

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

ERICA OLIVEIRA ROCHA

Biorredução de cetonas por espécies vegetais

Versão original da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

30/09/2011

ERICA OLIVEIRA ROCHA

Biorredução de cetonas por espécies vegetais

Tese apresentada ao ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Química)

Orientadora: Profa. Dra. Daisy de Brito Rezende

São Paulo

2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação
Biblioteca do Conjunto das Químicas

Nome: ROCHA, Erica Oliveira

Título: Biorredução de cetonas por espécies vegetais

Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências pelo
Programa de Pós-Graduação em Química

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Daisy de Brito Rezende

Instituição: Instituto de Química

Universidade de São Paulo

Julgamento:

Assinatura

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento:

Assinatura:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento

Assinatura:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento

Assinatura:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento

Assinatura:

*À minha família, pela presença, que por
si só é minha motivação:
ao Cido, pelo carinho, apoio e
compreensão ao longo do período de
elaboração deste trabalho,
à Tara, por seu nascimento, em 2004,
que veio trazer luz e sua alegria jovial ao lar,
e a meus pais, pelo zelo e amor
incondicional.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que é o Caminho, a Verdade e a Vida.

À Professora Daisy, que durante os anos de convivência, contribuiu para meu crescimento científico, intelectual e humano, pela liberdade oferecida para a realização do trabalho e pela amizade de mais de 10 anos.

Ao Professor Dr. Paulo R. H. Moreno pela atenção e contribuição durante o processo de definição do projeto.

Ao Professor Ivan Pérsio de Arruda Campos, pelos conhecimentos transmitidos, principalmente durante a Iniciação Científica.

Aos colegas e técnicos do laboratório: Fernandinha, Marco Antônio, Décio, Eduardo, Mauro, Fátima, Cibele, Valérias, e todos que por lá passaram desde minha iniciação científica, pelas mais variadas contribuições.

À Professora Dra. Regina Aparecida Correia Gonçalves, da FCF da Universidade Estadual de Maringá, por gentilmente ceder tecidos de calo da cultura de células de *Cereus peruvianus* já estabelecida.

Ao Pablo, pelo auxílio prestado durante o trabalho.

Ao Professor Dr. Leandro Helgueira de Andrade, pela contribuição, especialmente na ocasião do Exame de Qualificação.

À Professora Dra. Maria Eunice Marcondes, por ter me acolhido na época da graduação.

Aos Professores Drs. Josef Wilhelm Baader, Professor Jonas Gruber e Mário José Politi, pelo incentivo e pelas críticas construtivas.

À Eni Cardoso Tolle, pela fraternidade, amizade e pelas interessantes “prosas”, químicas ou não.

À Bárbara, na época aluna de iniciação científica, pelo auxílio na realização de parte do trabalho.

Aos técnicos da Central Analítica do IQUSP, pelo suporte.

Finalmente, aos amigos, que me ajudam a superar as adversidades e pelos momentos de descontração.

À Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao Cnpq, pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

*Entre o provável e o provado existem hiatos.
Uma fenda. Com medo de saltar, permanecemos ridículos.
Então vemos atrás de nós o chão afundar e, pior,
Nosso ponto de vista esfacelar-se. O desespero despona
Nossa única esperança: saltar para o Verbo
Que abre o universo fechado*

Sheldon Vanauken

A Severe Mercy. New York: HarperCollins, 1980. p. 100

Between the probable and proved there yawns
A gap. Afraid to jump, we stand ab-surd
Then see behind us sink the ground and, worse,
Our very standpoint crumbling. Desperate dawns
Our only hope: to leap into the Word
That opens up the shuttered universe

Esses fenômenos, prodigiosos por sua complexidade e eficácia na realização de um programa previamente fixado, impõem evidentemente a hipótese de que são guiados pelo exercício de funções de algum modo cognitivas. Era esta função que Maxwell atribuía a seu demônio microscópico. (...) é graças à sua capacidade de formar, com outras moléculas, complexos estereoespecíficos e não-covalentes, que as proteínas exercem suas funções 'demoníacas'.

Jacques Monod

O acaso e a necessidade, 1972, p.70, 72.

RESUMO

ROCHA, E.O. *Biorredução de cetonas por espécies vegetais*. 2011. 143p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O trabalho abrange o estudo de biorreduções de cetonas por espécies vegetais, empregando-se homogenatos de células de tecidos de plantas já desenvolvidas (folhas) ou culturas de células de *Rauwolfia sellowii* e *Cereus peruvianus* em suspensão. Dentre os objetivos principais do trabalho estão: reduzir cetonas-modelo por culturas de células vegetais, avaliando a eficiência e estereosseletividade do processo. Desenvolver um procedimento de triagem por enzimas vegetais solúveis entre diversas espécies obtidas no *campus* "Armando Salles de Oliveira", através da manipulação de variáveis que sabidamente alteram a atividade enzimática. Este tipo de preparação enzimática é utilizado no estudo de rotas biossintéticas, mas o emprego de homogenatos de células vegetais na triagem por novos biocatalisadores é inovador, tendo sido demonstrado seu potencial como ferramenta na seleção de enzimas vegetais para a biotransformação de xenobióticos. A metodologia é simples e confiável, possibilitando o estudo de biotransformações por enzimas diferentes daquelas expressas em culturas de células e oferecendo maior garantia de que a atividade enzimática observada é originária da espécie vegetal em estudo, e não de microorganismos endofíticos, que podem atuar nas biotransformações em que se utilizam partes de plantas desenvolvidas como biocatalisador.

Palavras-chave: biorreduções, biocatálise, cetonas

ABSTRACT

ROCHA, E.O. Bioreduction of ketones by plant species. 2011. 143p. Dissertation (Ph.D.) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The work focuses on the study of the bioreduction of ketones by plant species, using homogenates of already developed plant tissues cells (leaves) or of *Rauwolfia sellowii* *Cereus peruvianus* cell cultures suspensions. Among the main objectives of the study are the evaluation of the efficiency and stereoselectivity of the ketone-reduction process in plant cell cultures. It was employed a screening procedure for soluble enzymes from different plant species found on campus "Armando Salles de Oliveira," through the manipulation of variables known to be related to the enzyme activity. This type of enzyme preparation has been already reported in studies of biosynthetic routes, but the use of homogenates of plant cells to the screening for new biocatalysts is innovative. In this work we could demonstrate the potential of this approach as a tool in the selection of plant enzymes for the biotransformation of xenobiotics. The methodology is simple and reliable, allows the study of biotransformations by enzymes different from those expressed in cultured cells, and provides greater assurance that the enzymatic activity observed originated in plant species under study, rather than in endophytic microorganisms, which can act in biotransformations that employ parts of developed plants as biocatalyst.

