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. A presença da “tampa” na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passaram a ser fatores determinantes para a caracterização de lipases. Estudos de raios-X<sup>13</sup> com a lipase da *Candida antarctica* revelou a existência de uma “tampa” recobrimdo a tríade catalítica Ser-His-Asp. Mais recentemente, entretanto, observou-se que a presença da “tampa” não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial, sendo que as lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* (fração B), que apresentam a “tampa” em suas estruturas, não sofrem ativação interfacial. Por outro lado, as cutinases, enzimas consideradas lipases “verdadeiras”, não apresentam a “tampa” e não precisam da interface para exercer a atividade hidrolítica<sup>14</sup>.

A Figura 3 ilustra o mecanismo de ação da tríade catalítica de uma lipase em um éster.

Pelo mecanismo, o grupo carboxilato do ácido aspártico atua de modo a estabilizar a histidina e esta se liga ao álcool da serina por ligação hidrogênio, tornando-o mais nucleofílico. Isso possibilita o ataque nucleofílico do oxigênio da serina ao carbono acílico do éster formando um intermediário tetraédrico (**A**). Com a convergência dos elétrons do oxiânion formado para o carbono carbonílico e a transferência do próton situado na histidina ocorre a liberação do primeiro produto, o álcool, e forma-se a enzima acilada (complexo acil-enzima). Em seguida a água age

como nucleófilo e, de modo análogo à formação do complexo acil-enzima, completa-se a hidrólise, passando pelo intermediário tetraédrico (**B**) e liberando o ácido carboxílico e a enzima.

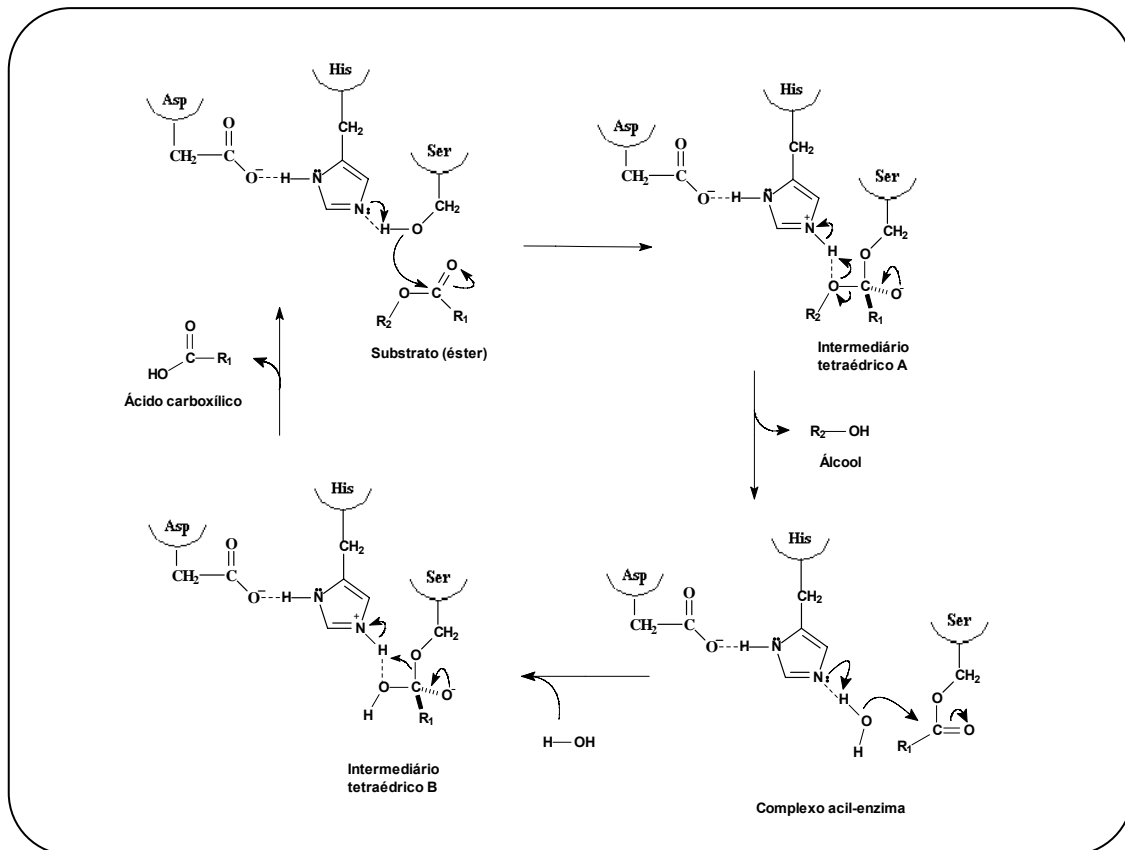


Figura 3. Mecanismo de ação da tríade catalítica de uma lipase.

### 1.1.4 Fatores que interferem na atividade enzimática<sup>15</sup>

A estrutura e a forma do centro ativo são decorrências da estrutura tridimensional da enzima e pode ser afetada por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na proteína. Isto torna a atividade enzimática dependente das características do meio onde ela se encontra, notadamente do pH e da temperatura.

A maioria das enzimas apresenta um valor de pH para o qual a sua atividade é máxima – a velocidade da reação diminui a medida que o pH se afasta desse valor

ótimo, que é característico para cada enzima mas, com freqüência, está próximo do pH neutro. A influência do pH sobre a catálise enzimática pode ser melhor compreendida lembrando que as enzimas apresentam grupos tituláveis nos resíduos de arginina, aspartato, cisteína, glutamato, histidina, lisina e tirosina. Alguns destes grupos podem fazer parte do centro ativo ou serem importantes na manutenção da estrutura espacial da molécula. A cada valor de pH, alguns desses grupos apresentam-se protonados ou desprotonados. Existe uma concentração hidrogeniônica que propicia um determinado arranjo de grupos protonados e desprotonados que leva a molécula de enzima à conformação ideal para exercer seu papel catalítico. Este pH ótimo depende, portanto, do número e tipo de grupos ionizáveis que uma enzima apresenta e da seqüência em que estão organizados, ou seja, depende de sua estrutura primária. Por outro lado, quando o substrato contém grupos ionizáveis, as variações de pH também poderão afetar suas cargas. A eficiência da catálise dependerá, então, de encontrarem-se, enzima e substrato, com conformação e carga adequadas para permitir a interação necessária para que a reação ocorra.

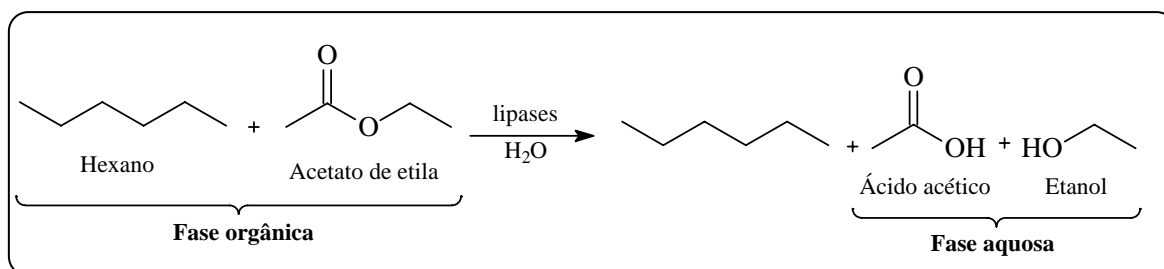
Como ocorre com a maioria das reações químicas, a velocidade da reação enzimática, que a 0 °C apresenta valores próximos de zero, é favorecida pela elevação da temperatura. O gradativo aumento da velocidade só se verifica enquanto a enzima conservar sua estrutura nativa. Acima de 50-55 °C, a maioria das proteínas são desnaturadas. A desnaturação provoca drásticas alterações conformacionais na molécula, acarretando a perda do poder de catálise. No intervalo de temperatura mencionado vive a grande maioria dos seres vivos. Há, entretanto, exceções, entre as quais a mais notável é representada por bactérias que vivem em águas termais, com temperaturas ao redor de 100 °C.

A adição de solventes orgânicos polares e de compostos com grande capacidade de formar ligações hidrogênio pode determinar a desnaturação da proteína porque estes últimos agentes estabelecem ligações hidrogênio com radicais da proteína, substituindo ligações que mantinham a estrutura nativa.

## 1.2 Objetivos do Estudo

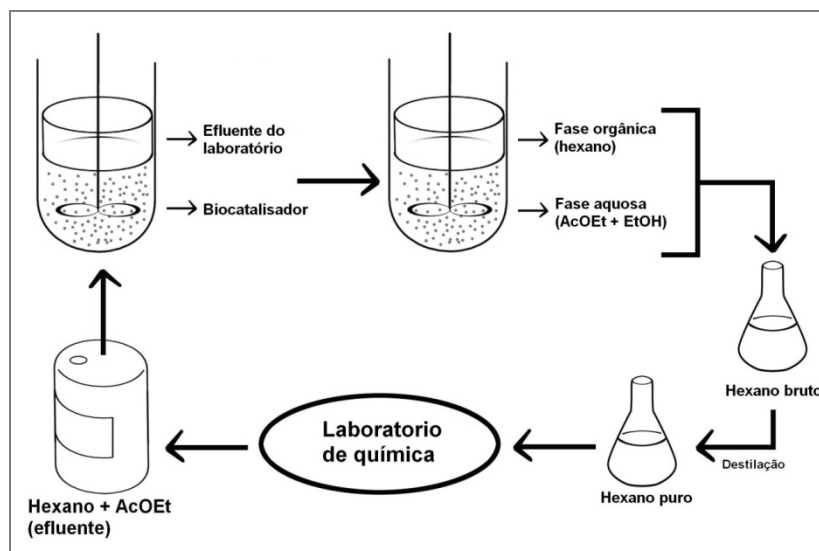
Devido à produção constante do resíduo hexano/acetato de etila, decidimos nos preocupar com a biorreciclagem do hexano, um recurso não-renovável e com isso evitar sua incineração, contribuindo, desse modo, para uma diminuição na emissão de poluentes atmosféricos. O acetato de etila é produzido através de matérias-primas renováveis e, especialmente no Brasil, o baixo preço do etanol torna esse éster bastante competitivo no mercado nacional e internacional<sup>16</sup>. Sendo assim, a biodegradação do acetato de etila não representa grandes custos financeiros, tornando essa abordagem perfeitamente viável.

Nessa parte do trabalho tivemos como objetivo principal desenvolver método de degradação enzimática do acetato de etila presente em misturas de hexano/acetato de etila proveniente de resíduos laboratoriais. Para isso, baseado em reações enzimáticas, o método consiste na hidrólise do acetato de etila através da ação de enzimas hidrolíticas (lipases) isoladas ou presentes nos sistemas enzimáticos de microrganismos<sup>9</sup> (Figura 4).



**Figura 4.** Biotransformação do acetato de etila.

Desse modo, esse éster, em uma reação inversa a de sua síntese, é transformado em etanol e ácido acético, enquanto que o hexano é mantido inalterado. Após essa biotransformação, uma destilação simples possibilita a recuperação do hexano puro (Figura 5).



**Figura 5.** Biorreciclagem de hexano.



## CAPÍTULO 2 - BIORRECICLAGEM DE HEXANO - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo estão apresentados os resultados e discussões sobre as reações de hidrólise do acetato de etila, nas quais foram utilizados quatro fungos e sete enzimas hidrolíticas comerciais. Por fim, encontra-se um estudo sobre a possibilidade do uso da enzima Novozyme 435 em um reator tubular operando em processo contínuo.

### 2.1 Determinação de uma curva-padrão para as reações de biorreciclagem

Para a quantificação dos componentes das amostras de resíduo contendo hexano e acetato de etila (AcOEt) foi traçada uma curva padrão (Gráfico 1). Nesse gráfico, a abscissa (x) corresponde à área do pico obtido do cromatograma e a ordenada (y) corresponde a concentração volumétrica real da amostra. Desse modo, obteve-se a correlação  $y = 1,51x$ .

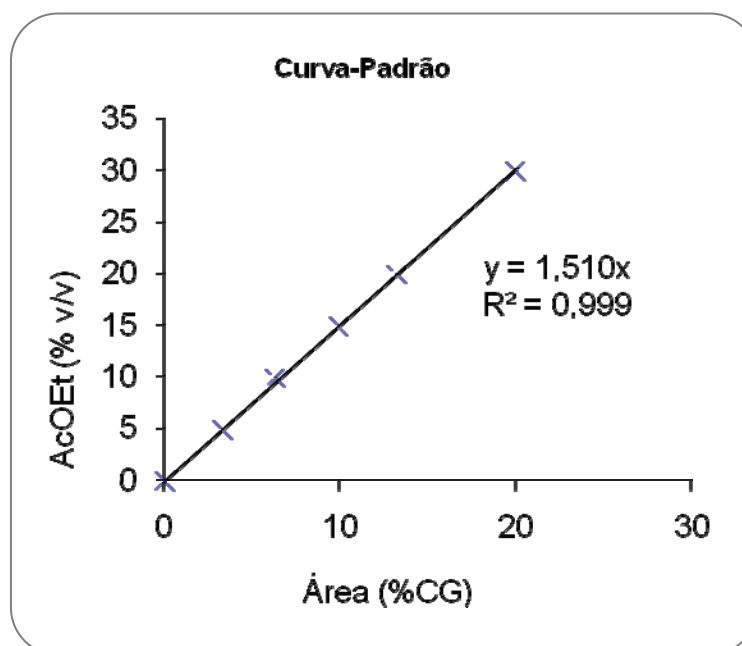


Gráfico 1. Curva-padrão para quantificação do AcOEt.

## 2.2 Biorreciclagem usando microrganismos

Tendo em vista a redução de custo do processo de reciclagem do hexano e, com isso evitar o uso de enzimas purificadas, decidiu-se estudar o emprego de fungos para efetuar a hidrólise do acetato de etila presente no resíduo.

Uma busca na literatura revelou que os fungos *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Emericella nidulans* e *Rhizopus oryzae* são conhecidos como produtores de lipases<sup>9</sup>. Desta forma, iniciaram-se os estudos com a avaliação da atividade hidrolítica dos fungos disponíveis em nosso laboratório: *Aspergillus terreus* SSP 1498, *Aspergillus niger* SSP 1078, *Emericella nidulans* CCT 3119 e *Rhizopus oryzae* CCT 4964.

Após o preparo do pré-inóculo, de acordo com o procedimento descrito na seção 7.1.6.1, o crescimento dos fungos foi realizado diretamente em um reator do tipo batelada com agitador tipo pá durante 48 h, a 32 °C, usando 3 L de meio de cultura preparado a partir do extrato de batatas comestível (*Solanum tuberosum*), conforme procedimento descrito na seção 7.1.2. Após essa etapa, foi adicionado no reator 600 mL da mistura hexano-acetato de etila e acompanhou-se a reação após 24 e 48 horas. Os resultados são apresentados na Tabela 1, na qual estão especificadas as composições do acetato de etila no início e após 24 e 48 horas de reação.

**Tabela 1.** Triagem de microrganismos para biorreciclagem de hexano.

Microrganismo	Concentração de AcOEt (%v/v)		
	0 h	24 h	48 h
<i>Aspergillus terreus</i>	27,3	11,5	11,2
<i>Aspergillus niger</i>	29,2	14,5	14,4
<i>Emericella nidulans</i>	29,0	14,7	14,8
<i>Rhizopus oryzae</i>	28,3	14,7	14,5

Como podemos observar na tabela 1, entre os fungos avaliados, o *A. terreus* SSP 1498 exibiu um desempenho ligeiramente superior. Com o qual, após 24 h, a concentração do acetato de etila passou de 27,3 % para 11,5 % (v/v), enquanto que com os outros fungos a concentração chegou a 14,5 % (v/v).

Com base nesses resultados foram realizados experimentos adicionais somente com o fungo *A. terreus* SSP 1498, variando a composição do meio de crescimento e o pH do meio reacional.

### **2.2.1 Estudo do efeito da variação da quantidade de açúcar no meio de cultura de crescimento do *A. terreus***

A glicose é o principal substrato oxidável para a maioria dos organismos. Sua utilização como fonte energética pode ser considerada universal e, dos microrganismos ao homem, quase todas as células são potencialmente capazes de atender suas demandas energéticas apenas a partir desse açúcar. Variações na fonte de sua obtenção e na proporção entre carbono e nitrogênio no meio de cultura podem levar a mudança no crescimento celular e na produção de enzimas<sup>17</sup>.

Sendo assim, para verificar a eficiência da biotransformação do acetato de etila, o crescimento do *A. terreus* SSP 1498 no reator foi realizado em meios com

diferentes concentrações de açúcar (Tabela 2). Nesse caso foi utilizado o açúcar refinado da marca UNIÃO<sup>®</sup> adquirido no comércio local.

**Tabela 2.** Variação da concentração de açúcar no meio de crescimento do *A. terreus*.

Açúcar (g/L)	Concentração de AcOEt (%v/v)		
	0 h	24 h	48 h
20	27,3	11,4	11,1
60	28,9	16,3	16,0
120	29,3	15,3	15,3

Como pode ser observado na tabela 2, o aumento da concentração de açúcar no meio de crescimento não houve melhora significativa nas taxas de hidrólise. Por exemplo, na concentração de 20 g/L obteve-se a maior taxa de hidrólise, onde a concentração de acetato de etila diminuiu de 27,3 % (v/v) para 11,4 % (v/v), após 24 h de reação. Entretanto, com o uso de 60 g/L de açúcar, a concentração de acetato de etila diminuiu de 28,9 % (v/v) para 16,3 % (v/v), após 24 h de reação. Com base nesses resultados podemos concluir que o aumento da concentração de açúcar no meio de crescimento do fungo não melhorou significativamente a taxa de hidrólise do acetato de etila.

### **2.2.2 Estudo do efeito da variação do pH inicial da biorreciclagem utilizando *A. terreus***

Usando o fungo *A. terreus*, a biorreciclagem foi avaliada em diferentes valores de pH (Tabela 3). Foram selecionados os valores de pH 5,5, 7 e 10, pois estão dentro da faixa considerada ótima para a estabilidade das lipases e para reação de hidrólise.<sup>9</sup> Esses valores de pH foram ajustados após o tempo de crescimento do fungo.

**Tabela 3.** Variação de pH da biorreciclagem utilizando *A. terreus*.

pH	Concentração de AcOEt (%v/v)		
	0 h	24 h	48 h
5,5	27,3	11,4	11,1
7	28,7	14,5	14,0
10	29,2	14,4	14,4

O estudo mostrou que no valor de pH natural do meio de crescimento do *A. terreus* (pH 5,5) a taxa de hidrólise de acetato de etila foi levemente melhor do que os valores de pH igual a 7 e 10. Na condição de pH = 5,5, a concentração de acetato de etila passou de 27,3 % (v/v) para 11,4 % (v/v), após 24 h de reação, o que representa cerca de 65 % (v/v) de hidrólise. Nos outros valores de pH, a concentração passou de cerca de 29 % (v/v) para 14 % (v/v) na mistura final (Tabela 3).

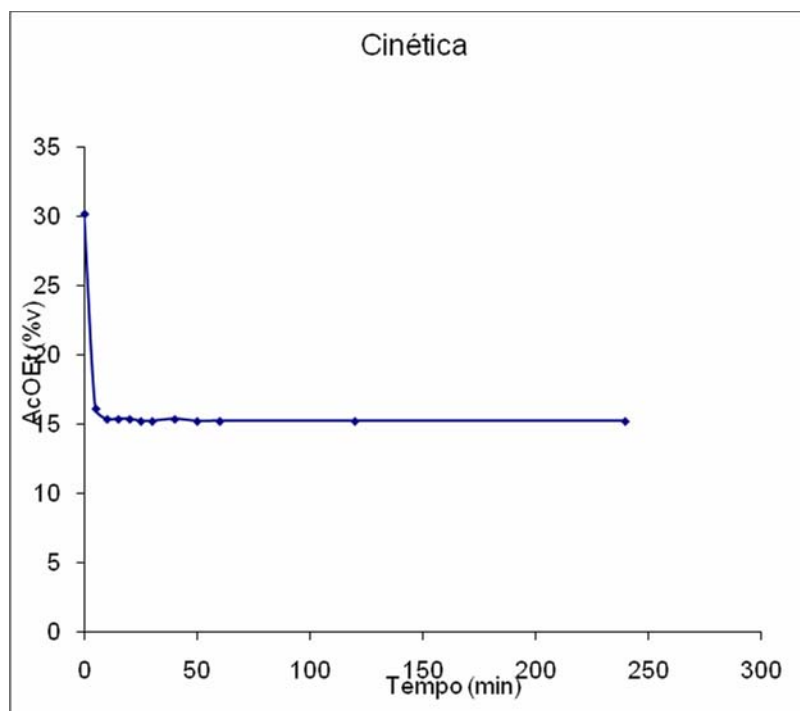
### 2.2.3 Determinação do rendimento da biorreciclagem utilizando *A. terreus*

Para determinar o rendimento da reação, foi realizado um novo experimento com o *A. terreus* conforme procedimento descrito na seção 7.1.3. Neste caso, foi feita a destilação no próprio reator ao final da reação de hidrólise. Com isso, dos 600 mL iniciais de mistura (hexanos/acetato de etila) com concentração de 29 % (v/v) de acetato de etila, após reação e posterior destilação, foram recuperados 470 mL de mistura de solvente na concentração de 18 % (v/v), o que nos forneceu uma recuperação de 91% do hexano.