Keywords: bioreduction, biocatalysis, ketones

Sumário

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1.1.	Química verde	14
1.2.	Síntese assimétrica	15
1.3.	Biocatálise	18
1.3.1.	Resolução de racematos	18
1.3.2.	Redução do grupo carbonila	19
1.3.3.	Biocatalisadores	23
1.3.3.1.	Plantas como biocatalisadores	25
1.3.3.1.1.	Culturas de células vegetais	25
1.3.3.1.2.	Partes de plantas desenvolvidas	27
1.3.3.1.3.	Homogenatos de células vegetais	28
1.3.3.1.4.	Reduções de carbonila catalisadas por espécies vegetais	29

CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS 36

CAPÍTULO 3 – REDUÇÃO DE CETONAS POR REDUTOR CONVENCIONAL

3.1.	Reação em solventes práticos	38
3.2.	Redução das cetonas-modelo por boro-hidreto de sódio em hexano	40
3.3.	Origem da diastereosseletividade	42

CAPÍTULO 4 – ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA A GÁS

4.1.	Seleção de condições cromatográficas	50
4.2.	Método de quantificação	51
4.3.	Validação do método analítico	52
4.3.1.	Especificidade e seletividade	52
4.3.2.	Linearidade	56
4.3.3.	Precisão	57
4.3.4.	Limite de detecção	58
4.3.5.	Limite de quantificação	59
4.3.6.	Exatidão	59
4.3.7.	Intervalo analítico	59
4.3.8.	Recuperação	59
4.3.9.	Robustez	61

CAPÍTULO 5 – REDUÇÃO DE CETONAS POR ESPÉCIES VEGETAIS

5.1	Culturas de células em suspensão	64
5.1.1.	Manutenção de culturas de <i>Rauwolfia sellowii</i> em suspensão	64
5.1.2.	Estabelecimento de culturas de <i>Cestrum amictum</i> em suspensão	65
5.1.3.	Manutenção de calos de <i>Cereus peruvianus</i>	65
5.1.4.	Biotransformações por <i>Rauwolfia sellowii</i> em suspensão	66
5.1.5.	Biotransformações por <i>Cereus peruvianus</i> em suspensão	71
5.2.	Homogenatos de tecidos vegetais diferenciados e de cultura em suspensão	73
5.2.1.	Estabelecimento do procedimento de obtenção dos homogenatos	73
5.2.2.	Biotransformações com homogenatos de células vegetais em diferentes períodos de incubação com o substrato e pH dos meios reacionais	77
5.2.3	Biotransformações com homogenatos de células de <i>Eriobotrya japonica</i> em diferentes concentrações de NADPH adicionado	80
5.2.4	Biotransformações com homogenatos de células de <i>Artocarpus heterophyllus</i> e inibidores de protease	81
5.2.5.	Triagem por biocatalisadores para a redução de cetonas com homogenatos obtidos de folhas	81
5.2.5.1.	<i>Bauhinia variegata</i>	82
5.2.5.2.	<i>Eriobotrya japonica</i>	84
5.2.5.3.	<i>Morus nigra</i>	85
5.2.5.4.	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	88
5.2.5.5.	<i>Eugenia uniflora</i>	90
5.2.5.6.	<i>Citrus sinensis</i>	91
5.2.5.7.	<i>Cestrum nocturnum</i>	92
5.2.5.8.	<i>Plectranthus barbatus</i>	92
5.2.6.	Biotransformações com homogenatos obtidos de culturas de células de <i>Cereus peruvianus</i>	93
5.2.7.	Determinação da concentração de proteínas em homogenatos	94
5.3.	Considerações sobre as biorreduções de cetonas por espécies vegetais	98
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS		111
CAPÍTULO 7 – MATERIAIS E MÉTODOS		
7.1.	Instrumentos e reagentes	115
7.2.	Preparações	116
7.2.1	Redução de cetonas por boro-hidreto de sódio em solventes práticos	116
7.2.2.	Redução das cetonas-modelo por boro-hidreto de sódio em hexano	117

7.3.	Análises por cromatografia a gás	120
7.4.	Redução de cetonas por espécies vegetais	122
7.4.1.	Estabelecimento e manutenção de culturas de células em suspensão	122
7.4.1.1.	Estabelecimento de culturas de células de <i>Rauwolfia sellowii</i> Muell. Arg.	122
7.4.1.2.	Manutenção de culturas de células de <i>Rauwolfia sellowii</i> Muell. Arg.	123
7.4.1.3.	Estabelecimento de culturas de células de <i>Cestrum amictum</i> Schlttdl	124
7.4.1.4.	Manutenção de calos de <i>Cereus peruvianus</i>	124
7.4.2.	Biotransformações por culturas de células de <i>Rauwolfia sellowii</i> em suspensão	125
7.4.3.	Biotransformações por culturas de células de <i>Cereus peruvianus</i> em suspensão	127
7.4.4.	Obtenção dos homogenatos de células vegetais	128
7.4.4.1.	Estabelecimento do procedimento de obtenção dos homogenatos e de biotransformação de cetonas com os homogenatos obtidos	128
7.4.4.2.	Biotransformações com homogenatos de células vegetais em diferentes períodos de incubação com o substrato e pH dos meios reacionais.	129
7.4.4.3.	Biotransformações com homogenatos de células de <i>Eriobotrya japonica</i> em diferentes concentrações de NADPH adicionado	130
7.4.4.4.	Biotransformações com homogenatos de células de <i>Artocarpus heterophyllus</i> e inibidores de protease	131
7.4.5.	Triagem por biocatalisadores com homogenatos de células vegetais	131
7.4.5.1.	Biotransformações com homogenatos obtidos de folhas	133
7.4.5.2.	Biotransformações com homogenatos obtidos de culturas de células de <i>Cereus peruvianus</i>	133
7.4.6.	Determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford	133
	REFERÊNCIAS	135

CAPÍTULO 1:

INTRODUÇÃO

1.1. Química verde

A sustentabilidade da indústria química está diretamente relacionada ao aproveitamento da energia e ao uso de fontes de energia renováveis, muitas destas obtidas através de bioprocessos, em lugar de combustíveis fósseis. A biossíntese nas plantas, usando radiação solar, dióxido de carbono atmosférico, água e nutrientes do solo, produz grandes quantidades de biomassa, estimada em cerca de trinta vezes a quantidade de combustíveis fósseis extraídos, além de manter equilibrado o balanço de carbono. A necessidade de desenvolvimento de processos sustentáveis também motiva a busca por substratos renováveis para biocatálise (VAN BEKKUM & GALLEZOT, 2004).

Nesse contexto, a importância da química verde tem crescido, aumentando os estudos em que se empregam enzimas, nos quais a catálise à temperatura e pressão ambientes normalmente é possível e as etapas de separação e isolamento dos produtos são simplificadas, especialmente quando se usam enzimas imobilizadas; ou células íntegras, cuja maquinaria celular pode ser aproveitada em bioprocessos, principalmente quando os xenobióticos biotransformados são exportados para o meio extracelular. Os bioprocessos podem ser versáteis e também apresentar considerável seletividade pelos substratos, sendo obtidos produtos com quimio-, regio- e enantiosseletividade. Os biocatalisadores têm-se tornado progressivamente mais relevantes na evolução da química verde também por serem biodegradáveis.

Em vista desse conjunto de fatores, hoje há uma tendência, entre os químicos orgânicos, de busca por métodos alternativos de síntese, mais eficientes e de menor impacto ambiental.