### 2.2.4 Estudo da cinética da biorreciclagem utilizando *A. terreus*

Para determinar o tempo ideal de reação, a biotransformação da mistura-resíduo, usando o *A. terreus* foi realizada no reator conforme procedimento descrito

na seção 7.1.3 (Gráfico 2). A reação envolveu o uso de 600 mL de resíduo (hexanos/acetato de etila) com concentração de 30 % (v/v) de acetato de etila e 3 litros de meio de cultura contendo o microrganismo.



**Gráfico 2.** Variação da concentração de AcOEt durante a biorreciclagem.

Como pode ser observado no Gráfico 2, a biotransformação ocorre rapidamente, passando dos 30 % (v/v) iniciais de acetato de etila para cerca de 15 % (v/v) em apenas 5 minutos de reação. Duas características reacionais são observadas após os 5 minutos de reação, a mudança da coloração da mistura, que modifica de amarela para preta, e o valor de pH que diminui de 5,4 para 4,8.

Dessa forma, são necessários estudos mais detalhados para determinar de maneira clara os fatores que levam a reação parar tão rapidamente e muito antes de completar a hidrólise. Os fatores mais importantes que devem ser considerados são: adição controlada do resíduo, controle do pH ao longo da reação e a influência da formação do etanol e do ácido acético, os quais podem estar inativando a(s) enzima(s).

### 2.2.5 Determinação da concentração de proteínas e atividade enzimática

A quantificação da concentração de proteínas foi realizada conforme o método de Bradford<sup>18</sup>, e para a medida da atividade enzimática foi usado o procedimento adotado por Kamimura *et al.*<sup>19</sup> descrito detalhadamente nas seções 7.1.6 e 7.1.7. Esses dois ensaios foram feitos tanto para o filtrado (meio de cultura após crescimento do fungo) quanto para as células, sendo estas homogeneizadas em um aparelho do tipo Potter.

A atividade enzimática de lipase presente no *A. terreus* foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva. Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de NaOH, utilizando timolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima que libera um  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto de reação à 37 °C.

Desse modo, foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Concentração de proteínas e atividade enzimática do *A. terreus*.

	<b>Concentração de proteínas</b>	<b>Atividade Enzimática</b> (U/ mg <sub>proteína</sub> )
<b>Filtrado</b>	<b>24,1</b> $\mu\text{g}/\text{mL}_{\text{filtrado}}$	21,6
<b>Células</b>	<b>140,1</b> $\mu\text{g}/\text{mL}_{\text{homogeneizado}}$	2,5

Observa-se que apesar da concentração de proteínas nas células ser muito maior que a do filtrado, a atividade deste é muito maior. Isso está de acordo com o fato de que as lipases fúngicas são essencialmente extracelulares<sup>9</sup>.

## 2.3 Biorreciclagem usando enzimas comerciais

Nesta seção, apresentamos os resultados obtidos pelos experimentos usando sete diferentes lipases comerciais: **Lipolase 100T** (lipase de *Humicola lanuginosa* imobilizada), **Lipozyme RM IM** (lipase de *Rhizomucor miehei*, imobilizada), **Lipozyme TL IM** (lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada), **Novozyme 435** (CAL-B, lipase de *Candida antarctica*, fração B, imobilizada), **Novozyme 735** (CAL-A, lipase de *Candida antarctica*, fração A, imobilizada), **Novozyme CALB-L** (lipase de *Candida antarctica*, fração B, não imobilizada) e **PPL** (lipase do pâncreas de porco, bruto, Tipo II).

Os experimentos com as enzimas foram feitos em Erlenmeyers devidamente vedados, contendo 50 mL água destilada ou solução tampão, 50 mL da mistura hexano-acetato de etila e a enzima apropriada [3 g (sólido) ou 3 mL (líquido)]. As reações foram realizadas a 32 °C durante 48 h, em agitador orbital a 160 rpm (rotação por minuto).

Como a estrutura e a forma do centro ativo são uma decorrência da estrutura primária da enzima e, podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na proteína, a atividade enzimática é dependente das características do meio na qual ela está. Portanto, o pH, a temperatura e a composição química do meio na qual a enzima está presente são fatores importantes para a determinação da atividade específica de uma enzima. Sendo assim, todas as enzimas foram submetidas a diferentes valores de pH, 5,7, 7 e 10 apresentando os resultados apresentados nas Tabelas 5, 6 e 7, respectivamente.



**Tabela 5.** Hidrólise de acetato de etila presente no resíduo (Hexanos/acetato de etila) usando água destilada (pH = 5,7).

Enzima	Concentração de AcOEt (%v/v)		
	0 h	24 h	48 h
<b>Novozyme 435</b>	26,9	3,9	3,9
<b>Lipozyme RM IM</b>	26,9	18,0	16,3
<b>Lipozyme TL</b>	26,9	22,4	22,2
<b>PPL</b>	26,9	23,0	23,9
<b>Lipolase 100T</b>	30,5	26,4	26,3
<b>Novozyme 735</b>	30,5	25,2	24,0
<b>Novozyme CALB-L</b>	30,5	5,3	5,0

**Tabela 6.** Hidrólise de acetato de etila presente no resíduo (Hexano/acetato de etila) usando solução tampão com pH = 7,0

Enzimas	Concentração de AcOEt (%v/v)		
	0 h	24 h	48 h
<b>Novozyme 435</b>	30,4	6,0	5,9
<b>Lipozyme RM IM</b>	30,4	17,1	15,9
<b>Lipozyme TL</b>	30,4	19,2	18,7
<b>PPL</b>	30,4	23,9	23,6
<b>Lipolase 100T</b>	30,4	23,7	23,3
<b>Novozyme 735</b>	30,4	25,1	25,1
<b>Novozyme CALB-L</b>	30,4	5,7	5,6

**Tabela 7.** Hidrólise de acetato de etila presente no resíduo (Hexano/acetato de etila) usando solução tampão com pH = 10,0.

<b>Enzimas</b>	<b>Concentração de AcOEt (%v/v)</b>		
	<b>0 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>
<b>Novozyme 435</b>	30,4	6,0	5,7
<b>Lipozyme RM IM</b>	30,4	18,9	17,2
<b>Lipozyme TL</b>	30,4	19,8	19,3
<b>PPL</b>	30,4	24,9	24,6
<b>Lipolase 100T</b>	30,4	22,5	22,4
<b>Novozyme 735</b>	30,4	23,6	24,2
<b>Novozyme CALB-L</b>	30,4	5,9	5,4

Como foi possível observar nas tabelas 5, 6 e 7, em todos os valores de pH, a enzima CAL-B apresentou o melhor desempenho, tanto na forma imobilizada (Novozyme 435) quanto na forma líquida (Novozyme CALB-L). Ambas hidrolisaram em torno de 80% do acetato de etila, reduzindo a sua concentração de 30 para 5 % (v/v).

Observe que, para a enzima CAL-B, não houve diferença significativa nos resultados quando a reação foi realizada em diferentes valores de pH. Isso pode acontecer devido à baixa concentração do tampão, o que acarreta baixo poder tamponante e, conseqüentemente, com a formação de ácido acético, os valores de pH alteram-se para um valor abaixo do recomendado para a enzima, tornando o pH inicial com pouca relevância. Outro fator que pode estar levando a essa similaridade de resultados é a ocorrência de inibição enzimática ou a desnaturação devido ao etanol e ao ácido acético formado durante as reações. Novos ensaios reutilizando as enzimas poderiam esclarecer melhor se a perda da atividade é definitiva ou temporária.

## 2.4 Biorreciclagem em reator de leito fixo

Para avaliar a possibilidade de tratarmos grandes quantidades de efluentes foram realizados alguns ensaios em um processo contínuo com reator tubular de leito fixo. Devido aos bons resultados obtidos com o emprego da lipase Novozyme 435 durante a triagem e, por estar imobilizada, esta foi escolhida para os experimentos em reator de leito fixo, também chamado de PBR (*packed bed reactor*). Para isso foi montado o processo esquematizado na Figura 8.

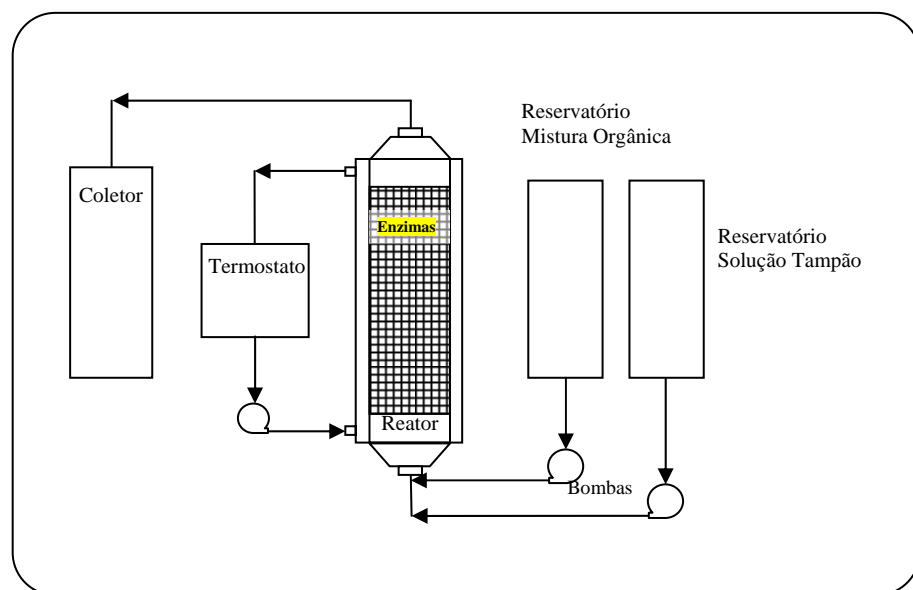


Figura 6. Sistema contínuo com reator PBR.

No reator de leito fixo, a enzima imobilizada é empacotada, permanecendo estacionária, enquanto a solução de substrato é bombeada através dela.

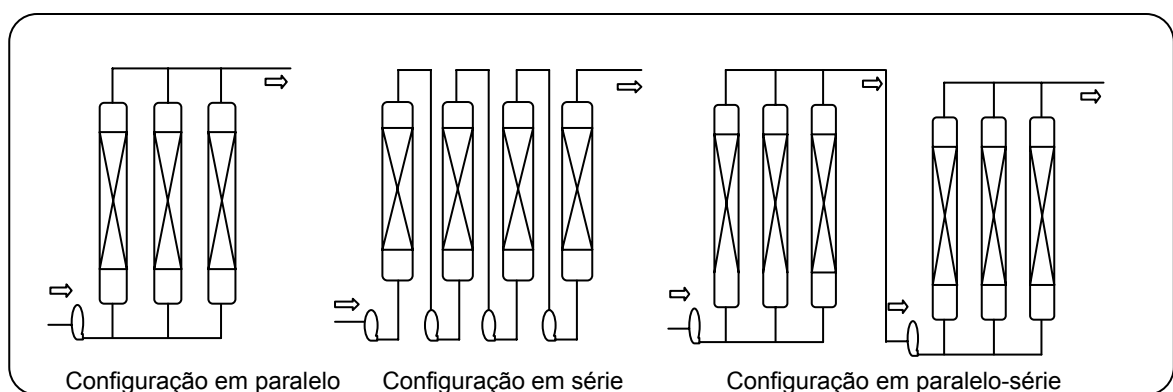
O reator tipo PBR apresenta diversas vantagens, por isso tem sido muito utilizado, dentre elas podemos destacar as seguintes:

- Processo e operação simples;
- Não há necessidade de filtração de enzimas;
- Reuso da enzima;
- Menor tempo de reação;
- Reação eficiente em condições operacionais ótimas.

Em todo o sistema são encontradas desvantagens e limitações, como por exemplo:

- Limitações na transferência de massa;
- Queda de pressão significativa principalmente quando se usa enzimas imobilizadas em partículas pequenas ou a grandes vazões;
- Possibilidade da ocorrência de entupimento do reator durante a operação.

Devido a essas limitações é mais vantajoso o uso de reatores pequenos e, quando houver necessidade de expandir a capacidade, basta conectar reatores similares em configuração paralela<sup>20</sup> (Figura 7).



**Figura 7.** Possíveis configurações de múltiplos reatores.

Para evitar a necessidade de ajustar constantemente a vazão devido à perda da atividade enzimática, podem-se usar pequenos reatores em série, de modo que a idade da enzima seja diferente ao longo do fluxo. Assim, o reator com baixo rendimento pode ser retirado da série e um novo deve ser inserido no final da série. Desse modo consegue-se manter a qualidade do produto se o número de reatores for suficiente. Também é possível combinar essas duas configurações de modo a aproveitar as vantagens do uso de reatores pequenos para produzir maiores escalas de produtos com nível qualidade estável.

No presente trabalho, a solução tampão e a mistura orgânica foram bombeadas através de bombas peristálticas independentes e em fluxo concorrente e ascendente. O reator, que possui diâmetro interno 10 mm, foi mantido a 32 °C. Devido ao crescente empacotamento, ocasionando queda de pressão acentuada e, conseqüentemente, dificultando o bombeamento através do reator, foi necessário utilizar esferas de vidro (2 mm de diâmetro) junto com as enzimas, servindo de suporte de modo a minimizar esses problemas. O uso de vazões relativamente altas colaborava para que isso ocorresse. Além disso, materiais poliméricos usados para imobilizar as enzimas aumentam de tamanho quando na presença de solventes<sup>21</sup>.

#### 2.4.1 Estudo do efeito da variação do pH na biorreciclagem em reator de leito fixo

Novamente, a enzima CAL-B foi submetida a diferentes valores de pH usando solução tampão fosfato. Os parâmetros e os resultados estão apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Efeito da variação do pH na taxa de hidrólise de acetato de etila mediada por CAL-B em reator de leito fixo.

Vazão mistura (mL/h)	Vazão tampão (mL/h)	pH inicial	Conc. Tampão (mol/L)	pH final	AcOEt inicial (%v/v)	AcOEt residual (%v/v)	Hidrólise de AcOEt (%v/v)
105	300	7,0	1,0	6,6	19,8	11,8	40
107	320	8,1	1,0	7,3	19,6	12,0	39
100	300	9,3	1,0	7,4	19,3	11,2	42

Conc.= Concentração

Observando a Tabela 8, verifica-se que não houve diferenças significativas na taxa de hidrólise entre os diferentes valores de pH. Em todos os casos a hidrólise ficou em torno de 40 % (v/v).

#### 2.4.2 Estudo do efeito da variação do tipo de solução tampão na biorreciclagem em reator de leito fixo

O uso de diferentes soluções tampão pode alterar a atividade enzimática, em alguns casos aumentando-a e, em outros, diminuindo-a.<sup>22</sup> Diante disso, a reação também foi testada em dois tipos de solução tampão, fosfato ( $\text{NaHPO}_4 / \text{K}_2\text{PO}_4$ ) e carbonato ( $\text{NaHCO}_3 / \text{Na}_2\text{CO}_3$ ), com pH inicial de 9,4 e concentração de  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  (Tabela 9).

**Tabela 9.** Efeito da variação do tipo de solução tampão na reação de hidrólise de acetato de etila mediada por CAL-B em reator de leito fixo.

	Vazão mistura (mL/h)	Vazão tampão (mL/h)	AcOEt inicial (%, v/v)	pH da solução residual	AcOEt residual (%, v/v)	Hidrólise de AcOEt (%)
Tampão fosfato	108	303	20,0	6,8	10,7	46
Tampão carbonato	100	290	19,3	7,6	7,2	63

Como podemos observar na tabela 9, o emprego de solução tampão carbonato forneceu a maior taxa de hidrólise, alcançando 63 % (v/v), onde a concentração de acetato de etila foi reduzida de 19,3 para 7,2 % (v/v). No caso do uso de solução tampão fosfato a taxa de hidrólise foi de 46 % (v/v) e, a concentração de AcOEt foi diminuída de 20,0 para 10,7 % (v/v).

#### 2.4.3 Estudo do efeito da variação da vazão da solução tampão na biorreciclagem em reator de leito fixo

O tempo de residência de uma reação enzimática (tempo médio gasto por um substrato percorrer todo o reator) muito alto pode levar a inibição ou a inativação das enzimas devido à formação de etanol e de ácido acético em maiores quantidades.

Aumentando a vazão temos uma diminuição no tempo de residência, o que pode acarretar uma diminuição na taxa de hidrólise. Sendo assim, é necessário encontrar o ponto que melhor equilibra essas duas variáveis.

O efeito da variação da vazão do tampão foi avaliado usando solução tampão carbonato (pH = 8,3; 0,5 mol.L<sup>-1</sup>) em temperatura fixa de 32 °C.

Analisando os resultados apresentados na Tabela 10, conclui-se que a proporção volumétrica tampão:mistura orgânica de 1:2 é suficiente, pois nesse caso a taxa de hidrólise manteve-se próximo ao obtido com proporção 1:3. Além disso, o valor de pH final ainda permanece dentro da faixa adequada para manter a estabilidade enzimática e com isso é possível utilizar o mínimo de solução tampão para realizar a reação de hidrólise. Usando essa proporção a concentração de acetato de etila caiu de 18,5 para 7,9 % (v/v).

**Tabela 10.** Efeito da variação da vazão do tampão durante a biorreciclagem de hexano em reator de leito fixo.

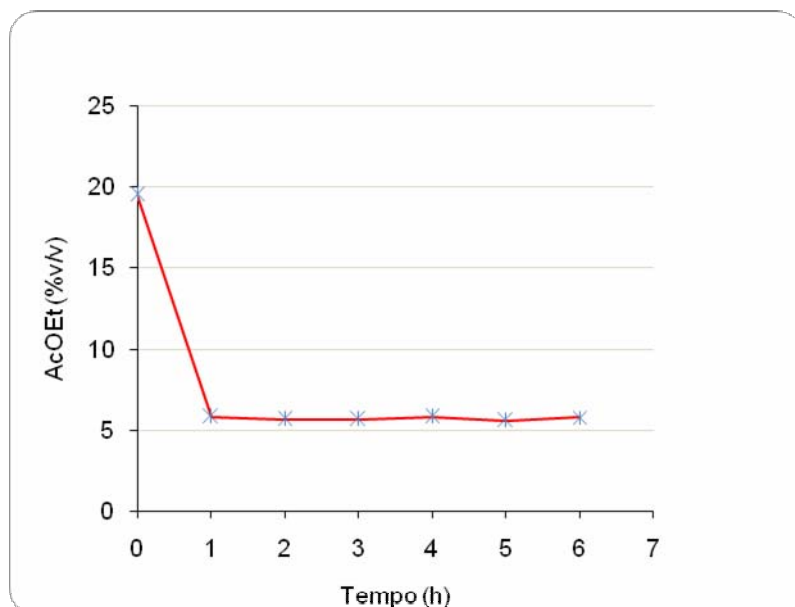
Vazão mistura (mL/h)	Vazão tampão (mL/h)	pH da solução residual	AcOEt residual (%v/v)	Hidrólise de AcOEt (%v/v)
100	300	7,6	6,6	64
100	200	7,2	7,9	57
100	100	5,0	9,9	46

#### 2.4.4 Avaliação da estabilidade da CAL-B na biorreciclagem em reator de leito fixo

Um dos maiores desafios das reações biocatalíticas é a manutenção da atividade enzimática por longos períodos de tempo. Pensando nisso, a estabilidade do processo foi testada mantendo-o em funcionamento durante 6 horas, com a vazão da mistura orgânica a 100 mL/h e a vazão do tampão a 300 mL/h. Foi usado

tampão carbonato com pH inicial 8,3 e concentração  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  e a mistura orgânica inicial contendo 19,5 % (v/v) de AcOEt.

O resultado obtido nessas condições está apresentado na figura abaixo (Gráfico. 3).



**Gráfico 3.** Estabilidade da Novozyme 435 em processo contínuo.

Segundo Christensen *et al.*<sup>23</sup> a CAL-B tem o pH ótimo a 7 e em pH 10, 75% da atividade é mantida após 20 h de incubação a temperatura ambiente.

Nas condições empregadas a enzima manteve a mesma atividade durante as seis horas de reação. A concentração de acetato de etila caiu de 19,5 para 5,7 %v/v. A taxa de hidrólise manteve-se em 14 mL/h (70%) e foi possível recuperar 76 mL/h de mistura rica em hexano após passar pelo reator, o que nos fornece um rendimento de 72% em relação ao hexano.

Com isso, vê-se que é possível utilizar a enzima dessa forma por longos períodos de tempo, com boa taxa de reação e de reciclagem.



### CAPÍTULO 3 – BIORRECICLAGEM DE HEXANO - CONCLUSÕES

A biotransformação do acetato de etila presente na mistura hexano-acetato de etila é uma boa alternativa para a reciclagem do hexano. Para isso podem ser usados fungos e enzimas hidrolíticas adquiridas comercialmente.

Todos os microrganismos (*A. niger*, *A. terreus*, *R. oryzae* e *E. nidulans*) avaliados neste trabalho mostraram ser capazes de hidrolisar o acetato de etila de maneira satisfatória, mas o fungo *A. terreus* SSP 1498 apresentou os melhores resultados. Com o emprego desse fungo, ao final da reação, a concentração de AcOEt foi reduzida de 18,1 % para 7,4 % (v/v), bastando para isso cerca de 5 minutos de reação. Aumento na concentração de açúcar no meio de crescimento não provocou mudanças significativas na taxa de hidrólise do éster, tornando-se desnecessário o emprego de maiores concentrações de açúcar.

Dentre as enzimas comerciais avaliadas, a Novozyme 435 (lipase de *C. antarctica*, imobilizada) mostrou-se ser a mais eficaz. O uso de um sistema de agitação mecânico, muito comum em diversos tipos de reatores, usualmente, provoca a quebra do suporte polimérico usado para sua imobilização, levando a perda de sua atividade. Uma solução encontrada para esse problema foi a utilização de um reator tubular de leito fixo empacotado com a enzima, que pode possibilitar o tratamento de grande quantidade de efluente sem a degradação da enzima, o que ficou evidente devido à boa estabilidade apresentada por esse processo. Com esse sistema foi possível reduzir a concentração de AcOEt de 19,5 para 5,7 % (v/v). Com o uso da solução tampão carbonato/bicarbonato foi possível obter taxas de hidrólise de até 63 %, enquanto que com a solução tampão fosfato foi alcançado a marca de 46 %, o que representa uma diferença de 37 %.

Diante o exposto, vê-se que não é preciso tomar medidas radicais contra o uso do petróleo e seus derivados, basta fazer uso racional e sustentável, não focalizando os esforços somente nos aspectos econômicos, mas também, no bem estar ambiental e social.

**PARTE 2: REAÇÕES DE ÓXIDO-  
REDUÇÃO USANDO PLANTAS  
COMESTÍVEIS**

# CAPÍTULO 4 - REAÇÕES DE ÓXIDO-REDUÇÃO USANDO PLANTAS COMESTÍVEIS – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

## 4.1 Introdução

O tratamento de efluentes e os métodos de controle de poluição são insuficientes na resolução dos problemas ambientais causados pelo lançamento desses resíduos, seja no solo, na água ou no ar. Em virtude disso, surgem leis ambientais e sanções cada vez mais restritivas, que dificultam a disposição final de resíduos, aumentando as exigências e os custos para sua realização. Estas restrições, juntamente com o aumento da competitividade de mercado e com a preocupação da população com o meio ambiente, fazem com que cresça uma consciência ambiental nas indústrias, que passam a buscar métodos mais eficazes e econômicos para minimizar e até mesmo não gerar efluentes, eliminando assim o problema antes que seja produzido.

Diante disso, muitos pesquisadores vêm focalizando seus esforços para o desenvolvimento e a aplicação de métodos químicos e biológicos limpos em substituição às reações clássicas que geram resíduos<sup>24,25</sup>. Dentre esses métodos a biocatálise e a biodegradação desempenham um papel importante<sup>26,27,28,29,30,31</sup>.

Transformações químicas biocatalisadas são consideradas ambientalmente amigáveis, pois obedecem aos princípios da química verde. Por isso, as enzimas vêm sendo extensivamente estudadas em síntese química<sup>32</sup> e em biodegradação de poluentes orgânicos<sup>33</sup>. Reações biocatalisadas podem ser realizadas por enzimas provenientes de microrganismos ou plantas. Grande atenção vem sendo dada às reações químicas usando culturas de células de plantas e partes de plantas como biocatalisadores<sup>34,35,36</sup>. Por exemplo, as plantas estão sendo usadas para

degradação de poluentes orgânicos (fitorremediação)<sup>37</sup>, biorredução de cetonas<sup>38</sup>, lactonização<sup>39</sup>, reações de hidrólise<sup>40</sup>, hidroxilação e oxidação<sup>41</sup>.

O uso de extratos brutos e/ou tecidos vegetais pode apresentar em alguns casos, certa desvantagem na seletividade da reação ou a ocorrência de reações inesperadas devido à presença de diversas enzimas, mas por outro lado o seu custo é relativamente baixo. Além disso, essas enzimas geralmente possuem tempo de vida superior àqueles métodos que utilizam enzimas purificadas, visto que elas naturalmente imobilizadas nas células destes materiais biológicos (*habitat* natural) são mais estáveis e, geralmente, possuem os seus cofatores, os quais possuem custo elevado<sup>42</sup>.

#### **4.1.1 O Conceito de Química Verde<sup>43</sup>**

No início da década de 90, uma nova tendência na maneira de como os resíduos químicos devem ser tratados frente a preservação do meio ambiente começou a ser discutida. Esta nova visão do problema levou a proposição de novas e desafiadoras soluções. Fundamentalmente, é preciso buscar uma alternativa que evite ou minimize a produção de resíduos, em detrimento da preocupação exclusiva com o tratamento do resíduo no fim da linha de produção. Este novo direcionamento na questão da redução do impacto da atividade química ao ambiente vem sendo chamado de “*Green chemistry*”, ou química verde, química limpa, química ambientalmente benigna, ou ainda, química auto-sustentável.

A química verde pode ser definida como o desenho, desenvolvimento e implementação de produtos químicos e processos para reduzir ou eliminar o uso ou a geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente. Este conceito, que também pode ser atribuído à tecnologia limpa, vem sendo implementado em aplicações industriais, especialmente em países com indústria química bastante

desenvolvida e que apresentam controle rigoroso na emissão de poluentes. Além disso, gradativamente, a química verde vem sendo incorporada ao meio acadêmico, no ensino e na pesquisa de países em desenvolvimento.

Esta idéia, ética e politicamente poderosa, representa a suposição de que processos químicos que geram problemas ambientais possam ser substituídos por alternativas menos poluentes ou não-poluentes. Tecnologia limpa, prevenção primária, redução na fonte, química ambientalmente benigna, ou ainda “*green chemistry*”, são termos que surgiram para definir esta importante idéia. “*Green chemistry*”, o termo mais utilizado atualmente, foi adotado pela IUPAC, talvez por ser o mais forte entre os demais, pois associa o desenvolvimento na química com o objetivo cada vez mais buscado pelo homem moderno: o **desenvolvimento auto-sustentável**.

#### 4.1.2 Princípios da Química Verde

Basicamente, há doze tópicos que precisam ser perseguidos quando se pretende implementar a química verde em uma indústria ou instituição de ensino e/ou pesquisa na área de química:

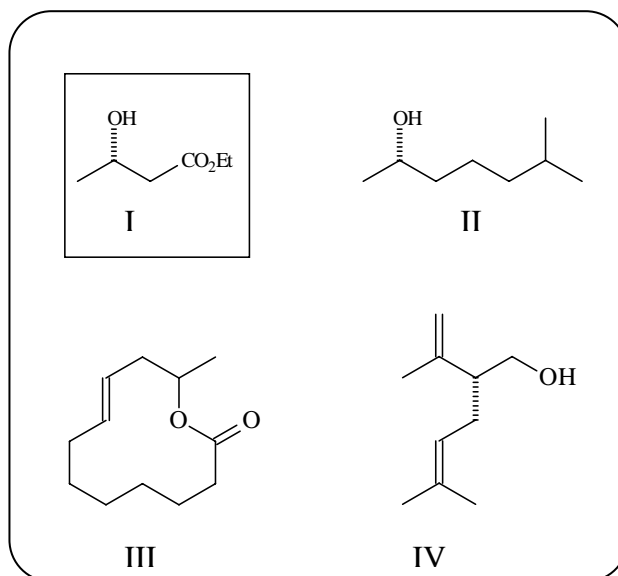
1. **Prevenção.** Evitar a produção do resíduo é melhor que tratá-lo ou “limpá-lo” após sua geração.
2. **Economia de átomos.** Deve-se procurar desenhar metodologias sintéticas que possam maximizar a incorporação de todos os materiais de partida no produto final.
3. **Síntese de produtos menos perigosos.** Sempre que praticável, a síntese de um produto químico deve utilizar e gerar substâncias que possuam pouca ou nenhuma toxicidade à saúde humana e ao ambiente.

4. **Desenho de produtos seguros.** Os produtos químicos devem ser desenhados de tal modo que realizem a função desejada e ao mesmo tempo não sejam tóxicos.
5. **Solventes e auxiliares mais seguros.** O uso de substância auxiliar (solventes, agentes de separação, secantes, etc.) precisa, sempre que possível, tornar-se desnecessário e, quando utilizadas, estas substâncias devem ser inócuas.
6. **Busca pela Eficiência de Energia.** A utilização de energia pelos processos químicos precisa ser reconhecida pelos seus impactos ambientais e econômicos e deve ser minimizada. Se possível, os processos químicos devem ser conduzidos à temperatura e pressão ambiente.
7. **Uso de Fontes Renováveis de Matéria-Prima.** Sempre que técnica e economicamente viável, a utilização de matérias-primas renováveis deve ser escolhida em detrimento de fontes não-renováveis.
8. **Evitar a Formação de Derivados.** A derivatização desnecessária (uso de grupos bloqueadores, proteção/desproteção, modificação temporária por processos físicos e químicos) deve ser minimizada ou, se possível, evitada, porque estas etapas requerem reagentes adicionais e podem gerar resíduos.
9. **Catálise.** Reagentes catalíticos, tão seletivos quanto possível, são melhores que reagentes estequiométricos.
10. **Desenho para a Degradação.** Os produtos químicos precisam ser desenhados de tal modo que, ao final de sua função, se fragmentem em produtos de degradação inócuos e não persistam no ambiente.
11. **Análise em Tempo Real para a Prevenção da Poluição.** Será necessário o desenvolvimento futuro de metodologias analíticas que viabilizem um monitoramento e controle dentro do processo, em tempo real, antes da formação de substâncias nocivas.

12. **Química Intrinsecamente Segura para a Prevenção de Acidentes.** As substâncias, bem como a maneira pela qual uma substância é utilizada em um processo químico, devem ser escolhidas a fim de minimizar o potencial para acidentes químicos, incluindo vazamentos, explosões e incêndios.

#### 4.1.3 Importância dos álcoois quirais<sup>44</sup>

Alcoóis quirais são precursores importantes, pois servem como intermediários ou como blocos de construção quiral (“*chiral building blocks*”) na síntese de diversos compostos quirais de importância biológica. Entre vários exemplos, o (S)-(-)-3-hidroxi-butanoato de etila (I), é um dos alcoóis quirais mais utilizados como precursor quiral em síntese orgânica: o (S)-(+)-sulcatol (II), importante insumo para a síntese de outros produtos naturais; (R)-(+)-recifeolídeo (III), importante aditivo na indústria de perfumes; (R)-lavandulol (IV), macrolídeo de atividade antibiótica reconhecida (Figura 8).



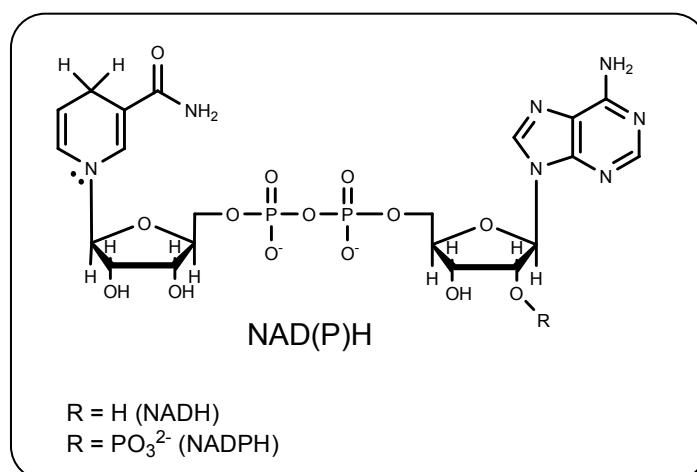
**Figura 8.** Produtos obtidos a partir do álcool (R)- ou (S)-3-hidroxi-butanoato de etila (I).



#### 4.1.4 Álcool desidrogenases<sup>45</sup>

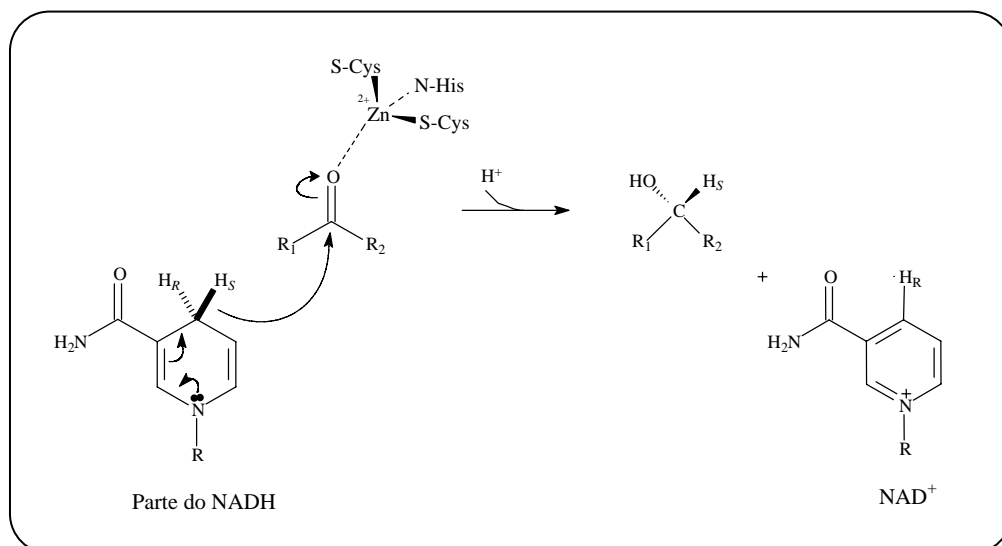
As álcoois desidrogenases são enzimas classificadas como oxidorreduzases que catalisam a conversão reversível de compostos carbonílicos e alcoóis. Para realizar essa tarefa essas enzimas requerem a presença de coenzimas (Figura 9, NADH entrou NADPH).

Quando a enzima álcool desidrogenase converte uma cetona em álcool, por exemplo, a coenzima NADH (forma reduzida da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo) age como um agente redutor ao transferir um hidreto do C4 do anel de nicotinamida para o grupo carbonílico da cetona (Figura 10).



**Figura 9.** Forma reduzida de Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NADH) e Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADPH).

O nitrogênio do anel da nicotinamida facilita esse processo, cedendo seu par de elétrons não-ligantes ao anel, o que, junto com a perda do hidreto, converte-o em um anel mais estável energeticamente, encontrado na NAD<sup>+</sup> (Forma oxidada da Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo). O ânion alcóxido, resultante da transferência do hidreto para a cetona, é então protonado pela enzima para formar o álcool.



**Figura 10.** Mecanismo de ação do NADH em um composto carbonílico.

Apesar do carbono carbonílico da cetona ser inerentemente eletrofílico, devido ao oxigênio eletronegativo estar ligado ao mesmo, algumas enzimas ressaltam essa propriedade, fornecendo o íon zinco, como um ácido de Lewis, para coordenar com o oxigênio da carbonila. O ácido de Lewis estabiliza a carga negativa que se desenvolve no oxigênio no estado de transição. A proteína da enzima tem o papel de andaime e deve então reter o íon zinco, a coenzima e o substrato em ordem tridimensional necessária para diminuir a energia do estado de transição.

A NADH possui dois hidrogênios no C4, onde qualquer um poderia, em princípio, ser transferido como um hidreto no processo de redução. Para uma dada reação enzimática, contudo, apenas um hidreto do C4 da NADH é transferido.

#### 4.1.5 Reação de resolução enzimática<sup>45</sup>

A resolução cinética enzimática consiste na transformação química preferencial de um dos enantiômeros de uma mistura racêmica catalisada por uma enzima. Devido à quiralidade da enzima, um dos enantiômeros acomoda-se melhor no seu sítio ativo e então este é convertido numa velocidade maior, resultando numa resolução (Figura 11).

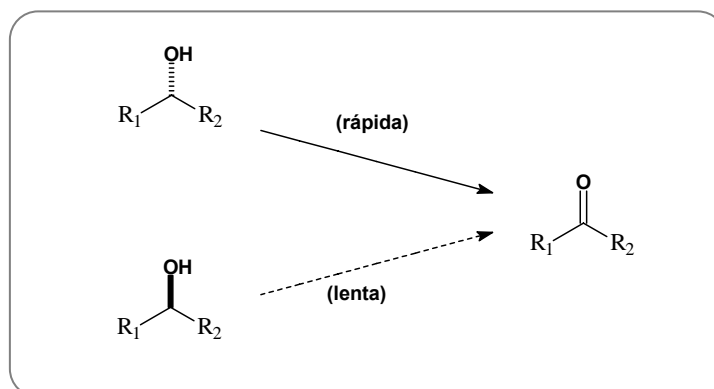


Figura 11. Reação de resolução enzimática.

Essa enantiosseletividade pode ser explicada mais detalhadamente por razões termodinâmicas (Figura 12).

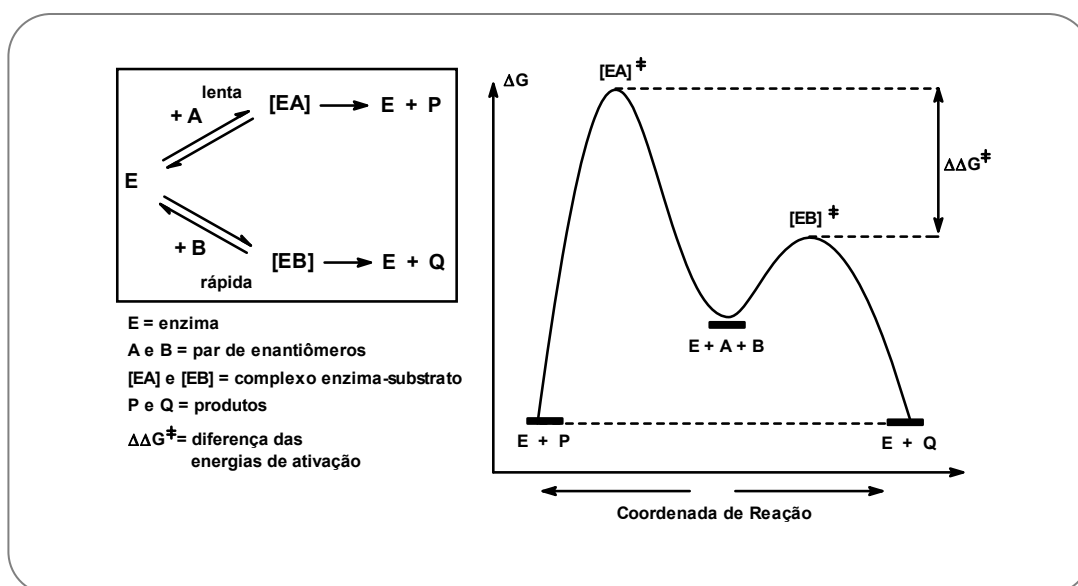


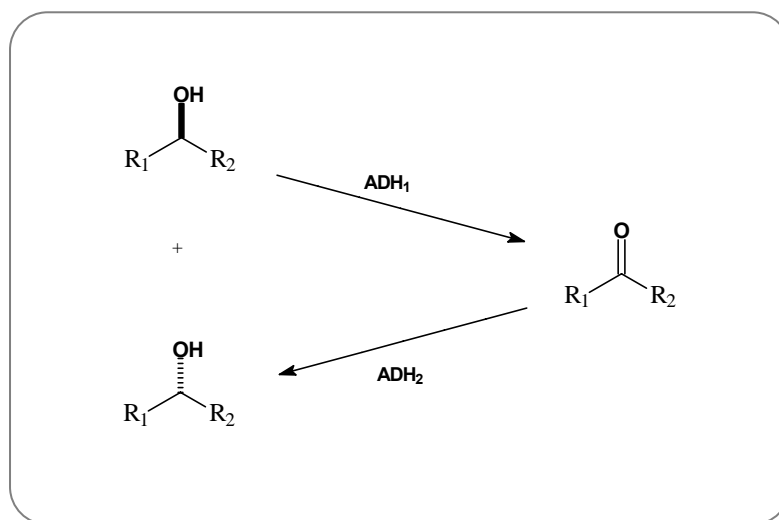
Figura 12. Diagrama de energia de uma reação enantiosseletiva catalisada por enzima.