O desenvolvimento da biotecnologia e sua aplicação pela indústria resultam em menor uso de energia, maior eficiência do catalisador, maior pureza dos produtos obtidos e maior geração de biomassa (em processos associados a crescimento celular). A biotecnologia influencia, principalmente, a indústria farmacêutica. Um exemplo de substância bastante empregada como intermediário pela indústria farmacêutica são lactonas quirais, importantes para a produção de prostaglandinas. As lactonas são produzidas através de oxidações de Baeyer–Villiger químicas ou enzimáticas. A maior parte das reações de mono-oxigenases de BV reportadas empregaram a enzima NCIMB 9871 de *Acinetobacter* sp. A habilidade de construir microrganismos recombinantes com o gene de interesse ampliou a utilização dessa

enzima em bioconversões. Usando metodologias de evolução enzimática, o uso dessa família de genes pode ser estendido para o funcionamento em condições não-naturais, com maior produtividade. Além disso, é necessário implementar a reciclagem ou regeneração de cofatores de enzimas, para criar sistemas de produção em larga escala eficazes e menos custosos (THOMAS, DICOSIMO & NAGARAJAN, 2002).

Entretanto, o maior impacto da biotecnologia sobre a produção química será, provavelmente, em processos de aproveitamento de subprodutos e resíduos, e sua conseqüente valorização (THOMAS, DICOSIMO & NAGARAJAN, 2002).

Os produtos obtidos por biotransformação são, ainda, valorizados por consumidores que buscam produtos “naturais” ou “verdes”. De acordo com o FDA. (Food and Drug Administration), órgão regulamentador dos E.U.A., a título de exemplo, aromas “naturais” devem ser obtidos por processos “físicos” (extração de fontes naturais), enzimáticos ou microbianos, envolvendo precursores isolados da natureza. O preço da vanilina extraída das vagens da *Vanilla* spp é, no mínimo, 80 vezes maior que o preço da vanilina sintetizada a partir do guaiacol. Os substratos que podem ser usados na produção de vanilina “natural” são: lignina, ácido ferúlico, eugenol e isoeugenol (SERRA, FUGANTI & BRENNNA, 2005).

1.2. Síntese assimétrica

Nos últimos anos, tem sido atribuída considerável importância à síntese assimétrica de precursores de fármacos e outras substâncias com atividade biológica. Em grande parte dos casos de compostos quirais, apenas um dos enantiômeros apresenta a atividade biológica desejada, o que implica em desperdício de pelo menos metade do reagente de partida, nas sínteses convencionais. Além disso, os compostos enantioméricos produzem efeitos diferentes nos sistemas biológicos. Um enantiômero pode exibir toxicidade significativamente superior à do outro ou, até mesmo, efeitos mutagênicos, como exemplificado na **Figura 1.1** (SUCKLING, 1990; BRENNNA, 2003). As interações entre um enantiômero ativo e o receptor que lhe confere esta atividade biológica estão intimamente relacionadas a requisitos estereoespecíficos do composto e do sítio ativo da macromolécula receptora, em geral, uma proteína. Essas proteínas poder ser ligadas à membrana, estruturais, enzimas, ou ainda, envolvidas em transporte. Alguns outros receptores são ácidos nucléicos ou glicoproteínas.

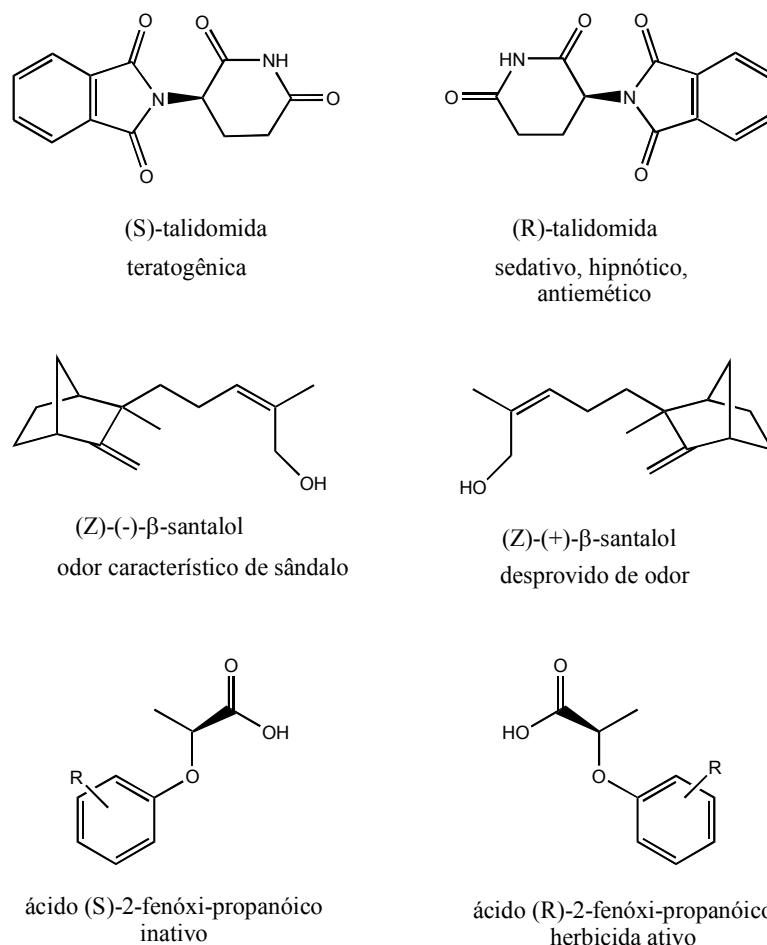


Figura 1.1: Compostos enantioméricos exibindo atividades biológicas distintas.

Embora em processos químicos os investimentos iniciais sejam menores e a produção mais cômoda, a síntese assimétrica química, envolve, geralmente, reagentes caros, corrosivos ou explosivos, e processos nocivos ao meio ambiente, por serem empregados, em muitos casos, metais pesados (YADAV *et al.*, 2002; THOMAS & RAJA, 2005). Frequentemente, o emprego de complexos metálicos quirais mostra-se, também, pouco prático, ou os produtos obtidos por essa metodologia não são opticamente puros.

Em alguns casos, o composto ativo de interesse farmacêutico tem múltiplos centros quirais e grupos funcionais sensíveis, como é o caso da droga anti-hipertensiva Omapatrilat, fazendo da utilização de métodos biocatalíticos uma alternativa significativamente vantajosa. A molécula pode ser obtida a partir da D-fenilalanina e da (S)-6-hidróxinorleucina, que são os intermediários principais.

Na **Figura 1.2**, estão representadas algumas das etapas biocatalíticas da síntese da molécula de Omapatrilat. A (*S*)-6-hidróxinorleucina pode ser produzida a partir do racemato, pela oxidação do enantiômero (*R*) ao correspondente ácido 2-ceto-6-hidróxi-hexanóico, então submetido à aminação redutiva, com regeneração de co-fator pela glicose desidrogenase (glicose DH); enquanto a L-lisina- ϵ -aminoácido transferase (L-lisina- ϵ -AT) catalisa a conversão do dipeptídeo (*S*)-homocisteína-(*S*)-lisina ao aldeído correspondente, possibilitando o fechamento do anel em meio ácido (PANKE & WUBBOLTS, 2005).