A Figura 12 mostra uma reação enantiosseletiva na qual dois substratos enantioméricos **A** e **B** competem pelo sítio ativo da enzima. Devido ao ambiente quiral do sítio ativo da enzima, complexos diastereoisoméricos enzima-substrato **[EA]** e **[EB]** são formados e estes contêm diferentes valores de energia livre ( $\Delta G$ ) para seus respectivos estados de transição **[EA]<sup>‡</sup>** e **[EB]<sup>‡</sup>**. O resultado é uma diferença na energia de ativação ( $\Delta\Delta G^\ddagger$ ) entre os enantiômeros. Como

conseqüência, um será transformado mais rapidamente que o outro. O valor de  $\Delta\Delta G^\ddagger$  é uma medida direta para a seletividade da reação, pois este determina a pureza óptica do produto.

#### 4.1.6 Reação de desracemização

O mecanismo de inversão de configuração ou de desracemização de alcoóis secundários ainda não está claramente elucidado. Além disso, há evidências de que os microrganismos apresentam diferentes mecanismos<sup>46</sup>. No entanto, uma das possibilidades é através de duas reações de óxido-redução independentes. Por exemplo, na primeira reação um enantiômero é seletivamente oxidado por uma enzima álcool desidrogenase ( $ADH_1$ ) à correspondente cetona, a qual é reduzida seletivamente por outra enzima  $ADH_2$  levando a formação de um único enantiômero<sup>47</sup> (Figura 13). Isso é possível devido à presença de diversas enzimas no meio reacional.



**Figura 13.** Reação de desracemização.

## 4.2 Objetivos do Estudo

No trabalho iniciado pelo Dr. Álvaro Takeo Omori<sup>48</sup> verificou-se que algumas plantas comestíveis poderiam ser utilizadas para catalisar reações de redução enantiosseletiva de acetofenonas *para*-substituídas. Com o objetivo de aumentar as opções de catalisadores, identificando-os em outros vegetais comestíveis, decidimos dar continuidade ao “*screening*” de biocatalisadores enantiosseletivos para reações de redução de cetonas pró-quirais e, adicionalmente, estudar reações de oxidação de alcoóis secundários racêmicos para obtenção de álcoois enantiomericamente puros ou enriquecidos.

## CAPÍTULO 5 - REAÇÕES DE ÓXIDO-REDUÇÃO USANDO PLANTAS COMESTÍVEIS - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nessa parte do trabalho utilizamos, como fonte de enzimas e seus cofatores para as reações de redução de cetonas pró-quirais e reações de oxidação de álcoois, as seguintes plantas: *Allium schoenoprasum* (cebolina), *Arctium lappa* (bardana), *Arracacia xanthorrhiza* (mandioquinha), *Beta vulgaris* (beterraba), *Brassica rappa* (nabo redondo), *Colocasia esculenta* (inhame), *Coriandrum sativum* (coentro), *Dioscorea alata* (cará), *Ipomoea batatas* (batata doce), *Manihot esculenta* (mandioca), *Polymnia sonchifolia* (yakon), *Raphanus sativus* (nabo japonês), *Solanum tuberosum* (batata inglesa) e *Zingiber officinale* (gingibre).

### 5.1 Reações de redução

A seguir estão apresentados os resultados obtidos com as reações de redução de cetonas pró-quirais por diferentes plantas comestíveis.

#### 5.1.1 Redução da 1-feniletanona (1a)

Inicialmente, realizamos o estudo de biorredução da 1-feniletanona mediada por diversas plantas (Figura 14).

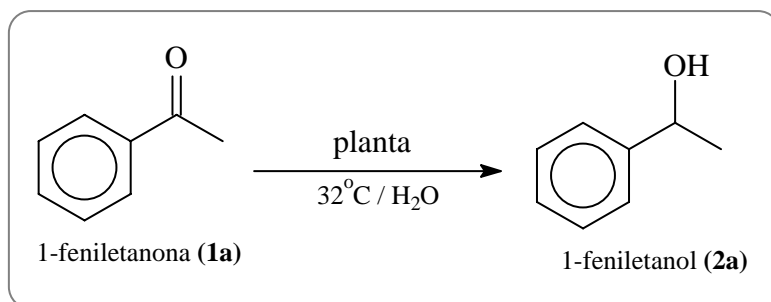


Figura 14. Redução da 1-feniletanona (1a).

**Tabela 11.** Redução da 1-feniletanona (**1a**).

Reação	Biocatalisador	t (d)	2a	
			c (%)	e.e. (%)
1	<i>Allium schoenoprasum</i>	3	5	>98 (S)
		6	5	>98 (S)
2	<i>Arctium lappa</i>	3	8	8 (S)
		6	21	58 (S)
3	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	3	44	91 (S)
		6	91	66 (S)
5	<i>Colocasia esculenta</i>	3	24	50 (S)
		6	27	6 (S)
6	<i>Dioscorea alata</i>	3	30	94 (S)
		6	47	94 (S)
7	<i>Ipomoea batatas</i>	3	8	69 (S)
		6	18	-
8	<i>Manihot esculenta</i>	3	13	29 (R)
		6	14	31 (R)
9	<i>Polymnia sonchifolia</i>	3	2	47 (R)
		6	2	28 (R)
10	<i>Raphanus sativus</i>	3	10	15 (S)
		6	4	79 (R)
11	<i>Solanum tuberosum</i>	3	3	24 (R)
		6	5	7 (S)
12	<i>Zingiber officinale</i>	3	8	>98 (S)
		6	8	>98 (S)

t: tempo (dias); c: conversão determinada por CG;  
e.e.: excesso enantiomérico; Configuração absoluta está entre parênteses.

Como podemos observar na tabela 11, os melhores resultados de enantiosseletividade foram apresentados pela *A. xanthorrhiza* e *D. alata*, com as quais foi obtido o 1-feniletanol com boa conversão e bom excesso enantiomérico. Com a primeira planta, alcançou-se 44 % de conversão e 91 % de excesso

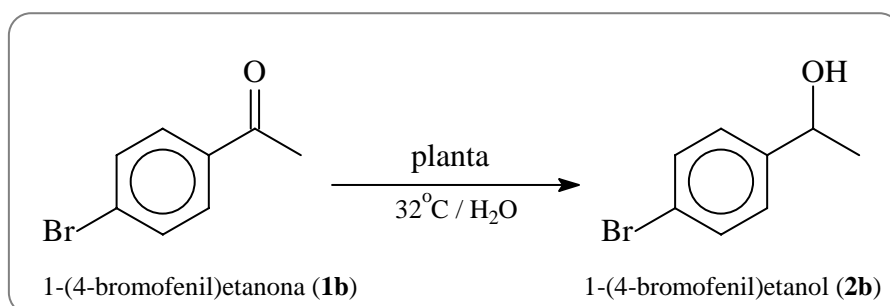
enantiomérico (% e.e.) após 3 dias de reação. Já com a segunda planta, alcançou-se 47 % de conversão e 94% e.e. depois de 6 dias (Tabela 11, Reações 3 e 6).

Com *A. schoenoprasum*, *B. rappa* e *Z. officinale* foram obtidos excelentes excessos enantioméricos (>98%), no entanto, a conversão foi insatisfatória, ficando abaixo de 10% (Tabela 11, Reações 1, 4 e 12). Provavelmente esse tipo de adversidade pode ser contornado diminuindo a concentração do substrato a nível comumente usado em reações biocatalisadas ou aumentando o tempo reacional.

O restante das plantas não apresentou resultados satisfatórios nessas condições, ou seja, tanto a conversão quanto o excesso enantiomérico foram baixos.

### 5.1.2 Redução da 1-(4-bromofenil)etanona (**1b**)

Para a redução do 1-(4-bromofenil)etanona (**1b**) (Figura 15), todas as plantas relacionadas na Tabela 12 apresentaram alta enantiosseletividade, com exceção do *C. sativum*. No entanto, a conversão ficou baixa na maioria dos casos, pois alcançou o máximo de 55%.



**Figura 15.** Redução da 1-(4-bromofenil)etanona (**1b**).

Como podemos observar na tabela 12, usando a *A. xanthorrhiza*, o (*R*)-1-(4-bromofenil)etanol (**2b**) foi obtido com 98 %e.e. e 14 % de conversão após 3 dias de reação (Tabela 12, Reação 3). Um resultado similar foi obtido com a *B. vulgaris*, com conversão de 10% e e.e. > 98% (Tabela 12, Reação 4). Entretanto, com o emprego



da *M. esculenta* como biocatalisador, o álcool (*R*)-1-(4-bromofenil)etanol (**2b**) foi obtido com 90 % de e.e. e conversão de 50% (Tabela 12, Reação 8). Além disso, de maneira geral, observou-se que aumentando o tempo de reação para 6 dias não houve melhoria na conversão e o excesso enantiomérico manteve-se no mesmo nível.

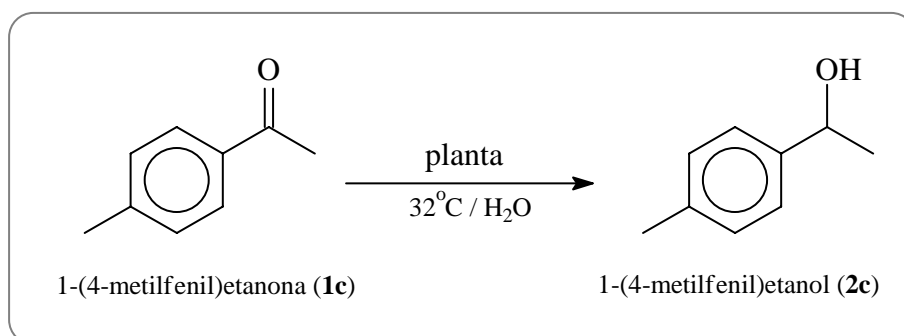
**Tabela 12.** Redução da 1-(4-bromofenil)etanona (**1b**).

Reação	Biocatalisador	t (d)	2b	
			c (%)	e.e. (%)
1	<i>Allium schoenoprasum</i>	3	3	>98 (S)
		6	5	>98 (S)
2	<i>Arctium lappa</i>	3	-	-
		6	-	-
3	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	3	14	>98 (S)
		6	17	>98 (S)
4	<i>Beta vulgaris</i>	3	10	>99 (S)
		6	12	>99 (S)
5	<i>Colocasia esculenta</i>	3	6	>98 (S)
		6	11	>98 (S)
6	<i>Coriandrum sativum</i>	3	-	-
		6	13	66 (S)
7	<i>Dioscorea alata</i>	3	3	>98 (S)
		6	3	>98 (S)
8	<i>Manihot esculenta</i>	3	50	90 (R)
		6	55	89 (R)
10	<i>Raphanus sativus</i>	3	4	>98 (S)
		6	6	>98 (S)

t: tempo (dias); c: conversão determinada por CG;  
e.e.: excesso enantiomérico; Configuração absoluta está entre parênteses.

### 5.1.3 Redução da 1-(4-metilfenil)etanona (1c)

A 1-(4-metilfenil)etanona (**1c**) foi enantiosseletivamente reduzida pela *A. xanthorrhiza* e *B. vulgaris*, com as quais foi possível obter, após 3 dias de reação, o (*R*)-1-(4-metilfenil)etanol com 78 % de e.e. e 86 % de e.e., respectivamente (Figura 16, Tabela 13, Reações 3 e 4).



**Figura 16.** Redução da 1-(4-metilfenil)etanona (**1c**).

*A. Schoenoprasum*, *A. lappa*, *M. esculenta* e *R. sativus* apresentaram excelente enantiosseletividade (e.e. maior que 98 %), mas a conversão ficou muito baixa (menor que 3%).

O restante das plantas – *C. esculenta*, *C. sativum* e *D. alata* – não mostrou capacidade redutora satisfatória.

**Tabela 13.** Redução da 1-(4-metilfenil)etanona (**1c**).

Reação	Biocatalisador	t (d)	2c	
			c (%)	e.e. (%)
1	<i>Allium schoenoprasum</i>	3	1	>98 (S)
		6	-	-
2	<i>Arctium lappa</i>	3	1	>98 (S)
		6	1	>98 (S)
3	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	3	32	78 (R)
		6	-	-
4	<i>Beta vulgaris</i>	3	22	86 (R)
		6	27	87 (R)
5	<i>Colocasia esculenta</i>	3	13	38 (S)
		6	18	35 (S)
6	<i>Coriandrum sativum</i>	3	-	-
		6	-	-
7	<i>Dioscorea alata</i>	3	7	29 (S)
		6	11	25 (S)
8	<i>Manihot esculenta</i>	3	2	>98 (S)
		6	3	>98 (S)
10	<i>Raphanus sativus</i>	3	1	>98 (S)
		6	1	>98 (S)

t: tempo (dias); c: conversão determinada por CG;  
e.e.: excesso enantiomérico; Configuração absoluta está entre parênteses.

#### 5.1.4 Redução da 1-(4-nitrofenil)etanona (**1d**)

O substrato 1-(4-nitrofenil)etanona (**1d**) foi enantiosseletivamente reduzido ao (S)-1-(4-nitrofenil)etanol, pela *A. xanthorrhiza* e pela *M. esculenta* (Figura 17, Tabela 14, Reações 3 e 7). A *C. sativum* apresentou a melhor enantiosseletividade (maior que 98 % e.e.), mas a conversão ficou baixa (16%).

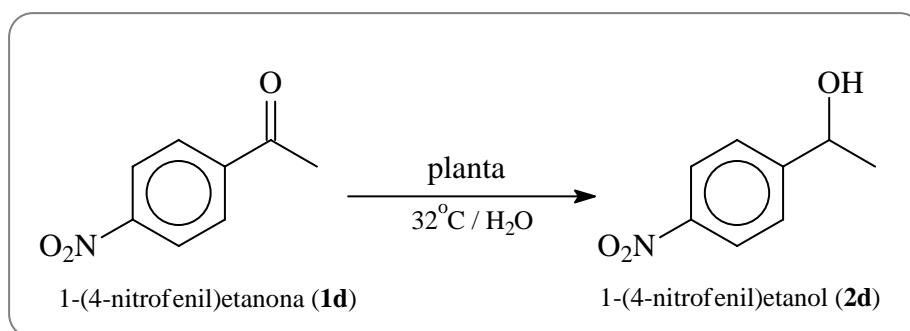


Figura 17. Redução da 1-(4-nitrofenil)etanona (**1d**).

Além da reação de redução, observou-se a redução do grupamento nitro quando usado *A. schoenoprasum*, *A. xanthorrhiza*, *C. esculenta* e *M. esculenta* como biocatalisadores. Nesse caso, foi obtido como produto a 1-(4-aminofenil)etanona (Figura 18). A *C. esculenta* levou à redução completa do grupo nitro (—NO<sub>2</sub>) em amino (—NH<sub>2</sub>) depois de 6 dias de reação (Tabela 14, Reação 4), transformando completamente o substrato em 1-(4-aminofenil)etanona.

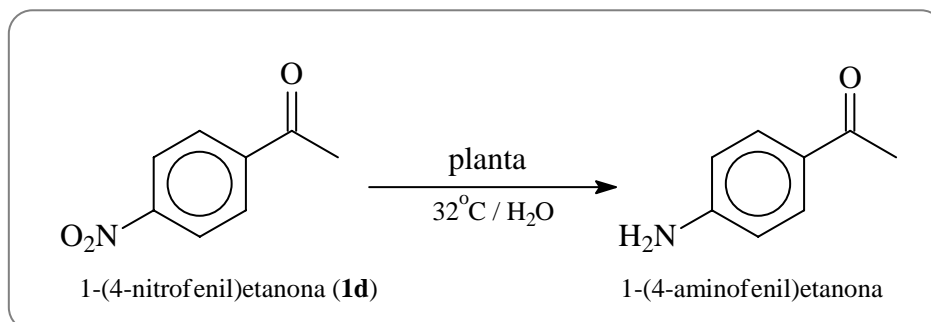


Figura 18. Formação da 1-(4-aminofenil)etanona

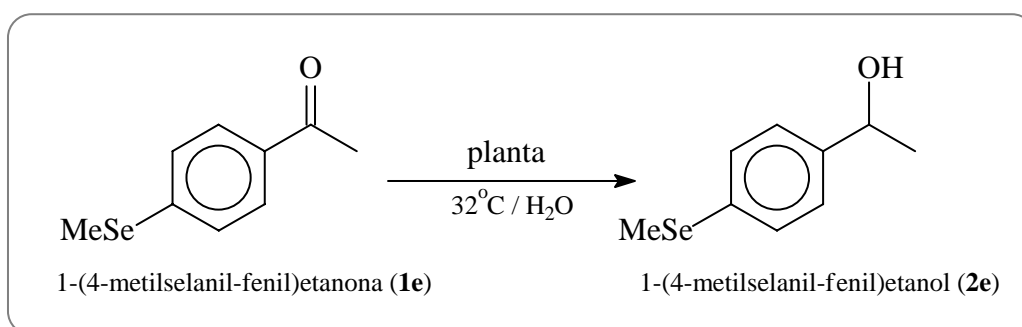
**Tabela 14.** Redução da 1-(4-nitrofenil)etanona (**1d**).

Reação	Biocatalisador	t (d)	2d	
			c (%)	e.e. (%)
1	<i>Allium schoenoprasum</i>	3	3	10 (R)
		6	21 (31 <sup>a</sup> )	48 (S)
2	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	3	68 (6 <sup>a</sup> )	96 (S)
		6	79 (9 <sup>a</sup> )	95 (S)
4	<i>Colocasia esculenta</i>	3	73 (24 <sup>a</sup> )	-
		6	(100 <sup>a</sup> )	-
5	<i>Coriandrum sativum</i>	3	16	>98 (S)
		6	16	96 (S)
6	<i>Dioscorea alata</i>	3	21	87 (S)
		6	24	86 (S)
7	<i>Manihot esculenta</i>	3	51 (19 <sup>a</sup> )	91 (S)
		6	56 (20 <sup>a</sup> )	91 (S)
8	<i>Raphanus sativus</i>	3	2	>98 (S)
		6	2	64 (S)

t: tempo (dias); c: conversão determinada por CG;  
e.e.: excesso enantiomérico; Configuração absoluta está entre parênteses.  
<sup>a</sup> 4'-aminoacetofenona

### 5.1.5 Redução de 1-(4-metilselanil-fenil)etanona (**1e**)

No caso da busca por biocatalisadores para redução enantiosseletiva da 1-(4-metilselanil-fenil)etanona (**1e**) (Figura 19), o melhor encontrado foi a *A. xanthorrhiza*, com a qual obteve-se o álcool (S)-1-(4-metilselanil-fenil)etanol (**2e**) com excesso enantiomérico maior que 98% e conversão de 21% após 3 dias de reação (Tabela 15, Reação 3).



**Figura 19.** Redução da 1-(4-metilselanil-fenil)etanona (**1e**).

*A. schoenoprasum*, *C. sativum* e *M. esculenta* também apresentaram alta enantiosseletividade (maior que 98%e.e.), mas, baixa conversão (menor que 9%).

O restante das plantas não apresentou resultados significantes nessas condições.

**Tabela 15.** Redução da 1-(4-metilselanil-fenil)etanona (**1e**).

Reação	Biocatalisador	t (d)	2e	
			c (%)	e.e. (%)
1	<i>Allium schoenoprasum</i>	3	1	>98 (S)
		6	4	>98 (S)
2	<i>Arctium lappa</i>	3	-	-
		6	4	44 (S)
3	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	3	21	>98 (S)
		6	10	>98 (S)
4	<i>Beta vulgaris</i>	3	-	-
		6	4	44 (S)
5	<i>Colocasia esculenta</i>	3	18	71 (S)
		6	19	71 (S)
6	<i>Coriandrum sativum</i>	3	2	>98 (S)
		6	-	-
7	<i>Dioscorea alata</i>	3	1	27 (R)
		6	3	10 (S)
8	<i>Manihot esculenta</i>	3	-	-
		6	9	>98 (S)
9	<i>Raphanus sativus</i>	3	-	-
		6	2	66 (S)

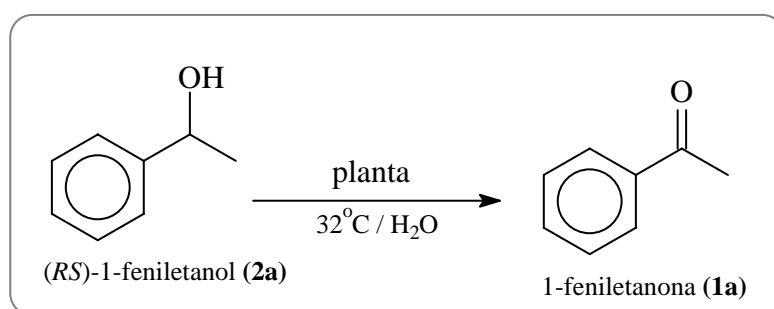
t: tempo (dias); c: conversão determinada por CG;  
e.e.: excesso enantiomérico; Configuração absoluta está entre parênteses.

## 5.2 Reações de oxidação

Nesta seção estão apresentados os resultados referentes à avaliação do potencial catalítico de diferentes plantas como agentes oxidantes, de resolução ou desracemizantes de alcoóis secundários racêmicos. O mesmo procedimento das reações de redução, foi empregado para as reações de oxidação, alterando-se somente o substrato adicionado.

### 5.2.1 Oxidação do (*RS*)-1-feniletanol (**2a**)

Na busca por biocatalisadores para oxidação enantiosseletiva do 1-feniletanol (Figura 20), a *A. schoenoprasum* e *R. sativus* promoveram uma resolução cinética desse álcool (Tabela 16, Reações 1 e 12, respectivamente). Com o uso da *A. schoenoprasum*, 54% do álcool foi convertido à cetona depois de 6 dias de reação, enquanto que o (*R*)-1-feniletanol permaneceu com pureza enantiomérico maior que 98%. De forma similar, obteve-se com a *R. sativus*, após 6 dias, 26% do mesmo enantiômero com excesso enantiomérico maior que 98% e 74 % da respectiva cetona.



**Figura 20.** Oxidação da (*RS*)-1-feniletanol (**2a**).

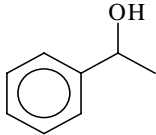
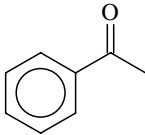
Por outro lado e de forma mais interessante, as plantas *A. xanthorrhiza*, *P. sonchifolia* e *Z. officinale* (Tabela 16, Reações 3, 11 e 14, respectivamente) mostram uma característica típica de uma reação de desracemização. Assim, com o *P. Sonchifolia* e o *Z. officinale*, partindo do 1-feniletanol racêmico (**2a**), foi conseguido o (*S*)-1-feniletanol (**2a**) com ótimo excesso enantiomérico (93% e >98%,



respectivamente) depois de 6 dias de biotransformação. Já com a *A. xanthorrhiza*, após 3 dias, houve uma convergência para o álcool (S)-1-feniletanol (**2a**) com 97 % e.e., mas, após 6 dias, praticamente todo o álcool havia sido oxidado para a respectiva cetona (Tabela 16, Reação 3). Portanto, esta planta pode ser usada tanto como agente de resolução quanto agente oxidante desse álcool.

Como agentes oxidantes, *A. xanthorrhiza*, *C. esculenta*, *R. sativus* e *S. tuberosum* apresentaram bons resultados, com os quais obteve-se a respectiva cetona com mais de 60 % de conversão após 6 dias de reação.

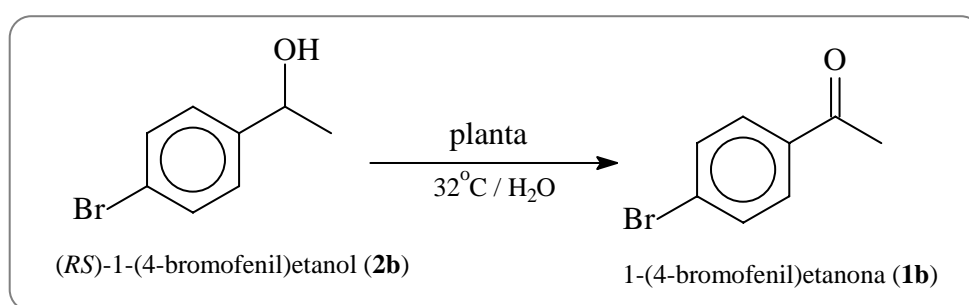
**Tabela 16.** Oxidação do (*RS*)-1-feniletanol (**2a**).

					
Reação	Biocatalisador	t (d)	c (%)	e.e. (%)	c (%)
1	<i>Allium schoenoprasum</i>	3	95	7 ( <i>R</i> )	5
		6	46	>98 ( <i>R</i> )	54
2	<i>Arctium lappa</i>	3	100	6 ( <i>R</i> )	-
		6	100	4 ( <i>R</i> )	-
3	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	3	98	97 ( <i>S</i> )	2
		6	12	17 ( <i>S</i> )	88
4	<i>Beta vulgaris</i>	3	78	21 ( <i>S</i> )	22
		6	77	32 ( <i>S</i> )	23
5	<i>Brassica rappa</i>	3	100	-	-
		6	100	26 ( <i>S</i> )	-
6	<i>Colocasia esculenta</i>	3	67	36 ( <i>R</i> )	33
		6	33	41 ( <i>R</i> )	67
7	<i>Coriandrum sativum</i>	3	76	25 ( <i>R</i> )	24
		6	84	19 ( <i>R</i> )	16
8	<i>Dioscorea alata</i>	3	96	4 ( <i>S</i> )	4
		6	85	6 ( <i>R</i> )	15
9	<i>Ipomoea batatas</i>	3	89	11 ( <i>R</i> )	11
		6	90	11 ( <i>R</i> )	10
10	<i>Manihot esculenta</i>	3	90	7 ( <i>R</i> )	10
		6	87	9 ( <i>R</i> )	13
11	<i>Polymnia sonchifolia</i>	3	100	11 ( <i>S</i> )	-
		6	99	93 ( <i>S</i> )	1
12	<i>Raphanus sativus</i>	3	51	89 ( <i>R</i> )	49
		6	26	>98 ( <i>R</i> )	74
13	<i>Solanum tuberosum</i>	3	74	12 ( <i>S</i> )	26
		6	40	20 ( <i>S</i> )	60
14	<i>Zingiber officinale</i>	3	93	79 ( <i>S</i> )	7
		6	100	>98 ( <i>S</i> )	-

t: tempo (dias); c: conversão determinada por CG;  
e.e.: excesso enantiomérico; Configuração absoluta está entre parênteses.

### 5.2.2 Oxidação do (*RS*)-1-(4-bromofenil)etanol (**2b**)

A *D. alata* é o melhor biocatalisador para a oxidação seletiva do (*RS*)-1-(4-bromofenil)etanol (**2b**) (Figura 21), que foi oxidado para a cetona correspondente **1b** em 53% após 6 dias de reação, deixando o precursor (*S*)-**2b** com 83 % e.e. (Tabela 17, Reação 6).

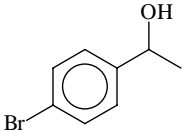
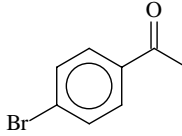


**Figura 21.** Oxidação do (*RS*)-1-(4-bromofenil)etanol (**2b**).

O *A. schoenoprasum* forneceu 37 % da cetona, mas somente após 6 dias de reação e o álcool remanescente apresentou baixo excesso enantiomérico (Tabela 17, Reação 1). *A. Xanthorrhiza*, *C. esculenta*, *S. tuberosum* e *Z. officinale* apresentaram um leve poder oxidante, com a conversão alcançando, no melhor dos casos, 14%.

Em relação às outras plantas, nenhuma apresentou resultados satisfatórios nas condições empregadas.

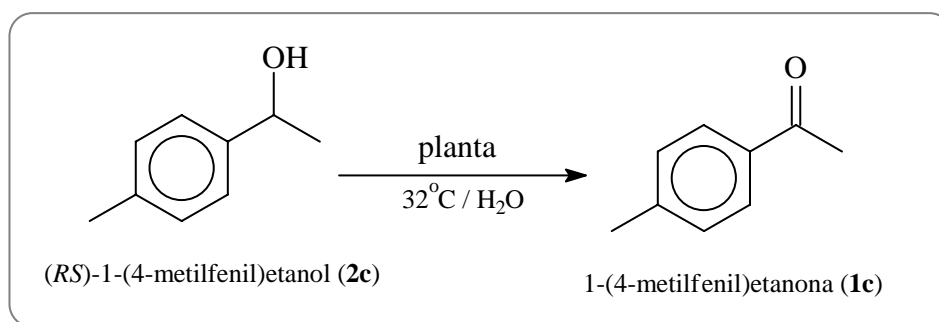
**Tabela 17.** Oxidação do (*RS*)-1-(4-bromofenil)etanol (**2b**).

					
Reação	Biocatalisador	t (d)	c (%)	e.e. (%)	c (%)
1	<i>Allium schoenoprasum</i>	3	94	3 (S)	6
		6	63	43 (S)	37
2	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	3	90	9 (R)	10
		6	89	9 (R)	11
3	<i>Beta vulgaris</i>	3	97	6 (S)	3
		6	99	3 (R)	1
4	<i>Colocasia esculenta</i>	3	92	-	8
		6	86	11 (R)	14
5	<i>Coriandrum sativum</i>	4	99	-	1
		6	94	3 (R)	6
6	<i>Dioscorea alata</i>	3	44	73 (S)	56
		6	47	83 (S)	53
7	<i>Ipomoea batatas</i>	3	95	5 (R)	5
		6	95	7 (R)	5
8	<i>Manihot esculenta</i>	3	100	8 (R)	-
		6	97	4 (R)	3
9	<i>Raphanus sativus</i>	3	99	-	-
		6	100	-	-
10	<i>Solanum tuberosum</i>	3	99	2 (S)	1
		6	90	5 (S)	10
11	<i>Zingiber officinale</i>	3	97	3 (R)	3
		6	88	4 (S)	12

t: tempo (dias); c: conversão determinada por CG;  
e.e.: excesso enantiomérico; Configuração absoluta está entre parênteses.

### 5.2.3 Oxidação do (RS)-1-(4-metilfenil)etanol (2c)

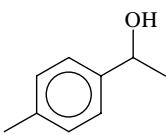
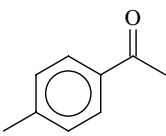
*A. schoenoprasum*, *C. sativum* e *S. tuberosum* são excelentes agentes oxidante do (RS)-1-(4-metilfenil)etanol (2c) (Figura 22), transformando-o na respectiva cetona, a 1-(4-metilfenil)etanona (1c). Com essas três plantas praticamente todo o álcool havia sido oxidado após 6 dias de reação (Tabela 18, Reações 1, 5 e 10). Já as plantas, *A. xanthorrhiza*, *C. esculenta*, *D. alata*, *I. batatas*, *M. esculenta* e *Z. officinale*, apresentaram moderada capacidade oxidante, convertendo de 30 a 69 % do substrato.



**Figura 22.** Oxidação da (RS)-1-(4-metilfenil)etanol (2c).

Em relação à enantiosseletividade desta reação, somente com o *S. tuberosum* foi obtido excesso enantiomérico satisfatório, com o qual foi obtido o álcool (*R*)-2c com 86% e.e. depois de 3 dias de reação (Tabela18, Reação 11).

**Tabela 18.** Oxidação do (*RS*)-1-(4-metilfenil)etanol (**2c**).

					
Reação	Biocatalisador	t (d)	c (%)	e.e. (%)	c (%)
1	<i>Allium schoenoprasum</i>	3	7	90 ( <i>R</i> )	93
		6	-	-	100
2	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	3	69	22 ( <i>R</i> )	31
		6	31	19 ( <i>R</i> )	69
3	<i>Beta vulgaris</i>	3	-	-	-
		6	90	10 ( <i>S</i> )	2
4	<i>Colocasia esculenta</i>	3	77	4 ( <i>R</i> )	23
		6	69	14 ( <i>R</i> )	31
5	<i>Coriandrum sativum</i>	4	13	49 ( <i>R</i> )	87
		6	-	-	100
6	<i>Dioscorea alata</i>	3	70	10 ( <i>R</i> )	30
		6	73	23 ( <i>S</i> )	27
7	<i>Ipomoea batatas</i>	3	80	26 ( <i>R</i> )	20
		6	72	38 ( <i>R</i> )	28
8	<i>Manihot esculenta</i>	3	78	27 ( <i>R</i> )	22
		6	64	15 ( <i>R</i> )	35
9	<i>Raphanus sativus</i>	3	92	-	8
		6	93	-	7
10	<i>Solanum tuberosum</i>	3	32	86 ( <i>R</i> )	68
		6	4	>98 ( <i>R</i> )	96
11	<i>Zingiber officinale</i>	3	89	-	11
		6	60	53 ( <i>R</i> )	40

t: tempo (dias); c: conversão determinada por CG; e.e.: excesso enantiomérico; Configuração absoluta está entre parênteses.

#### 5.2.4 Oxidação de (*RS*)-1-(4-nitrofenil)etanol (**2d**)

No caso busca de biocatalisadores para oxidação enantiosseletiva do (*RS*)-1-(4-nitrofenil)etanol (**2d**) (Figura 23), nenhuma planta apresentou resultados satisfatórios como agente de resolução, mas, similarmente ao ocorrido quando foi usado como substrato 1-(4-nitrofenil)etanona (Seção 5.1.4), uma inesperada reação foi observada. Além da oxidação do álcool, observamos a redução do grupo nitro ( $-\text{NO}_2$ ) em amino ( $-\text{NH}_2$ ). Desse modo *A. xanthorrhiza* e *B. vulgaris* transformaram o substrato em 1-(4-aminofenil)etanona com conversão de 86 % e 92 %, respectivamente (Tabela 19, Reações 2 e 3).

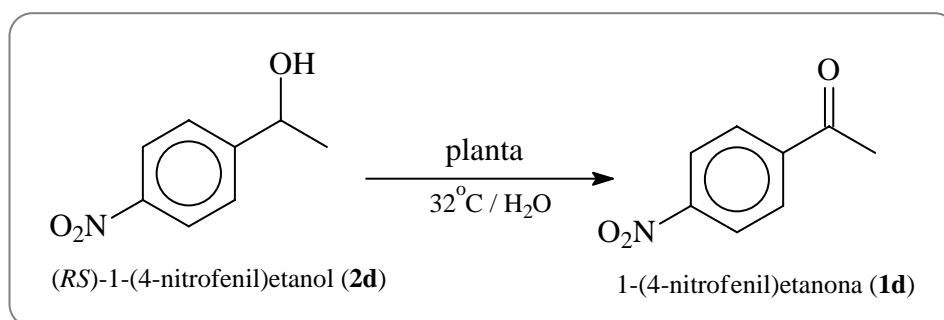


Figura 23. Oxidação do (*RS*)-1-(4-nitrofenil)etanol (**2d**).

Em vista desses resultados, foi testada a biotransformação do nitrobenzeno com *B. vulgaris*, com a qual, após 8 dias de reação, foi obtida a anilina com 52% de rendimento isolado (Figura 26). Estudos adicionais foram realizados com outros compostos nitrogenados<sup>49</sup>.

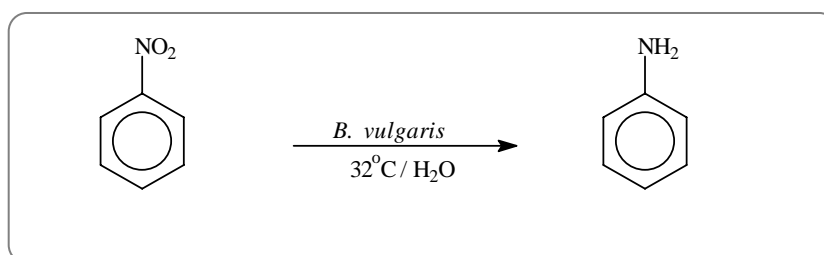
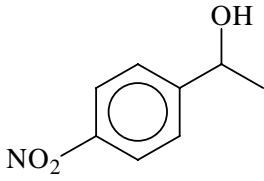
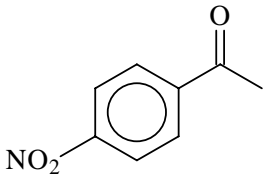


Figura 24. Redução do nitrobenzeno pela *B. vulgaris*.

**Tabela 19.** Oxidação do (*RS*)-1-(4-nitrofenil)etanol (**2d**).

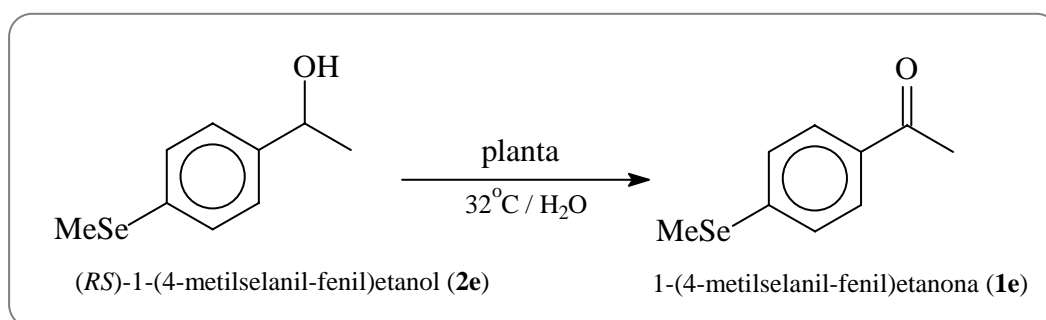
					
Reação	Biocatalisador	t (d)	c (%)	e.e. (%)	c (%)
1	<i>Allium schoenoprasum</i>	3	99	-	1
		6	99	-	1
2	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	3	67	9 ( <i>R</i> )	33 <sup>a</sup>
		6	14	18 ( <i>R</i> )	86 <sup>a</sup>
3	<i>Beta vulgaris</i>	3	77	18 ( <i>S</i> )	23 <sup>a</sup>
		6	-	-	92 <sup>a</sup>
4	<i>Colocasia esculenta</i>	3	99	-	1
		6	93	4 ( <i>R</i> )	6 <sup>a</sup>
5	<i>Coriandrum sativum</i>	4	100	-	-
		6	100	-	-
6	<i>Dioscorea alata</i>	3	97	-	2 <sup>a</sup>
		6	97	-	3 <sup>a</sup>
7	<i>Ipomoea batatas</i>	3	99	-	1
		6	99	-	1
8	<i>Manihot esculenta</i>	3	97	-	3
		6	97	-	3
9	<i>Raphanus sativus</i>	3	99	-	1 <sup>a</sup>
		6	97	-	3 <sup>a</sup>
10	<i>Solanum tuberosum</i>	3	98	-	1 <sup>a</sup>
		6	97	-	2 <sup>a</sup>
11	<i>Zingiber officinale</i>	3	99	-	1
		6	98	3 ( <i>S</i> )	1

t: tempo (dias); c: conversão determinada por CG;  
e.e.: excesso enantiomérico; Configuração absoluta está entre parênteses.  
<sup>a</sup> 4'-aminoacetofenona



### 5.2.5 Oxidação de (*RS*)-1-(4-metilselanil-fenil)etanol (**2e**)

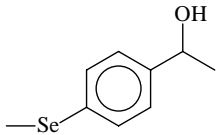
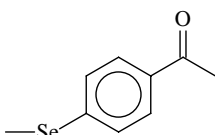
Para a oxidação enantiosseletiva do (*RS*)-1-(4-metilselanil-fenil)etanol (**2e**) (Figura 25), os melhores biocatalisadores são: *A. schoenoprasum*, *B. vulgaris*, *C. sativum* (Tabela 20, Reações 1, 3 e 5). Com a *B. vulgaris* e o *C. sativum* obteve-se, depois de 3 dias de reação, o (*R*)-**2e** com 79 e 77% e.e., respectivamente (Tabela 20, Reações 3 e 6). Observe que com *C. sativum* houve, durante os 3 primeiros dias, uma oxidação enantiosseletiva, caracterizando uma resolução cinética e, aos 6 dias, todo o álcool havia sido transformado na respectiva cetona. Já com a *A. schoenoprasum* obteve-se, após 6 dias de reação, o (*S*)-**2e** com 76% e.e.