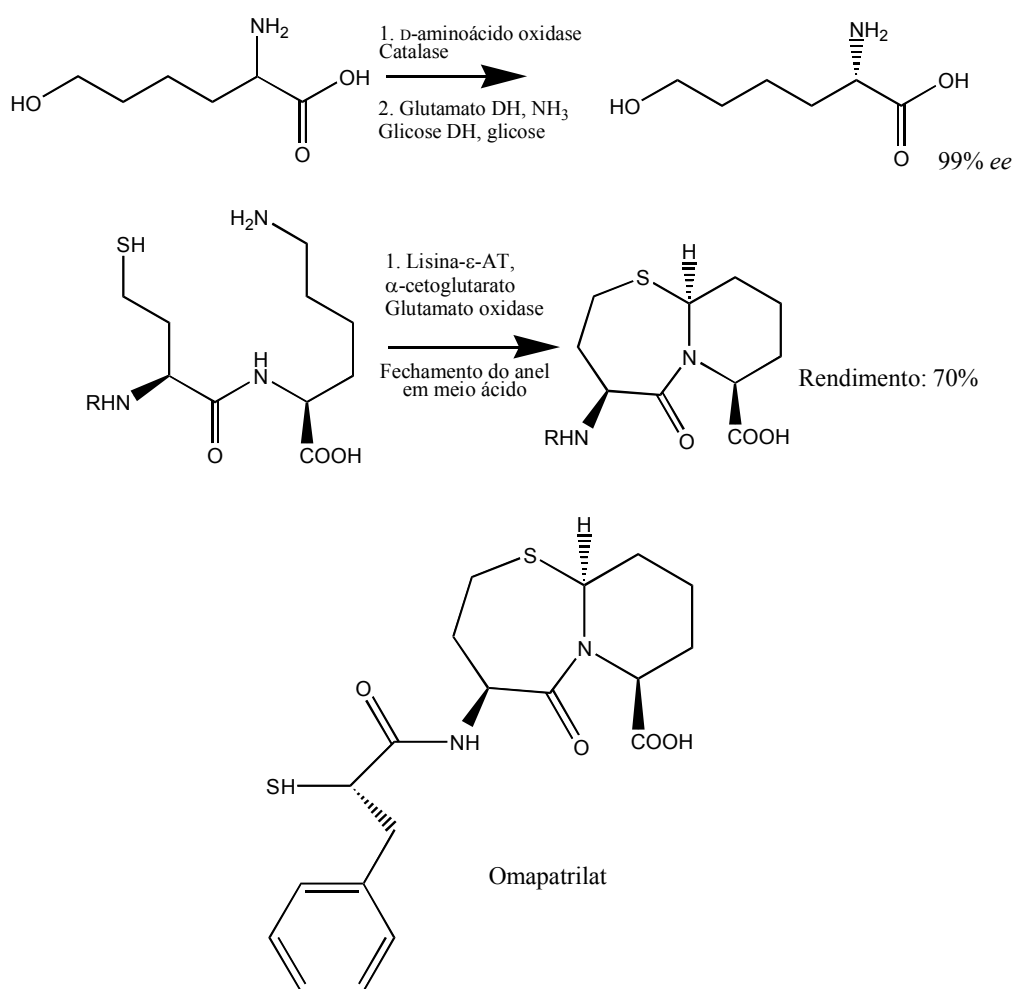


Figura 1.2: Algumas das etapas biocatalíticas na síntese de Omapatrilat.

1.3. Biocatálise

As reações biocatalíticas são aquelas que empregam, principalmente:

(a) enzimas solúveis ou imobilizadas;

(b) catalisadores com células intactas ou organelas celulares (sem atividade metabólica, mas mantendo atividades enzimáticas, são objetos de estudo da “engenharia metabólica”) ou;

(c) fermentação direta, em que se utiliza uma fonte barata de carbono tanto para o crescimento microbiano quanto como fonte de equivalentes oxidantes ou redutores (THOMAS, DICOSIMO & NAGARAJAN, 2002).

Enzimas imobilizadas empregadas como catalisadores heterogêneos, além de serem facilmente separadas do meio reacional, permitem o desenvolvimento de processos livres de solventes orgânicos, e são tipicamente mais tolerantes a condições extremas que seus análogos solúveis.

A fermentação é uma abordagem que tem aplicação na síntese de produtos farmacêuticos, na obtenção de intermediários, em lugar de se fazer uso de reações enzimáticas isoladas, merecendo alusão as reações nas quais se emprega *E. coli* como biocatalisador (PANKE & WUBBOLTS, 2005).

A grande maioria das reações de biotransformação empregadas na obtenção de compostos quirais são baseadas em hidrólises enantioespecíficas ou na redução enantiosseletiva de cetonas (PANKE & WUBBOLTS, 2005).

1.3.1. Resolução de racematos

As enzimas são capazes de distinguir enantiômeros porque eles interagem de maneira consideravelmente diferente com as funções químicas do sítio ativo; o mesmo fato explica as distintas atividades biológicas dos enantiômeros e também pode ser aproveitado em biocatálise, na resolução de racematos. A síntese dos bifenóis representados na **Figura 1.3** é um exemplo do emprego de enzimas isoladas na resolução de racematos. Os isômeros (*R*) e (*S*) da 2,2'-di-hidróxi-4,4',5,5',6,6'-hexametilbifenila foram obtidos da hidrólise de derivados diacilados com substituintes variados, mediada pelas enzimas colesterol esterase (CE) ou lipase de pâncreas suíno (LPS), dentre outras. A otimização das condições reacionais, utilizando-se a enzima LPS, se deu com os substratos 2,2'-di-hexanoato-(±)-**c** e 2,2'-di-heptanoato-(±)-**d** que,

em ensaios preliminares, foram biotransformados com enantiosseletividade satisfatória (91 e 95% ee), e rendimento regular (19 e 16%), atingindo-se, por fim, os rendimentos isolados de 25% para o isômero (*R*) e 33% para o (*S*), ambos obtidos com 99% ee. (TAKEMURA *et al.*, 2008).