**Figura 25.** Oxidação do (*RS*)-1-(4-metilselanil-fenil)etanol (**2e**).

O *Z. officinale* mostrou ser um excelente agente oxidante, tendo em vista a oxidação quantitativa do álcool em questão (Tabela 20, Reação 12).

**Tabela 20.** Oxidação do (RS)-1-(4-metilselanil-fenil)etanol (**2e**).

						
Reação	Biocatalisador	t (d)	c (%)	e.e. (%)	c (%)	
1	<i>Allium schoenoprasum</i>	3	85	11 (R)	15	
		6	12	76 (S)	88	
2	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	3	79	25 (R)	21	
		6	60	53 (R)	40	
3	<i>Beta vulgaris</i>	3	55	79 (R)	45	
		6	56	76 (R)	44	
4	<i>Colocasia esculenta</i>	3	96	4 (R)	4	
		6	95	4 (R)	5	
5	<i>Coriandrum sativum</i>	4	54	77 (R)	46	
		6	1	-	99	
6	<i>Dioscorea alata</i>	3	91	12 (R)	9	
		6	92	15 (R)	8	
7	<i>Ipomoea batatas</i>	3	94	10 (R)	6	
		6	89	14 (R)	11	
8	<i>Manihot esculenta</i>	3	68	19 (R)	32	
		6	58	23 (R)	42	
10	<i>Raphanus sativus</i>	3	100	7 (R)	-	
		6	99	8 (R)	1	
11	<i>Solanum tuberosum</i>	3	99	7 (R)	1	
		6	95	9 (R)	5	
12	<i>Zingiber officinale</i>	3	97	8 (R)	3	
		6	-	-	100	

t: tempo (dias); c: conversão determinada por CG;  
e.e.: excesso enantiomérico; Configuração absoluta está entre parênteses.

### 5.3 Reações em escala preparativa

Em vista dos bons resultados para alguns substratos e plantas em reações de biorredução enantiosseletiva de acetofenonas e oxidação enantiosseletiva de feniletanóis, decidimos avaliar dois biocatalisadores em reações com escala preparativa. As reações escolhidas foram a redução da acetofenona com *A. xanthorrhiza* e a oxidação do (*RS*)-1-(4-metilfenil)etanol (**2c**) com *C. sativum*. Para isso, foram utilizadas 1 g de substrato, 200 g de planta e 800 mL de água destilada. Os produtos dessas reações foram isolados e purificados fornecendo os seguintes resultados:

- **Biorredução** da cetona **1a** usando *A. xanthorrhiza* (Figura 26): Produto (*S*)-**2a** (Rendimento: 43%, 470 mg),  $[\alpha]_D^{25} = -58,7^\circ$  (c 3,1; CHCl<sub>3</sub>), e.e. >99%). **1a** recuperado: 46% (434 mg).

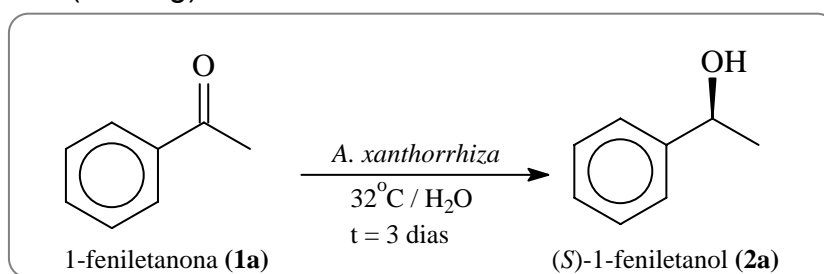
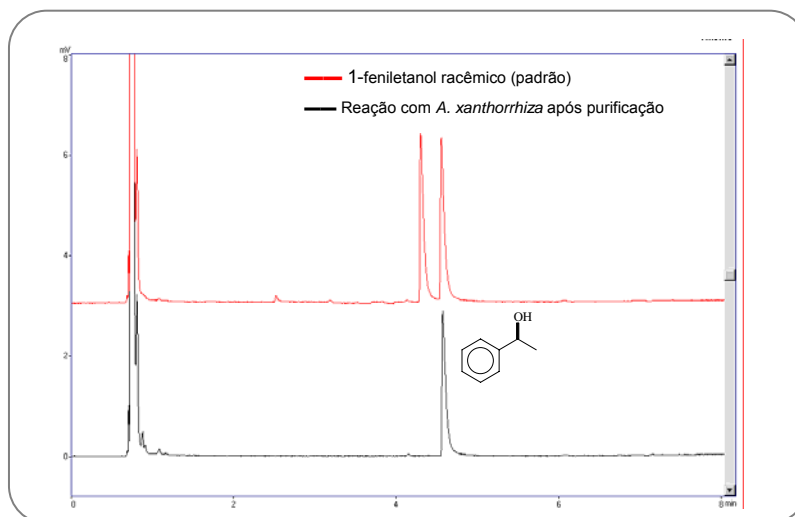


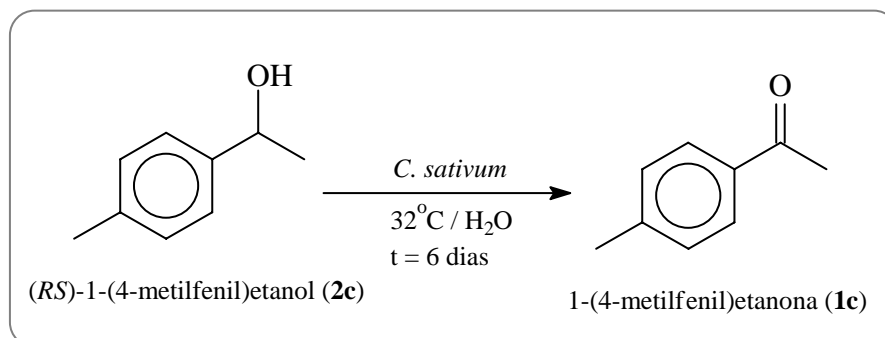
Figura 26. Redução da 1-feniletanona (**1a**) em escala preparativa.

Na Figura 27, apresentamos o cromatograma dessa reação. Observe que a *A. xanthorrhiza* é um bom redutor enantiosseletivo da acetofenona, pois foi possível obter o álcool (*S*)-(-)-1-feniletanol (**2a**) com excelente excesso enantiomérico (maior que 99%) e com bom rendimento isolado (43%).



**Figura 27.** Cromatograma da reação do 1-feniletanona (**1a**) com *A. xanthorrhiza*.

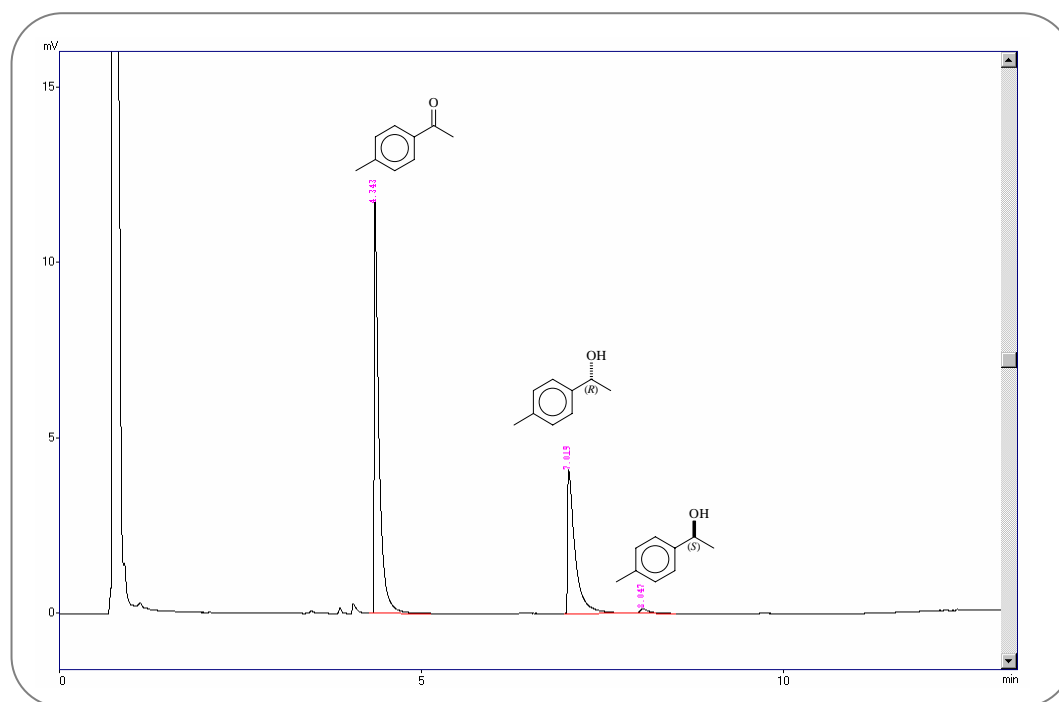
- **Bio-oxidação** do álcool (*RS*)-**2c** usando *C. sativum* (Figura 28): composto (*R*)-**2c** (34%, 346 mg),  $[\alpha]_D^{25} = +35,6^\circ$  (c 3,6; CHC l<sub>3</sub>), e.e. 64%), composto **1c**: 26% (257 mg).



**Figura 28.** Oxidação do (*RS*)-1-(4-metilfenil)etanol (**2c**) em escala preparativa.

A seguir, na Figura 29, está o cromatograma da reação do (*RS*)-1-(4-metilfenil)etanol (**2c**) com *C. sativum*, que mostrou ser um melhor agente oxidante do que um agente de resolução cinética. O álcool recuperado apresentou somente 64 % de excesso enantiomérico. Conforme observado durante a triagem, esperava-se a oxidação completa deste álcool, no entanto, essa reação apresentou rendimento isolado de 26 % de cetona. Talvez isso se deve à possível inibição

enzimática causada pela adição de grande quantidade do composto orgânico usado como reagente.



**Figura 29.** Cromatograma da reação de oxidação do (RS)-1-(4-metilfenil)etanol (2c) com *C. sativum*.

## **CAPÍTULO 6 – REAÇÕES DE ÓXIDO-REDUÇÃO USANDO PLANTAS COMESTÍVEIS - CONCLUSÕES**

O uso de plantas é uma boa ferramenta não só para a química auto-sustentável, mas também para a química economicamente viável, pois faz uso de procedimento experimental seguro e com baixo custo.

As plantas podem ser usadas para a redução enantiosseletiva de cetonas pró-quirais, possibilitando a obtenção de álcoois enantiomericamente puros tanto de configuração (*R*) quanto de configuração (*S*).

As plantas podem ser usadas como agentes oxidantes durante a resolução cinética de álcoois secundários.

A bio-oxidação quantitativa observada com os álcoois 1-(4-metilfenil)etanol e 1-(4-(metilselanil)fenil)etanol nos fornece um protocolo ambientalmente amigável para reações de oxidação.

De modo a transformar-se numa ferramenta sintética útil para outros compostos químicos, torna-se necessário estudos adicionais, como por exemplo, determinação das condições ótimas de pH e tempo de reação.

## CAPÍTULO 7 – PARTE EXPERIMENTAL

### 7.1 BIORRECICLAGEM DE HEXANO

#### 7.1.1 Materiais e Métodos

Nesta parte do trabalho foram usados os seguintes microrganismos e enzimas:

- **Fungos:** Os fungos foram adquiridos da Fundação Tropical André Tosello – Campinas – SP ou da Coleção de Culturas de Fungos do Instituto de Botânica – São Paulo – SP. Neste laboratório (Laboratório de Química Fina e Biocatálise - IQ/USP) as cepas são conservadas em tubos de ensaio contendo ágar (20 g/L) e extrato de malte (20 g/L) sob refrigeração (4°C).

*Aspergillus terreus* SSP 1498

*Aspergillus niger* SSP 1078

*Emericella nidulans* CCT 3119

*Rhizopus oryzae* CCT 4964

- **Enzimas:** As enzimas foram doadas pela empresa NOVOZYMES (<http://www.novozymes.com.br/>), filial localizada em Araucária/PR, exceto a PPL adquirida da empresa Sigma-Aldrich.

**Lipolase 100T** (lipase do *Humicola lanuginosa*, imobilizada)

**Lipozyme RM IM** (lipase do *Rhizomucor miehei*, imobilizada)

**Lipozyme TL IM** (lipase do *Thermomyces lanuginosus*, imobilizada)

**Novozyme 435** (CAL-B, lipase B da *Cândida antarctica*, imobilizada)

**Novozyme 735** (CAL-A, lipase A da *Candida antarctica*, imobilizada)

**Novozyme CALB-L** (lipase B da *Candida Antarctica*)

**PPL** (lipase do pâncreas de porco, extrato bruto, Tipo II)

A mistura de acetato de etila e hexano foi coletada em nosso laboratório após seu uso na purificação de compostos em coluna cromatográfica de sílica gel.

Os solventes puros, usados como padrão, foram adquiridos da Synth.

As análises de cromatografia gasosa foram realizadas em um Cromatógrafo a Gás (CG) CG-17A da Shimadzu com detector por Ionização em Chama (DIC ou FID), equipado com coluna J & W Scientific DB-624 (30m x 0,53 mm) usando hidrogênio como gás de arraste.

As reações de hidrólise usando microrganismos foram realizadas em reator tipo batelada, encamisado, com capacidade de 10 L da QVF-Engineering GMBH, PILOTEC-TEC MINIPLANT com agitador mecânico do tipo pá equipado com termostato da LAUDA RK8 KP 2000.

As medições dos valores de pH foram feitas usando pHmetro Quimis Q400A.

As reações de hidrólise em processo contínuo foram feitas em reator tubular encamisado de fabricação própria. As bombas peristálticas modelo IPC 4 vias da marca ISMATEC. O termostato usado foi da marca Büchi modelo B-490.



### 7.1.2 Preparação dos meios de cultura<sup>50</sup>

O crescimento dos microrganismos foi feito em duas etapas e foram usados dois meios de cultura, nomeados A e B.

**Meio de cultura A:** Em um Erlenmeyer de 500 mL adicionou-se água destilada (200 mL), dextrose (4 g) e peptona (2 g). Em seguida, a mistura foi esterilizada (120 °C; 15 min). Esse meio foi usado durante o crescimento do fungo em agitador orbital.

**Meio de cultura B:** Em um Erlenmeyer de 4 L adicionou-se água destilada (3L) e batata (*S. tuberosum* L.) (600 g). Foi realizado o cozimento durante uma hora. Em seguida, a mistura foi filtrada e adicionou-se açúcar (60 g) seguido de esterilização em autoclave (120 °C; 15 min). Esse meio foi usado durante o crescimento do fungo no reator.

### 7.1.3 Procedimento das reações de hidrólise com microrganismos

Inicialmente, o fungo apropriado foi inoculado em dois Erlenmeyers de 500 mL contendo meio de cultura **A** (200 mL), seguido de incubação em agitador orbital a 160 rpm e a 32 °C durante 48h. Passado esse período, o inóculo foi transferido ao reator contendo o meio de cultura **B** (3 L). O reator foi mantido a 100 rpm e a 32 °C durante 48 h. Após esse período, o pH (valor inicial 5,6) do meio foi corrigido adicionando-se solução aquosa de NaOH 1N (correção do pH conforme indicada no texto). Em seguida, 600 mL da mistura hexano-acetato de etila (concentração de AcOEt conforme indicada no texto) foi adicionada ao reator. A

partir desse momento, o reator foi mantido a 160 rpm e a 32 °C. A reação foi monitorada via cromatografia gasosa.

#### **7.1.4 Procedimento das reações de hidrólise usando enzimas isoladas**

Em um Erlenmeyer de 250 mL contendo água destilada (50 mL) ou solução tampão (50 mL) foram adicionadas a mistura hexano-acetato de etila (50 mL) e a enzima apropriada [3 g (sólido) ou 3 mL (líquido)]. O Erlenmeyer foi devidamente vedado e mantido em agitador orbital (160 rpm, 32 °C) durante 48 h. As alíquotas (1 mL) foram retiradas após 24 e 48 h de reação e analisadas via cromatografia gasosa.

#### **7.1.5 Métodos para análise no cromatógrafo a gás**

Para as análises cromatográficas, as amostras (100 µL) foram diluídas em tolueno (500 µL) a fim de minimizar os erros sistemáticos.

**Gás de arraste:** Hidrogênio, 16 kPa.

**Coluna:** J & W Scientific DB-624 (30 m x 0,53 mm)

#### **Temperatura:**

Injetor: 220 °C.

Detector: 220 °C.

Coluna: isoterma a 40 °C, 8 min; 20 °C/min até 180 °C.

### **7.1.6 Quantificação das proteínas totais<sup>18</sup>**

A quantificação de proteínas totais foi feita usando o método de Bradford, com albumina de soro bovino como padrão.

A leitura da absorbância foi feita em um espectrofotômetro HITACHI U-2010 ROM v 2550 02.

#### **7.1.6.1 Crescimento dos fungos**

O fungo *A. terreus* SSP 1498 foi incubado em dois frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL do meio de cultura A (Seção 7.1.2). Este crescimento foi realizado em um agitador orbital (160 rpm, 32 °C, 48 h). Depois de 48 h de incubação, este inóculo e o meio de cultura B (3 L), foram acrescentados ao reator e mantido por um período de incubação extra (60 h, 32 °C, 100 rpm).

O filtrado da cultura e as células úmidas foram usados como fonte de enzima para determinar a quantidade de proteínas e a respectiva atividade enzimática.

#### **7.1.6.2 Preparação do Homogeneizado de células**

No caso das células úmidas, foi realizada a sua homogeneização. Células úmidas (3,0 g) acrescido de solução tampão de extração (27 mL) foram processadas em um aparelho tipo Potter, sempre resfriado com gelo. Em seguida, o homogeneizado foi levado para a centrifugação (10000 rpm, 8 min, 5 °C). O sobrenadante foi usado como fonte de enzima.

Solução Tampão de Extração:

- Tampão fosfato 20 mM;
- 0,1%w Triton-X;

- 150 mM NaCl;
- pH = 7,4.

### 7.1.6.3 Curva-padrão usando albumina

Para traçar a curva padrão foram utilizados os seguintes volumes.

**Tabela 21.** Volumes usados para traçar a curva-padrão para quantificação de proteínas.

Volume ( $\mu\text{L}$ )		
Albumina (0,1 mg/mL)	Água	Reagente de Bradford
0	800	200
20	780	200
40	760	200
60	740	200
80	720	200
100	700	200

Para a quantificação das proteínas do filtrado foram misturados, 700  $\mu\text{L}$  de água destilada, 200  $\mu\text{L}$  de Reagente de Bradford e 100  $\mu\text{L}$  de filtrado.

Para a quantificação das proteínas do homogeneizado foram misturados 795  $\mu\text{L}$  de água destilada, 200  $\mu\text{L}$  de Reagente de Bradford e 5  $\mu\text{L}$  de homogeneizado.

O padrão e as amostras foram deixados em local isento de iluminação por 5 minutos. Após esse tempo, foi feita a leitura da absorbância a 595 nm.

### **7.1.7 Determinação da atividade enzimática de lipase**

A atividade enzimática foi determinada por titulometria conforme descrito por Kamimura *et al*<sup>19</sup>.