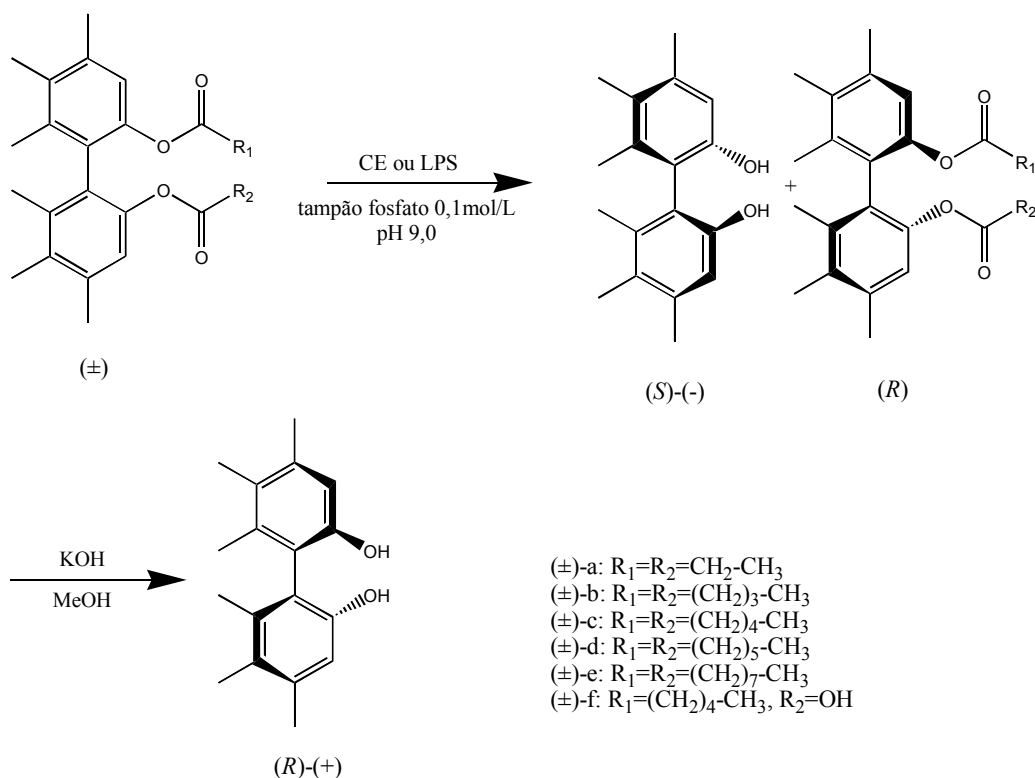


Figura 1.3: Hidrólise de diacil-bifenóis, catalisada por enzimas.

1.3.2. Redução do grupo carbonila

Enzimas também estão aptas a reconhecer faces enantio- e diastereotópicas de moléculas pró-quirais, podendo ser assim utilizadas na obtenção de compostos enantiomericamente puros (OKUMURA *et al.*, 1995).

Dentre as mais importantes funcionalidades em síntese encontra-se o grupo carbonila, cuja redução enantiosseletiva fornece álcoois quirais opticamente puros, comumente encontrados em produtos farmacêuticos, utilizados como intermediários em sínteses assimétricas de múltiplas etapas, em formulações de fragrâncias e defensivos agrícolas (feromônios). As ceto-redutases, com essa finalidade, podem ser empregadas com vantagens sobre outros catalisadores quirais, visto serem acessíveis, razoavelmente baratas, biodegradáveis e não exigirem condições reacionais

espe-ciais, podendo as reações ser efetuadas à temperatura ambiente e em meio aquoso (KALUZNA, ROZZELL & KAMBOURAKIS, 2005).

Reduções de carbonilas têm sido amplamente investigadas empregando-se microorganismos, especialmente o levedo (*Saccharomyces cerevisiae*), tendo em mente a abundância de trabalhos em que é citado, pela facilidade de uso, disponibilidade, preço e versatilidade (NOVÁK *et al.*, 2001; LOU *et al.*, 2002). No entanto, existem fatores que contribuem para os baixos rendimentos observados em parte desses trabalhos: o isolamento do produto do meio reacional é difícil ou o produto é degradado nas condições reacionais (BUQUE-TABOADA *et al.*, 2005).

A transferência estereosseletiva de hidreto do co-fator para a face *Si*- ou *Re*- do grupo carbonila (**Figura 1.4**), catalisada por álcool-desidrogenases (ADH), resulta na formação dos correspondentes álcoois *R* ou *S* (KROUTIL *et al.*, 2004). Entretanto, a maior parte dessas ADHs segue a regra de Prelog, ou seja, o hidreto reage pela face *Re*, com o substituinte menos volumoso da cetona à esquerda e, caso esse também possua a menor prioridade segundo o sistema Cahn-Ingold-Prelog, obtêm-se álcoois com a configuração absoluta *S* (CAHN, INGOLD & PRELOG, 1966). A busca por novos biocatalisadores é promissora e necessária, já que poucas oxi-redutases possuem estereo-especificidade "anti-Prelog", ou são aptas quer a biotransformar substratos estericamente impedidos, quer a tolerar altas concentrações de substrato/co-substrato.

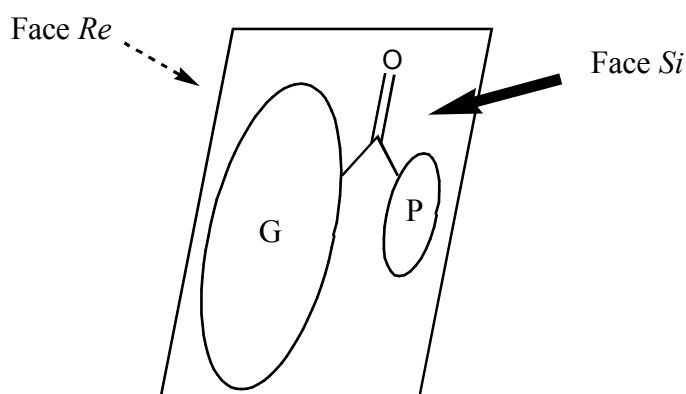


Figura 1.4: Faces enantióticas de cetona pró-quiral.

O principal desafio ao emprego de redutases é o estabelecimento de um sistema eficiente de reciclagem do cofator ou co-enzima, que são caros e devem ser utilizados em condições sub-estequiométricas, não apenas pelo custo elevado, mas para

simplificar o isolamento dos produtos, prevenir problemas de inibição pelo cofator e diminuir sua interferência no equilíbrio químico, desfavorecendo termodinamicamente a reação de regeneração. Para tanto, pode-se aplicar um sistema de substrato-acoplado, no qual a mesma enzima que reduz o substrato também oxida um co-substrato, regenerando o co-fator na forma reduzida, ou utilizar um sistema de enzima-acoplada, quando se faz uso de uma segunda reação enzimática, preferencialmente irreversível (ANTUNES, 2005; ROCHA *et al.*, 2005). O uso de um substrato acoplado, barato e acessível, como 2-propanol ou etanol, constitui-se na abordagem conceitualmente mais vantajosa, mas o emprego bem sucedido da mesma enzima atuando tanto na reação de biotransformação, como na reação de regeneração do cofator, ainda é relativamente raro, porque são necessárias concentrações tipicamente elevadas do álcool co-substrato para superar as limitações termodinâmicas, o que geralmente inativa a enzima redutora. A solução mais comum em regeneração de cofatores consiste na utilização de uma segunda desidrogenase com alta especificidade pelo substrato, que não é utilizado pela enzima redutora. Outro procedimento consiste em associar métodos eletroquímicos às reações enzimáticas de regeneração de cofatores.

Oxidoredutases dependentes de NAD(P) são ferramentas importantes na síntese de compostos quirais, sendo as enzimas dependentes de NAD cerca de quatro vezes mais comuns que as dependentes de NADP. Esses cofatores são caros e devem ser regenerados *in situ* em aplicações preparativas. Mono-oxigenases dependentes de NAD(P)H atuam em epoxidações e hidroxilações em posições não-ativadas, o que não é reproduzido por qualquer catalisador para síntese assimétrica química ou convencional (VAN DER DONK & ZHAO, 2003).

O sistema de enzima acoplada para a regeneração de NADH, que emprega a enzima formiato desidrogenase (FDH) de *Candida boidinii*, é usado em escala industrial para a produção de L-*terc*-leucina. Neste caso, o formiato é oxidado a CO₂, assegurando a irreversibilidade do processo, que, por sua vez, garante a regeneração eficiente do NADH, porém, a FDH é sensível a solventes orgânicos, sendo utilizada apenas com substratos hidrossolúveis (BOMMARIUS, SCHWARM & DRAUZ, 1998). O desenvolvimento das metodologias de regeneração de cofatores está bastante relacionado à descoberta de novas desidrogenases estáveis em meios com alto teor de solvente orgânico e capazes de regenerar as formas reduzidas e oxidadas do cofator (VAN DER DONK & ZHAO, 2003).