A mistura reacional consiste de 5 mL de emulsão azeite de oliva/goma arábica (25% azeite de oliva e 75% goma arábica) e 2 mL de solução tampão fosfato 10 mM, pH = 7,0. Essa mistura foi emulsionada mecanicamente por 3 min. A reação foi iniciada adicionando-se 1 mL de filtrado enzimático (seção 7.1.6.1) ou células homogeneizadas (seção 7.1.6.2) e mantida em agitador orbital durante 30 min a 37 °C e a 200 rpm. Após esse período, a reação foi parada adicionando 15 mL de solução acetona:etanol (1:1) e a quantidade de ácidos graxos produzidos foi determinada por titulação que foi realizada com solução NaOH 0,05N usando como indicador 4 gotas de solução de timolftaleína da Sigma Diagnostics (0,9% timolftaleína em etanol)

## 7.2 REAÇÕES DE ÓXIDO-REDUÇÃO USANDO PLANTAS COMESTÍVEIS

### 7.2.1 Materiais e Métodos

Os reagentes: 1-feniletanona e 1-(4-nitrofenil)etanona foram adquiridos da Merck. Selênio, 1-(4-bromofenil)etanona, 1-(4-metilfenil)etanona e o padrão 1-(4-aminofenil)etanona foram adquiridos da Aldrich.

Todas as vidrarias e a água destilada utilizada nas reações de biocatálise foram devidamente esterilizadas em autoclave a 120 °C durante 15 min. Após essa etapa, toda manipulação das plantas foi realizada em capela de fluxo laminar devidamente esterilizada.

As análises de cromatografia gasosa foram realizadas em um Cromatógrafo a Gás (CG) CG-17A da Shimadzu com detector por Ionização em Chama (DIC ou FID), equipado com coluna quiral  $\beta$ -ciclodextrina Chirasil-DEX CB 25 m (Varian) e usando hidrogênio como gás de arraste (Pressão = 100kPa).

Os espectros de massas foram obtidos num espectrômetro Shimadzu GC-MS (Cromatógrafo a Gás acoplado ao espectrômetro de massas) QP5050A (70 eV) usando coluna J & W Scientific DB-5 (30m x 0,25mm).

Os valores de rotação óptica foram determinados usando um polarímetro JASCO DIP-370 com lâmpada de mercúrio (546 – 578 nm).

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram feitas em placas de sílica-gel (Folha de alumínio, sílica-gel 60 F254 Merck, 0,25mm).

As cromatografias em coluna foram feitas usando sílica gel (Merck 60, 230 – 400 mesh).

### 7.2.2 Plantas usadas como fonte de enzimas

As plantas foram adquiridas em “feiras-livres” do município de São Paulo de modo a assegurar que fossem recém colhidas e saudáveis.

**Tabela 22.** Nome das plantas usadas nas reações de óxido-redução.

Nome científico	Nome popular
<i>Allium schoenoprasum</i> L.	cebolinha
<i>Arctium lappa</i> L.	bardana
<i>Arracacia xanthorrhiza</i> B.	mandioquinha
<i>Beta vulgaris</i> L.	beterraba
<i>Brassica rapa</i> L.	nabo redondo
<i>Colocasia esculenta</i> (L.) S.	inhame
<i>Coriandrum sativum</i> L.	coentro
<i>Dioscorea alata</i> L.	cará
<i>Ipomoea batatas</i> Lam.	batata doce rosada
<i>Manihot esculenta</i> C.	mandioca
<i>Polymnia sonchifolia</i>	yakon
<i>Raphanus sativus</i> L.	nabo japonês
<i>Solanum tuberosum</i> L.	batata inglesa
<i>Zingiber officinale</i> R.	gingibre

### 7.2.3 Preparação dos substratos

Todas as cetonas foram adquiridas da Merck ou da Aldrich, exceto a 1-(4-metilselanil-fenil)etanona, a qual foi sintetizada em cooperação com o Dr. Álvaro Takeo Omori<sup>48</sup>.

### 7.2.3.1 Preparação da 1-(4-metilselanil-fenil)etanona (**1e**)

A síntese da cetona (**1e**) envolveu as etapas descritas na Figura 30.

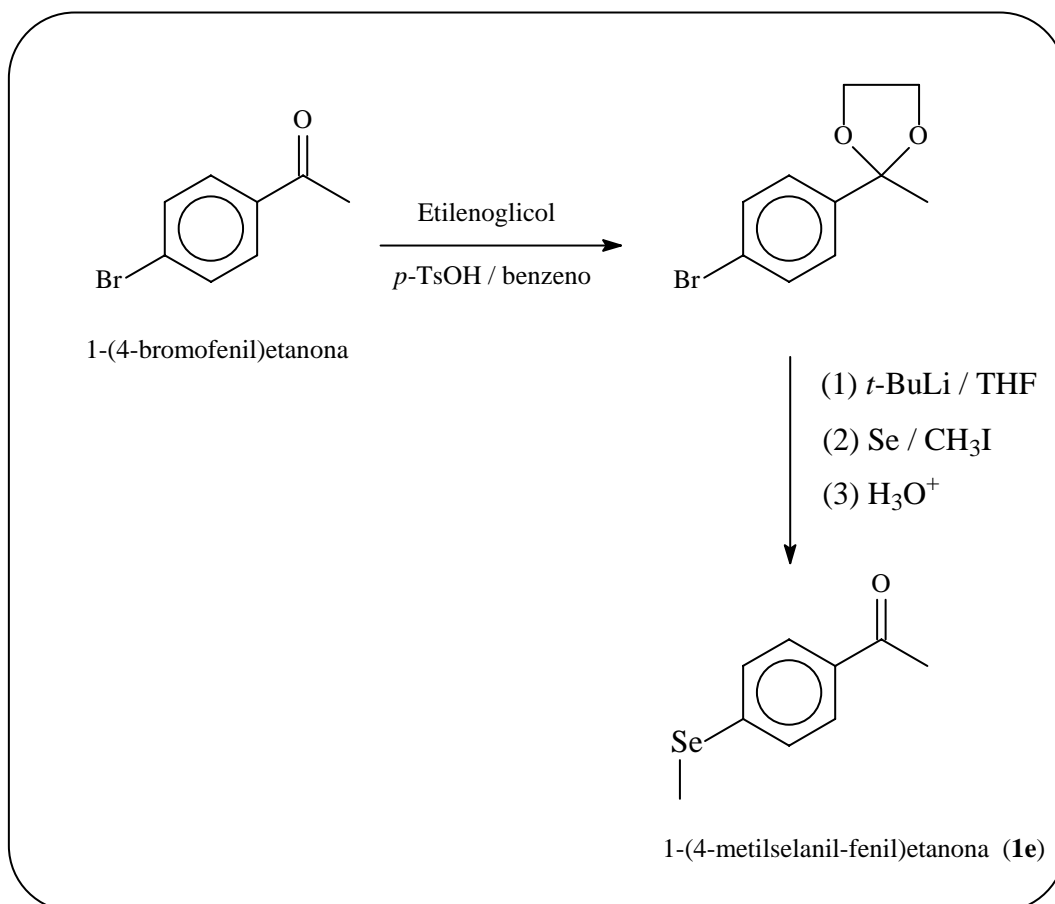


Figura 30. Síntese da 1-(4-metilselanil-fenil)etanona (**1e**).

#### (A) Preparação do 2-(4-bromofenil)-2-metil-1,3-dioxolano<sup>51</sup>

Em um balão de 100 mL sob agitação magnética foram adicionados a *p*-bromoacetofenona (10 mmol), etilenoglicol em excesso (40 mmol), benzeno (50 mL) e ácido *p*-tolueno sulfônico (10 mg). O sistema foi acoplado a um Dean-Stark e refluxado até que não fosse mais observada a formação de água (5h). O solvente foi evaporado e o produto bruto foi solubilizado em diclorometano (20 mL) e lavado com solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi separada, seca com MgSO<sub>4</sub>, o solvente foi evaporado no rotaevaporador. Após identificação do produto obtido por



Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear,<sup>48</sup> o óleo obtido foi utilizado diretamente na reação seguinte.

### **(B) Preparação da cetona<sup>52</sup>**

Em um balão de duas bocas de 100 mL sob atmosfera inerte (N<sub>2</sub>) e a -78 °C foram adicionados o bromoacetal (10 mmol; 2,43 g) e THF seco (50mL). Em seguida foi adicionado, gota a gota, *t*-BuLi (10,5 mmol; 11 mL de uma solução 0,92M em *n*-hexano). A temperatura da reação foi elevada a 0 °C e o sistema foi agitado por mais 30 minutos. Após adição de selênio (12,5 mmol; 988 mg), o sistema foi mantido sob agitação por mais 3 horas a 25°C. Após esse tempo, iodometano (20 mmol; 2,84 g) foi adicionado, mantendo a agitação por mais 10 minutos. No fim, a reação foi lavada com solução aquosa saturada de cloreto de amônio (10 mL) e de cloreto de sódio (10 mL). A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 15 mL). As fases orgânicas foram combinadas e secas com MgSO<sub>4</sub>. O solvente foi evaporado em rotaevaporador. O produto bruto obtido foi hidrolisado com uma mistura de ácido clorídrico 1 M (15 mL) e acetona (35 mL) num balão de 100 mL sob refluxo por uma hora. Após a evaporação da acetona, o produto foi extraído com diclorometano (3 x 20 mL). As fases orgânicas foram combinadas e secas com MgSO<sub>4</sub>. O solvente foi evaporado em rotaevaporador e o produto foi isolado após cromatografia em coluna com sílica gel usando uma mistura de hexano/acetato de etila (95:5) como eluente. O produto obtido foi identificado por Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear<sup>48</sup>.

### 7.2.3.2 Preparação dos alcoóis racêmicos

Todos os álcoois racêmicos, 1-feniletanol, 1-(4-bromofenil)etanol, 1-(4-metilfenil)etanol, 1-(4-nitrofenil)etanol e 1-(4-metilselanil-fenil)etanol, foram obtidos a partir da redução das respectivas cetonas com boroidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ).

#### **Procedimento geral**<sup>48</sup>

Num balão de 250 mL, foram adicionados metanol (50mL) e a respectiva cetona **1a-e** (10 mmol). O boroidreto de sódio (11 mmol) foi adicionado a essa solução, em pequenas porções, à temperatura ambiente e sob agitação magnética. Após 2h, solução aquosa de HCl (0,1N) foi adicionado à mistura. O excesso de metanol foi evaporado em um rotaevaporador e em seguida, ao produto bruto foi adicionada solução aquosa saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (50ml). Extraíu-se a mistura com acetato de etila (3 x 50 mL). As fases orgânicas foram combinadas e secas com  $\text{MgSO}_4$ . O solvente foi evaporado em rotaevaporador e o produto foi purificado por cromatografia em coluna com sílica gel usando mistura adequada de hexano e acetato de etila como eluente.

Os produtos foram identificados por Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear<sup>48</sup>.

### 7.2.4 Procedimento para as reações com as plantas

Após uma pré-lavagem com água, a planta foi mantida submersa em solução aquosa de hipoclorito de sódio (5%) durante 20 minutos. Em seguida, a planta foi lavada com etanol e a sua manipulação seguiu em uma capela de fluxo laminar. Para aumentar o contato entre o biocatalizador e o substrato, a casca da planta foi removida e o restante foi cortado em fatias. A um Erlenmeyer de 250 mL foi

adicionado a planta fatiada (20 g), a água destilada (80 mL) e por fim o substrato (100 mg) previamente solubilizado em DMF (Dimetilformamida, 1 mL). Essa mistura foi levada a um agitador rotativo (160 rpm, 32 °C). Após 3 e 6 dias, foram coletadas pequenas alíquotas (1 a 2 mL) e os produtos extraídos com acetato de etila (0,5 mL) em tubos para centrifuga. Os tubos foram agitados em agitador de tubos e centrifugados (5 min., 6000 rpm, temperatura ambiente). A fase orgânica foi levada para análise em cromatografia gasosa.

A utilização dos vegetais em pedaços facilita o *work up*, filtração e extração do produto, além disso, o uso na forma “ralada” a fim de aumentar a superfície de contato do biocatalizador com o substrato não apresentou aumento significativo da atividade enzimática<sup>48</sup>.

#### **7.2.5 Reações em escala preparativa**

A planta em pedaços (200 g), água destilada (800 mL) e a 1-feniletanona (1 g) ou o (*RS*)-1-(4-metilfenil)etanol (1 g) foram adicionados num Erlenmeyer de 2 L e mantidos em um agitador orbital a 160 rpm e 32 °C. Depois do tempo de reação apropriado (3 – 6 dias), a mistura foi filtrada e a suspensão foi lavada com acetato de etila (100 mL). A fase aquosa foi submetida a uma extração com acetato de etila (5 x 100 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO<sub>4</sub>. O solvente foi removido no rotaevaporador e o resíduo foi purificado em coluna cromatográfica com sílica gel e usando uma mistura de hexano e acetato de etila (4:1) como eluente.

## 7.2.6 Métodos para as análises no cromatógrafo a gás

**Gás de arraste:** Hidrogênio, 100 kPa.

**Coluna quiral:** Chirasil-Dex CB β-ciclodextrina (25m x 0,25mm).

**Injetor:** 220 °C

**Detector:** 220 °C

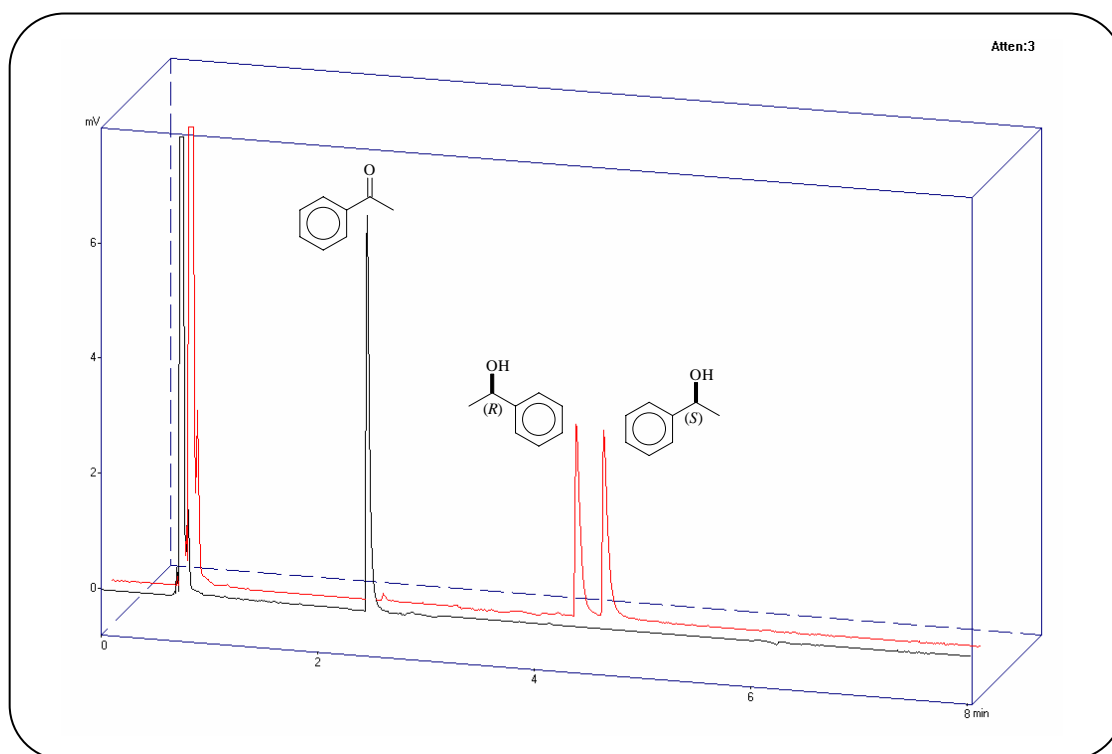
**MÉTODO 1:** Este método foi empregado para a identificação dos compostos (*RS*)-1-feniletanol e 1-feniletanona (Figura 31).

**Temperatura da coluna:** 110°C, 3 °C/min até 180 °C.

**Tempos de retenção:** 1-feniletanona = 2,45 min

(*R*)-1-feniletanol = 4,56 min

(*S*)-1-feniletanol = 4,82 min



**Figura 31.** Cromatogramas do (*RS*)-1-feniletanol (**2a**) e 1-feniletanona (**1a**).

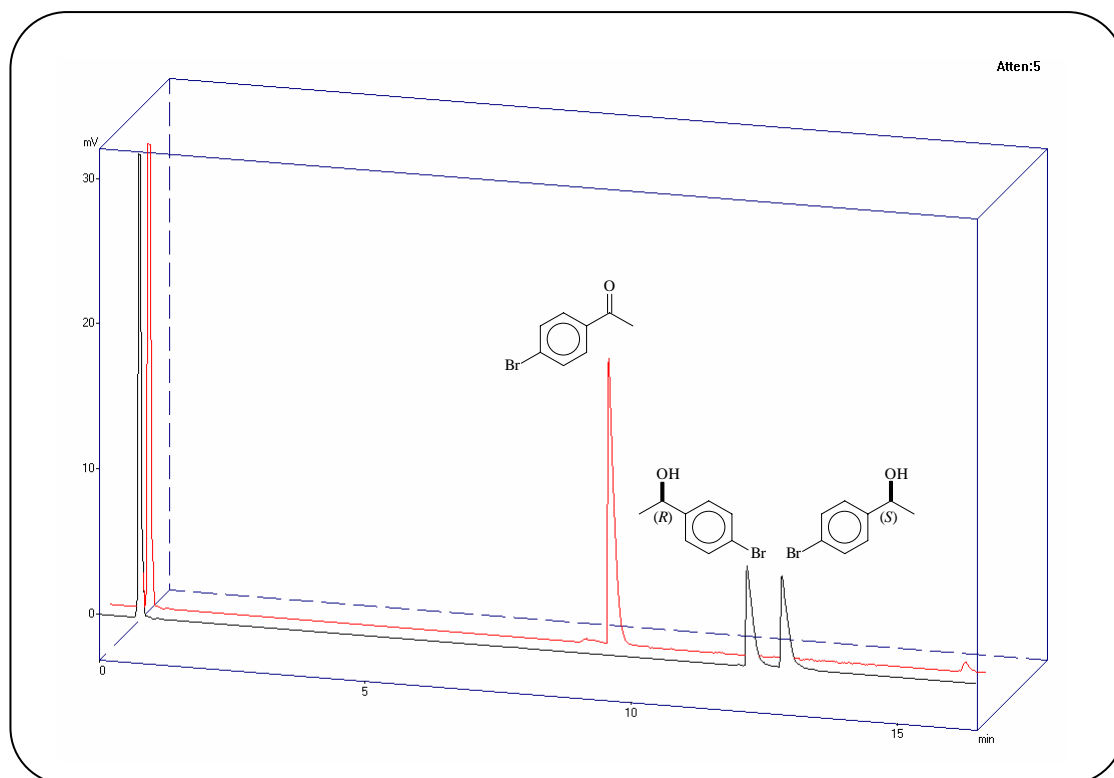
**MÉTODO 2:** Este método foi empregado para a identificação dos compostos (*RS*)-1-(4-bromofenil)etanol e 1-(4-bromofenil)etanona (Figura 32).

**Temperatura da coluna:** 110 °C, 3 °C/min até 180°C.

**Tempos de retenção:** 1-(4-bromofenil)etanona = 9,38 min

(*R*)-1-(4-bromofenil)etanol = 12,64 min

(*S*)-1-(4-bromofenil)etanol = 13,30 min



**Figura 32.** Cromatogramas do (*RS*)-1-(4-bromofenil)etanol (**2b**) e 1-(4-bromofenil)etanona (**1b**).

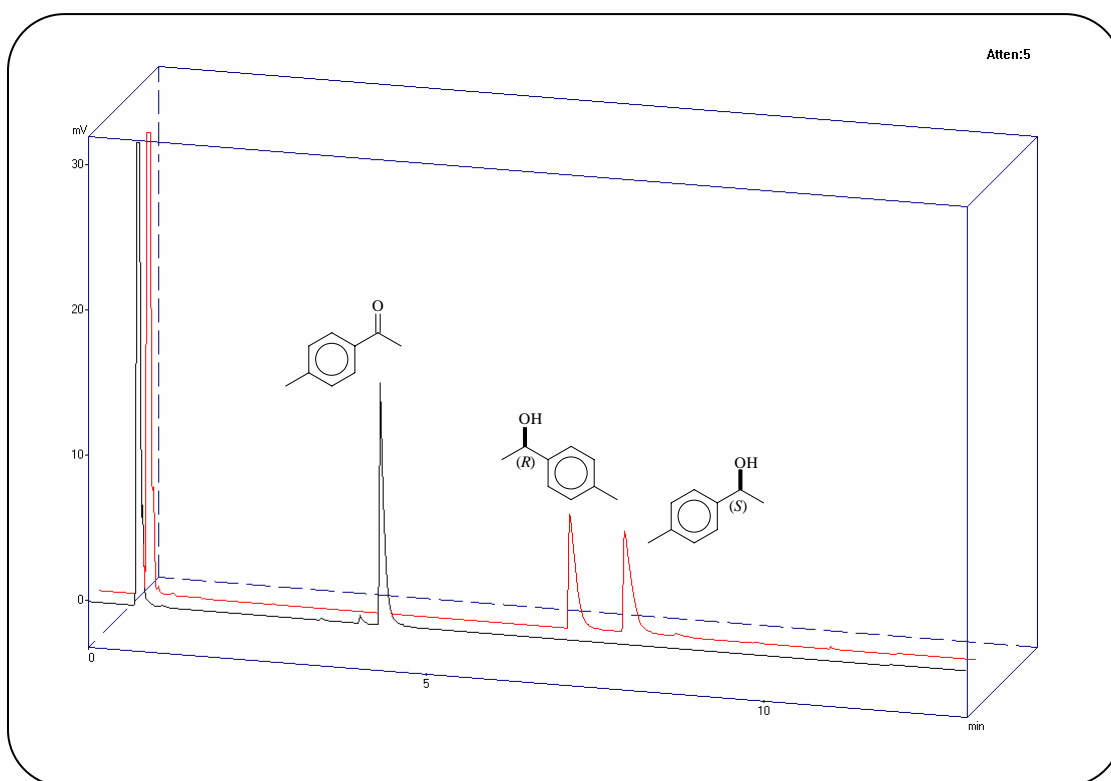
**MÉTODO 3:** Este método foi empregado para a identificação dos compostos (*RS*)-1-(4-metilfenil)etanol e 1-(4-metilfenil)etanona (Figura 33).