Sistemas de células íntegras são alternativas a abordagens em que se usam enzimas purificadas, dispensando etapas de purificação de proteína e, quando se usam células em crescimento, pode-se fazer uso da maquinaria celular para a regeneração de NAD(P)H a partir de glicose ou outro substrato simples e barato. A maior parte dos trabalhos em que se usam mono-oxigenases com regeneração de NAD(P)H se refere a sistemas de células íntegras (VAN DER DONK & ZHAO, 2003), especialmente quando o objetivo é o estabelecimento de um sistema para a produção em larga escala.

Microorganismos de 416 linhagens distintas pertencentes a diferentes grupos taxonômicos (bactérias, actinomicetos, leveduras e fungos filamentosos) foram triados em busca de atividades de mono-oxigenação de cetonas, empregando-se células em crescimento, células “em repouso” e células liofilizadas, imobilizadas em diferentes matrizes, cuja concentração foi variada, com tempo de biotransformação de 72 h. Apenas 11 microorganismos se mostraram ativos; destes, nenhum era bactéria e apenas 6 exibiram atividade de mono-oxigenase superior a 10%. Neste estudo, o substrato ciclo-hexanona era biotransformado por duas enzimas distintas: uma desidrogenase dependente de NADPH, em um equilíbrio, e uma mono-oxigenase de Baeyer-Villiger, em uma reação irreversível (**Figura 1.5**). Mono-oxigenases atuam, geralmente, em rotas metabólicas degradativas que permitem que microorganismos utilizem, em lugar de carbo-hidratos, outros compostos como fonte de carbono e energia. Os resultados mostraram que, quando são utilizadas concentrações baixas de poliacrilamida no trapeamento das células, apenas a reação de Baeyer-Villiger é observada, enquanto em concentrações maiores da matriz, era possível controlar qual reação seria favorecida em função da velocidade de agitação do meio de cultura, sendo observada maior produção de ciclo-hexanol em condições de menor oxigenação. A concentração do substrato também foi um fator determinante na preferência por uma ou outra rota de biotransformação, sendo que, em concentrações de ciclo-hexanona superiores a 100 mM, apenas a reação de redução foi observada, sugerindo uma menor toxicidade deste substrato para a desidrogenase do que para mono-oxigenase (CARBALLEIRA, ÁLVAREZ & SINISTERRA, 2004).

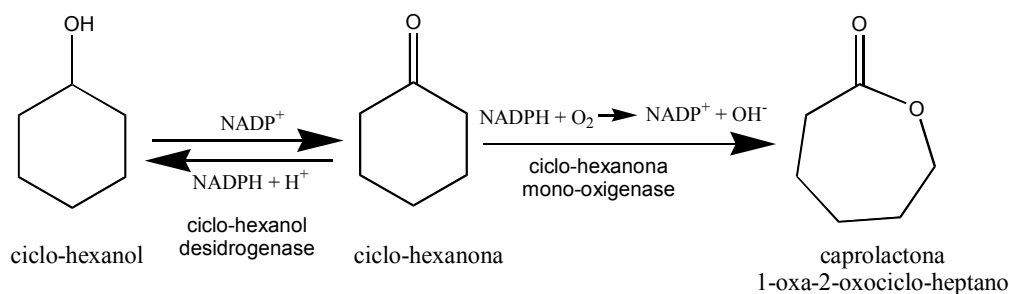


Figura 1.5: Biotransformações da ciclo-hexanona por células de fungo: redução (reversível) e mono-oxigenação de Baeyer-Villiger (irreversível).

Já o trabalho de WALLNER *et al.* (2008) trata da redução assimétrica de α -azido, α -bromo e α -nitro cetonas por células liofilizadas de *Comamonas testosteroni*, utilizando-se altas concentrações (16 g/L) de substrato, em um sistema do tipo substrato-acoplado para a regeneração dos co-fatores. O co-substrato (doador de hidrogênio) 2-propanol foi empregado na concentração de 20% (v/v), ou seja, 12,5 vezes a concentração do substrato, deslocando o equilíbrio na direção desejada, sem inibir a enzima e aumentando a solubilidade do substrato. Foram testadas 21 cepas comercializadas da bactéria na biotransformação da 2-undecanona, sendo que uma delas se mostrou ativa, com atividade enzimática de estereosseletividade *anti*-Prelog. A cepa DSM 1455 foi utilizada na redução das cetonas estudadas, sendo obtidas conversões entre 4 e 99%, para os alcoóis correspondentes, todos com a configuração menos comum na natureza, em tempos de reação entre 10 e 48 horas. Das sete cetonas submetidas aos ensaios, seis foram reduzidas com enantiosseletividades entre 97 e 99%, sendo que apenas duas apresentavam um centro quiral, na posição α em relação à carbonila, que foi pouco reconhecido pelo sítio ativo da enzima, considerando as baixas diastereosseletividades relatadas.

1.3.3. Biocatalisadores

Apesar das inúmeras vantagens apresentadas por biocatalisadores e enzimas, algumas limitações devem ser levadas em consideração: geralmente as enzimas são instáveis em condições extremas de temperatura e pH, e mesmo uma pequena alteração neste parâmetros pode provocar mudanças conformacionais que reduzam a atividade enzimática; apesar da seletividade, podem exibir baixa atividade específica; embora haja enzimas que funcionem satisfatoriamente em meios não-aquosos, normalmente sua performance é muito melhor em meio aquoso, a disponibilidade de biocatalisadores se dá apenas para algumas reações e são necessários grandes

períodos de tempo para o desenvolvimento de novas enzimas para atuar em processos biocatalíticos específicos.

Biocatalisadores prontamente acessíveis são triados na fase inicial de desenvolvimento da síntese de produtos farmacêuticos, o que geralmente se faz com coleções de microorganismos, sendo selecionado(s) o(s) mais ativo(s) para a produção inicial do composto (HUISMAN, LIANG & KREBBER, 2010; POLLARD & WOODLEY, 2007).

As metodologias mais comumente utilizadas na busca de novos biocatalisadores são: (a) triagem a partir de amostras ambientais, geralmente investigando-se a habilidade de organismos em transformar determinado composto, (b) engenharia de proteínas de biocatalisadores existentes e (c) ensaios com os biocatalisadores existentes, transformando substratos ou funções químicas diferentes (BOMMARUS & POLIZZI, 2006).

Um dos mais importantes métodos para a seleção de biocatalisadores eficazes, que parte de enzimas já conhecidas, ou seja, já selecionadas de amostras ambientais, é conhecido por “evolução Darwiniana”. Consiste na otimização de algum aspecto da atividade de uma enzima, como, por exemplo, sua enantiosseletividade ou sua termoestabilidade. O gene que codifica a enzima é submetido a mutagêneses aleatórias, gerando um banco de genes mutantes, que, por sua vez, é inserido em um microorganismo adequado, produzindo assim uma biblioteca de enzimas mutantes, que são triadas visando melhorar a enantiosseletividade ou a termoestabilidade da enzima selvagem. Os genes mutantes das enzimas selecionadas são submetidos a novos ciclos de mutagênese, expressão e triagem de modo a maximizar a atividade de interesse (THOMAS & RAJA, 2005).

Diversos microorganismos são utilizados como biocatalisadores, principalmente fungos (p. ex. GONÇALVES *et al.*, 2004) e bactérias, dentre os quais se destaca o levedo. O emprego de outros biocatalisadores também tem sido relatado e, entre 1995 e 2005, 11% dos trabalhos publicados em biotransformações de terpenos foram efetuados utilizando-se plantas, 7% enzimas isoladas, 4% microalgas e 2% cianobactérias, sendo que 76% dessas publicações fazem referência a transformações obtidas com fungos ou bactérias como biocatalisadores (CARVALHO & FONSECA, 2006).

A maior parte dos trabalhos em biorreduções de cetonas relacionados por Matsuda e colaboradores também se refere ao emprego de enzimas isoladas

selvagens ou modificadas e de sistemas de células íntegras, de bactérias e fungos (MATSUDA, YAMANAKA & NAKAMURA, 2009). Um exemplo interessante de emprego de fungos como biocatalisadores é o estudo da redução de seleno-cetonas empregando-se células íntegras em suspensão de fungos pertencentes aos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Emmericella*, obtidos de amostras originárias de florestas tropicais brasileiras. Os arilselenoálcoois de interesse foram obtidos em excessos enantioméricos entre 45 e 99%, com estereosseletividades Prelog e anti-Prelog, em tempos de biotransformação entre 2 e 10 dias (ANDRADE *et al.*, 2004).

1.3.3.1. Plantas como biocatalisadores:

1.3.3.1.1. Culturas de células vegetais

Culturas de células vegetais em suspensão são sistemas interessantes por serem melhores para o isolamento de enzimas do que a planta diferenciada, já que suas organelas de reserva, como vacúolos, não são suficientemente desenvolvidas e, geralmente, não acumulam metabólitos secundários. A produção de metabólitos secundários em tecidos de calo é, com freqüência, superior à que se observa em plantas desenvolvidas. A suplementação de um precursor ao meio de cultura pode incrementar a produção, como no caso da cultura de calos do cacto *Cereus peruvianus*, à qual se adicionou tirosina, que foi incorporada à rota biossintética da tiramina, principal alcalóide produzido por tecidos de calo dessa espécie (ROCHA *et al.*, 2005).

Investigações quanto à habilidade de culturas de células vegetais em suspensão, ou imobilizadas, para a transformação de diversos substratos exógenos, e não apenas metabólitos secundários, vêm aumentando progressivamente, mesmo que seu número ainda seja significativamente menor do que o de trabalhos em que se empregam microorganismos (ISHIHARA *et al.*, 2003; VILLA *et al.*, 1998). O emprego de células íntegras dispensa a adição e a regeneração de cofator. No entanto, a manipulação de culturas de células vegetais exige aparato microbiológico e ambiente estéril, sendo que, muitas vezes, o crescimento e a divisão das células podem ser muito lentos, se comparados aos de microorganismos, em função da espécie, de condições ambientais ou do meio de cultura, devendo-se levar em conta o risco de contaminação. Além disso, a toxicidade dos substratos exógenos para sistemas de células vegetais intactas

é uma importante limitação ao emprego destes biocatalisadores. Até recentemente, a redução de aldeídos e cetonas havia sido estudada usando culturas de células vegetais empregando-se, principalmente, metabólitos secundários como substratos (AVIV *et al.*, 1981; LAPPIN, STRIDE & TAMPION, 1987; HAMADA *et al.*, 1988; OBITZ, ENDREB & STÖCKIGT, 1995). O emprego de plantas fotossintéticas em biocatálise é atraente por haver fixação do gás carbônico atmosférico, mas, devido às baixas produtividades geralmente associadas, a separação dos produtos diluídos em meio aquoso pode ser um desafio (THOMAS, DICOSIMO & NAGARAJAN, 2002).

Um dos principais obstáculos ao emprego de culturas de células vegetais em suspensão é sua sensibilidade às tensões hidrodinâmicas de cisalhamento em processos de larga escala decorrente, especialmente, de sua tendência a formar agregados. Essa tendência deve-se às células vegetais serem maiores e, geralmente, mais alongadas que células microbianas, por falhas na separação entre células após a divisão e pelo acúmulo de polissacarídeos extracelulares. Limitações decorrentes de sua velocidade de crescimento, de suas baixas produtividades, e do custo do processo em escala industrial, que é alto, fazem com que esta tecnologia seja usada, nesta escala, apenas quando oferece vantagem econômica sobre a síntese química ou sobre processos de extração tradicionais. Embora culturas de tecidos e órgãos vegetais possam ser mais produtivas que culturas em suspensão, essas últimas têm maior potencial para a aplicação em processos industriais, em face do aprendizado adquirido no tratamento de culturas microbianas. A imobilização diminui as tensões de cisalhamento sobre a cultura de células, aumenta o contato entre as células, o reuso de biomassa e possibilita grande facilidade de retirada de produto, caso este seja secretado para o meio extracelular (KIERAN, MACLOUGHLIN & MALONE, 1997).

Poucos processos envolvendo culturas de células vegetais são de aplicação industrial, e nestes casos, estas culturas são fonte de metabólitos secundários. No entanto, processos de biotransformação de substratos exógenos têm sido investigados para aplicação nesta escala, como a glicosilação da hidroquinona a arbutina por culturas de células de *Rauwolfia serpentina* em suspensão (LUTTERBACH & STÖCKIGT, 1992).

1.3.3.1.2. Partes de plantas desenvolvidas

O uso de partes de plantas desenvolvidas é ainda mais recente (FERRAZ *et al.*, 2008; PACHECO *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2006; COMASSETO *et al.*, 2004), merecendo ser investigado tanto pela variabilidade das fontes enzimáticas, como pela facilidade de execução dos experimentos, cuja reprodutibilidade precisa ser melhor estabelecida, tendo em vista que, nesses sistemas, há pouco controle sobre a expressão enzimática, sujeita a variações de diversas origens, especialmente ambientais, como, por exemplo, a variação sazonal da expressão da monoterpene sintase em folhas de carvalho, *Quercus ilex* (FISCHBACH *et al.*, 2002).

Entretanto, ao se empregarem partes de plantas desenvolvidas coletadas aleatoriamente (frutos, vegetais, folhas, por exemplo), além da dificuldade em se determinar a identidade genética do indivíduo (planta), a possível presença de microorganismos endofíticos dificulta a atribuição da atividade enzimática observada, ou seja, a identificação das espécies responsáveis pela expressão das enzimas ativas. Esse conjunto de características prejudica a interpretação dos resultados e o aumento da escala para quantidades de reator ou produção industrial. A presença de microorganismos endofíticos é inevitável, pois eles estão entremeados nos tecidos vegetais, e não apenas em sua superfície. No caso do uso de raízes que acumulam reservas de amido, o tecido vegetal serve como meio de cultura para os microorganismos endofíticos, cuja atividade pode facilmente prevalecer sobre aquelas devidas às enzimas das células vegetais, cujas paredes dificultam o trânsito dos xenobióticos para dentro e para fora da célula. Para exemplificar a importância da contribuição desses micro-organismos, podem-se citar alguns estudos (SURETTE *et al.*, 2003; SHIMODA *et al.*, 2006). Assim, foram isoladas 360 linhagens de microorganismos endofíticos da raiz de cenoura, sendo que 4 delas atuaram na redução do grupo carbonila, em graus variados de enantio e diastereosseletividade. A biotransformação com raiz de *Daucus carota* em partes inteiras (célula íntegra) na presença de inibidores de levedura e bactéria (ciclo-hexil-imida e cloranfenicol) resultou em diminuição da conversão de 85% para 4% na redução de um β -ceto-éster.