**Temperatura da coluna:** 110 °C, 1 °C/min até 180 °C.

**Tempos de retenção:** 1-(4-metilfenil)etanona = 4,31 min

(*R*)-1-(4-metilfenil)etanol = 7,45 min

(*S*)-1-(4-metilfenil)etanol = 8,31 min



**Figura 33.** Cromatogramas dos (*RS*)-1-(4-metilfenil)etanol (**2c**) e 1-(4-metilfenil)etanona (**2c**).

**MÉTODO 4:** Este método foi empregado para a identificação dos compostos (*RS*)-1-(4-nitrofenil)etanol, 1-(4-nitrofenil)etanona e 1-(4-aminofenil)etanona (Figura 34).

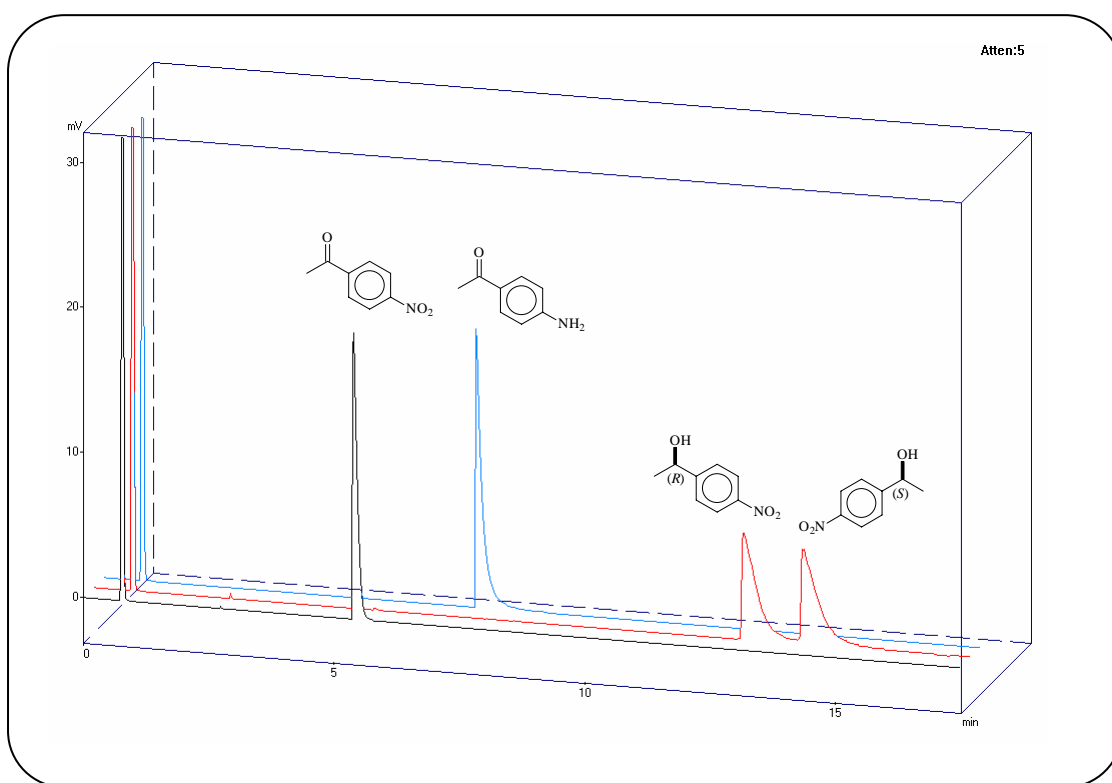
**Temperatura da coluna:** 150 °C, 1 °C/min até 180 °C.

**Tempos de retenção:** 1-(4-nitrofenil)etanona = 5,38 min

(*R*)-1-(4-nitrofenil)etanol = 12,94 min

(*S*)-1-(4-nitrofenil)etanol = 14,13 min

1-(4-aminofenil)etanona = 7,43 min

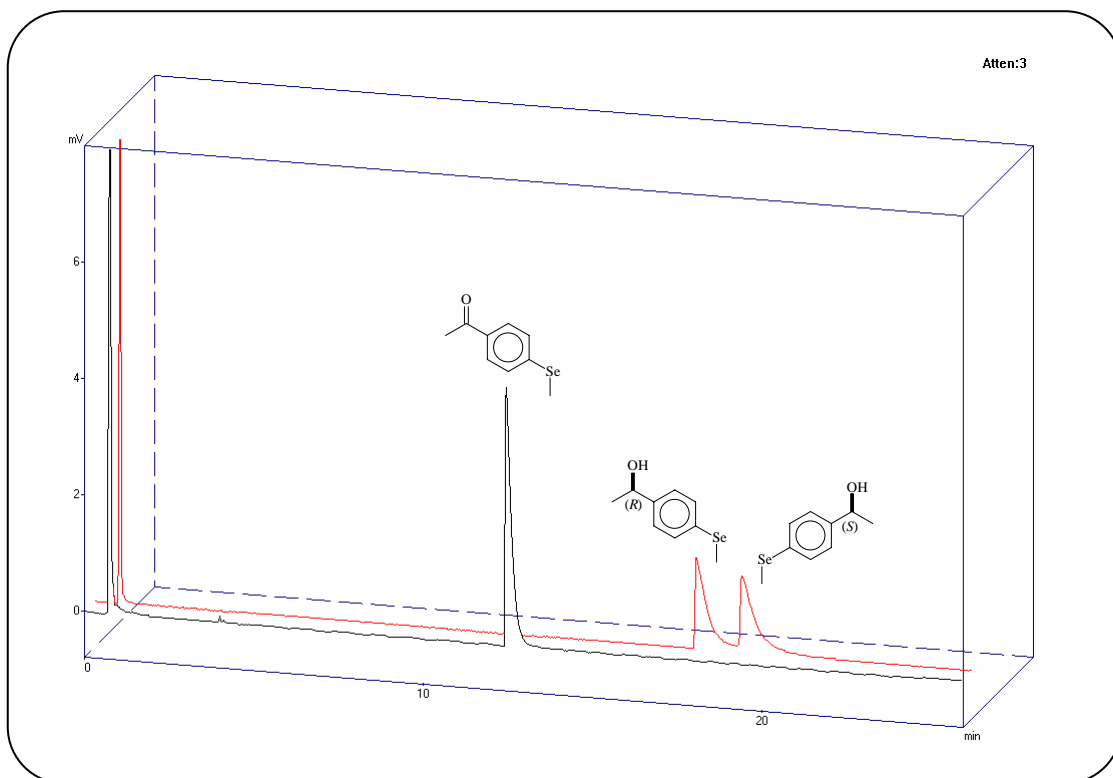


**Figura 34.** Cromatogramas do (*RS*)-1-(4-nitrofenil)etanol (**2d**), 1-(4-nitrofenil)etanona (**1d**) e da 1-(4-aminofenil)etanona.

**MÉTODO 5:** Este método foi empregado para a identificação dos compostos (*RS*)-1-(4-(metilselanil)fenil)etanol e 1-(4-(metilselanil-fenil)etanona (Figura 35).

**Temperatura da coluna:** isoterma a 140 °C, 25 min de espera, 20 °C/min até 180 °C.

**Tempos de retenção:** 1-(4-(metilselanil-fenil)etanona = 11,95 min  
(*R*)-1-(4-(metilselanil-fenil)etanol = 18,22 min  
(*S*)-1-(4-(metilselanil-fenil)etanol = 19,94 min



**Figura 35.** Cromatogramas do (*RS*)-1-(4-(metilselanil-fenil)etanol (**2e**) e 1-(4-(metilselanil-fenil)etanona (**1e**).



### 7.2.7 Atribuição da configuração absoluta dos alcoóis.

As configurações absolutas dos produtos das reações biocatalisadas foram atribuídas por correlação através dos picos dos cromatogramas com padrões enantiomericamente puros de: (S)-1-feniletanol, (S)-1-(4-bromofenil)etanol, (S)-1-(4-metilfenil)etanol, (S)-1-(4-nitrofenil)etanol e (S)-1-(4-metilselanil-fenil)etanol.

As configurações absolutas dos padrões foram atribuídas comparando-se valores de rotação óptica dos produtos obtidos com os valores da literatura<sup>48,53, 54, 55,</sup>

56.

## SÚMULA CURRICULAR

### DADOS PESSOAIS

Nome: Roberto Susumu Utsunomiya

Local de nascimento: Santópolis do Aguapeí – SP – Brasil

Data de nascimento: 10.06.1978

### EDUCAÇÃO

Ensino Médio: EEPSG Fernão Dias Pais, São Paulo - SP, 1996

Graduação: Escola Politécnica (USP), São Paulo – SP, 2003

### OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado 2005/2006, CNPq.

### PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

1. 2º Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos nas Universidades, UFSM, Santa Maria – RS – Novembro de 2004. *Trabalho apresentado:* Biodegradation of ethyl acetate present in laboratory wastes (ethyl acetate-hexanes).
2. Biocatálisis y Biotransformaciones 2004, 1er Encuentro Regional, Montevideo – Uruguai – Dezembro de 2004. *Trabalho apresentado:* Redução de nitrocompostos aromáticos em aminas por nitrorreductases de *Arracacia xanthorrhiza*.

### PUBLICAÇÕES

1. Leandro H. Andrade, Patrícia B. Di Vitta, Roberto S. Utsunomiya, Iracema H. Schoenlein-Crusius, André L. M. Porto, João V. Comasseto, *Applied Catalysis B: Environmental* **2005**, 59, 201-207.
2. Leandro H. Andrade , Roberto S. Utsunomiya, Alvaro T. Omori, André L. M. Porto, João V. Comasseto, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, 38, 84–90.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 
- <sup>1</sup> Dupas, G. *O Mito do Progresso*, Ed. UNESP, **2006**;
- <sup>2</sup> Zulauf, W.E. *Estudos Avançados* **2000**, 39, 14.
- <sup>3</sup> Mishra, B.K.; Arora, A.; *Lata Biores. Technol.* **2004**, 94, 9.
- <sup>4</sup> Leal, M.C.M.R.; Cammarota, M.C.; Freire, D.M.G.; Sant'Anna Jr, G.L. *Braz. J. Chem. Eng.* **2002**, 19, 175.
- <sup>5</sup> Castro, H.F.; Mendes, A.A.; Pereira, E.B.; Júnior, A.F. *Quim. Nova* **2005**, 28, 296.
- <sup>6</sup> Acosta, J.; Arce, A.; Martínez-Ageitos, J.; Rodil, E.; Soto, A. *J. Chem. Eng. Data* **2002**, 47, 849.
- <sup>7</sup> Wilkinson, T.J. *J. Chem. Educ.* **1998**, 75, 12.
- <sup>8</sup> (a) Acosta, J.; Arce, A.; Martínez-Ageitos, J.; Rodil, E.; Soto, A. *J. Chem. Eng. Data* **2002**, 47, 849. (b) Rodríguez, I.; Jauregui, U.; Alvarez, J.C.; Pardillo, E. *Lat. Am. Appl. Res.* **1999**, 29, 119.
- <sup>9</sup> (a) Pandey, A.; Benjamin, S.; Soccol, C.R.; Nigam, P.; Krieger, N.; Soccol, V.T. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1999**, 29, 119. (b) Carvalho, P.O.; Calafatti, S.A.; Marassi, M.; Silva, D.M.; Contesini, F.J.; Bizaco, R.; Macedo, G.A. *Quim. Nova* **2005**, 28, 614.
- <sup>10</sup> Carvalho, P.O.; Calafatti, S.A.; Marassi, M.; Silva, D.M.; Contesini, F.J.; Bizaco, R.; Macedo, G.A. *Quim. Nova* **2005**, 28, 614.
- <sup>11</sup> Paques, F.W.; Macedo, G.A. *Quim. Nova* **2006**, 29, 93.
- <sup>12</sup> Dalla-Vecchia, R.; Nascimento, M.G.; Soldi, V. *Quim. Nova* **2004**, 27, 623.
- <sup>13</sup> Uppenberg, J.; Patkar, S.; Bergfors, T.; *J. Mol. Biol.* **1994**, 235, 790.
- <sup>14</sup> Muralidhar, R.V.; Chirumamilla, R.R.; Marchant, R.; Ramachandran, V.N.; Ward, O.P.; Nigam, P. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, 18, 81.
- <sup>15</sup> Marzzoco, A.; Torres, B.B.; *Bioquímica Básica*, 2<sup>a</sup> Ed., Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, **1999**.
- <sup>16</sup> <http://www.quimica.com.br/revista/qd420/atualidades1.htm>; acessado em 14 de maio de 2007.

- 
- <sup>17</sup> Freire, D.M.; Teles, E.M.F.; Bon, E.P.S.; Sant'anna, G.L. *Appl. Biochem. Biotechnol* **1997**, 63, 409.
- <sup>18</sup> Bradford, M. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248.
- <sup>19</sup> Kamimura, E.S.; Mendieta, O.; Sato, H.H.; Pastore, G.; Maugeri, F. *Braz. J. Chem. Eng.* **1999**, 16, 103.
- <sup>20</sup> Xu, X. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* **2003**, 105, 289.
- <sup>21</sup> Heinsman, N.W.J.T.; Sxhroën, C.G.P.H.; van der Padt, A.; Franssen, M.C.R.; Boom, R.M.; van't Riet, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, 14, 2699.
- <sup>22</sup> Paiva, A.L; Balcão, V.M.; Malcata, F.X *Enzym. Microbiol. Technol.* **2000**, 27, 187.
- <sup>23</sup> Kirk, O.; Christensen, M.W. *Org. Proc. Reser. Dev.* **2002**, 6, 446.
- <sup>24</sup> Anastas, P.T.; Kirchhoff M.M. *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 686.
- <sup>25</sup> Poliakoff, M.; Fitzpatrick, J.M.; Farren, T.R.; Anastas, P.T. *Science* **2002**, 297, 807.
- <sup>26</sup> Kirk, O.; Borchert, T.V.; Fuglsang, C.C. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, 13, 345.
- <sup>27</sup> Schoemaker, H.E.; Mink, D.; Wubbolts, M.G. *Science* **2003**, 299, 1694.
- <sup>28</sup> Schmid, A.; Dordick, J.S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. *Nature* **2001**, 409, 258.
- <sup>29</sup> Azerad, R. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, 12, 533.
- <sup>30</sup> Straathof, A.J.J.; Panke, S.; Schmid, A. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, 13, 548.
- <sup>31</sup> Parales, R.E.; Bruce, N.C.; Schmid, A.; Wackett, L.P. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, 68, 4699.
- <sup>32</sup> (a) Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, 4th ed. Springer, New York, **2000**.  
(b) Liese A.; Seelbach, K.; Wandrey, C. *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2002. (c) Roberts, S.M. *Biocatalysts for Fine Chemical Synthesis*, Wiley, New York, 1999.
- <sup>33</sup> (a) Torres, E.; Bustos-Jaimes, I.; Le'Borgne, S. *Appl. Catal. B: Environ.* **2003**, 46, 1. (b) Gianfreda, L.; Rao, M.A. *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, 35, 339. (c) Duran, N.; Espósito, E. *Appl. Catal. B: Environ.* **2000**, 28, 83. (d) Boyajian, G.E.; Carreira, L.H.; *Nat. Biotechnol.* **1997**, 15, 127.

- 
- <sup>34</sup> Giri, A.; Dhinga, V.; Giri, C. C.; Singh, A.; Ward, O. P.; Narasu, M. L. *Biotechnol. Adv.* **2001**, *19*, 175.
- <sup>35</sup> Villa, R.; Molinari, F.; Levati, M.; Aragozzini, F. *Biotechnol. Lett.* **1998**, *20*, 1105.
- <sup>36</sup> Comasseto, J. V.; Omori, A. T.; Porto, A. L. M.; Andrade, L. H. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 473.
- <sup>37</sup> Singh, O. V.; Jain, R. K. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *63*, 128.
- <sup>38</sup> Baskar, B.; Ganesh, S.; Lokeswari, T. S.; Chadha, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *27*, 13.
- <sup>39</sup> Olejniczak, T.; Mironowicz, A.; Wawrzenczyk, C. *Bioorg. Chem.* **2003**, *31*, 199.
- <sup>40</sup> Maczka, W. K.; Mironowicz, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 2299.
- <sup>41</sup> Gil, G.; Santos, P. F.; Bullard, C. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 629.
- <sup>42</sup> Fatibello-Filho, O.; Vieira, I. C. *Quim Nova* **2002**, *25*, 455..
- <sup>43</sup> Lenardão, E.J.; Freitag, R.A.; Dabdoub, M.J.; Batista, A.C.F.; Silveira, C.C. *Quim. Nova*, **2003**, *26*, 123.
- <sup>44</sup> a) K, Nakamura, R.Yamanaka, T. Matsuda, T. Harada, *Tetrahedron: Asym.*, **2003**, *14*, 2659-2681; b) W. A. van der Donk, H. Zhao, *Cur. Opin. Biotechnol.*, **2003**, *14*, 421-426.; c) K. Nakamura, T. Matsuda, in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A comprehensive Handbook*, (Eds.: K. Drauz, H. Waldmann), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **2002**. (d) Temba, E.S.C.; Oliveira, I.M.F.; Donnici, C.L. *Quim. Nova* **2003**, *26*, 112.
- <sup>45</sup> Faber, K., *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*, 5 ed. Springer, Berlin, **2004**.
- <sup>46</sup> Gruber, C.C.; Lavandera, I.; Faber, K.; Kroutil, W. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1789.
- <sup>47</sup> Strauss, U.T.; Felfer, U.; Faber, K. *Tetrahedron Asymmetry* **1999**, *10*, 107.
- <sup>48</sup> Omori, A. T.; Tese de Doutorado: *Derivados Aromáticos de Selênio e Telúrio. Aplicação da Biocatálise na Preparação de Selenetos e Teluretos Aromáticos Enantiomericamente Enriquecidos*; **2005**; São Paulo; IQ/USP.
- <sup>49</sup> Pacheco, A.O.; Kagohara, E.; Andrade, L.A.; Comasseto J.V.; Crusius I.H.S; Paula C.R.; Porto A.L.M. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *42*, 65.

---

<sup>50</sup> Difco, *Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology*, 10<sup>a</sup> Ed., Difco Lab. Detroit, **1984**.

<sup>51</sup> Furniss, B. S.; Hannaford, A. J.; Smith, P. W. G.; Tatchell, A. R. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5<sup>a</sup> ed., Prentice Hall, London, **1994**.

<sup>52</sup> Wirth, T.; Fragale, G. *Chem. Eur. J.* **1997**, 3, 1894.

<sup>53</sup> Huand, W.S.; Hu, Q.S.; Pu, L. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 7940.

<sup>54</sup> Yadav, J.S.; Nanda, S.; Reddy, P.T.; Rao, A.B. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3900.

<sup>55</sup> Nakamura, K.; Matsuda, T. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 8957.

<sup>56</sup> Salvi, N.A.; Chattopadhyay, S. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 2833.