Também há necessidade de se otimizarem esses ensaios, pois, embora a enantioseletividade dos métodos que se encontram relatados na literatura seja excelente, os experimentos com biocatalisadores vegetais apresentam rendimentos relativamente baixos, tempos de conversão eventualmente elevados e proporção elevada entre as massas do biocatalisador e do substrato (YADAV *et al.*, 2001;

YADAV *et al.*, 2002; BALDASSARE *et al.*, 2000; BRUNI *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, 2006).

Todavia, a compartimentalização intercelular do metabolismo nos organismos pluricelulares reforça a necessidade da investigação do potencial biocatalítico de partes de plantas que sofreram diferenciação. A segregação observada no metabolismo da mentona, por exemplo (**Figura 1.6**), deve ser levada em consideração em estudos de biotransformações de monoterpenos por culturas de células de *Mentha*, nas quais apenas se observa um limitado espectro de atividades. As glândulas de óleo da epiderme foliar eram consideradas os principais locais de biossíntese de monoterpenos. Entretanto, constatou-se importante participação do parênquima na produção de estereo-isômeros do mentol, (CROTEAU & WINTERS, 1982) como representado na **Figura 1.6**.

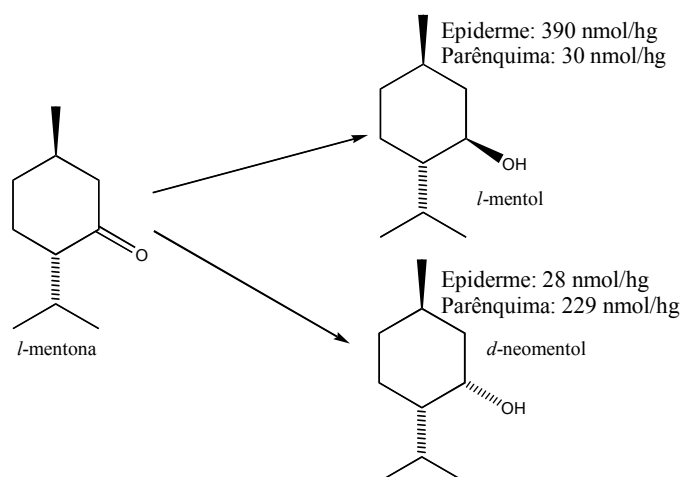


Figura 1.6: Compartimentalização intercelular do metabolismo da mentona.

1.3.3.1.3. Homogenatos de células vegetais

Um método alternativo de triagem por biocatalisadores vegetais é o emprego de preparações enzimáticas, mais apropriadamente denominadas homogenatos de células (*cell-free extracts*), através da ruptura da parede celular vegetal, adequando-se o tampão extrator à manutenção da atividade enzimática, já que muitos compostos são postos em contato nesse processo. Desse modo, é possível o estudo de biotransformações por enzimas distintas daquelas expressas em culturas de células, em ensaios de mais simples execução, e com maior garantia de que a atividade

enzimática observada seja originária da espécie vegetal em estudo, e não de microorganismos endofíticos (*vide* o item 1.3.3.1.2).

O método já é utilizado no estudo de rotas biossintéticas, como, por exemplo, no ensaio de atividade de monoterpeno sintase em folhas de *Picea abies* (L.) Karst. e *Quercus ilex* L. (FISCHBACH *et al.*, 2000), ou na determinação de atividade enzimática de culturas de células vegetais, mas não tem sido aplicado em triagens biocatalíticas, com substratos exógenos. Uma limitação importante é semelhante à existente quando se empregam enzimas isoladas: a atividade enzimática é observada exclusivamente se houver regeneração do(s) co-fator(es) oxidado(s) (LOU *et al.*, 2002).

Homogenatos de células vegetais também foram empregados na preparação de um biossensor para a determinação de sulfito em alimentos. Um homogenato preparado a partir de folhas de *Malva vulgaris* foi acoplado a gelatina usando glutaraldeído e fixado a uma membrana de *Teflon*. A conversão do sulfito a sulfato, na presença de oxigênio dissolvido, foi monitorada amperometricamente. O método apresentou linearidade na faixa de concentração entre 0,2 e 1,8 mM, a 35 °C e no pH 7,5, limite de detecção de 0,2 mM, baixo custo e tempo total para tomada de medidas de cerca de 10 minutos (SEZGINTÜRK & DINÇKAYA, 2005).

1.3.3.1.4. Reduções de carbonila catalisadas por espécies vegetais

Essa revisão bibliográfica refere-se ao período de 1980-2011, feita com base no banco de dados *webofscience*, e nas palavras-chave: reduction, carbonyl, plant, biotransformation, cell-free extract, homogenate, cell cultures e ketone.

A redução de α -azidoaril-cetonas, usando raiz de *Daucus carota* foi investigada como um passo intermediário na síntese da (*R*)-(-)-denopamine, (*R*)-(-)-tembamide e da (*R*)-(-)-aegeline. Após períodos entre 2 a 3 dias, sob agitação, os (*R*)- α -azidoaril-alcoóis correspondentes são obtidos com rendimentos entre 85 e 92% e excessos enantioméricos superiores a 99%, determinados por cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral, com estereoquímica dos produtos seguindo a regra de Prelog (YADAV *et al.*, 2001).

Culturas de células de *Mentha*, oriundas de seis linhagens celulares distintas, biotransformaram a (-)-mentona em (+)-neomentol, em 12 horas, enquanto o

diastereoisômero (+)-isomentona não foi biotransformado ao álcool correspondente, mostrando estereoespecificidade tanto com relação ao precursor quanto ao produto (AVIV *et al.*, 1981; **Figura 1.7**). Croteau & Felton (1980) relacionaram a diferença na composição de estereoisômeros em óleos essenciais de espécies vegetais com as distintas especificidades pelo substrato de suas monoterpênol desidrogenases.

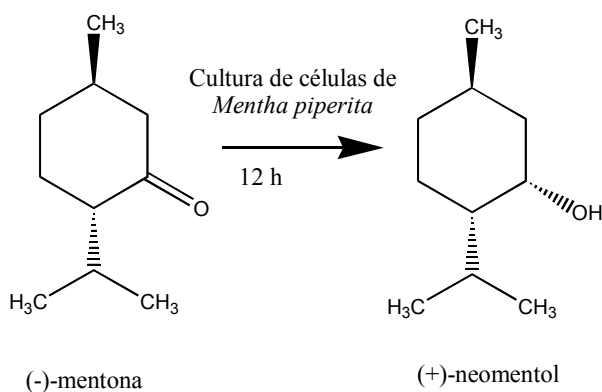


Figura 1.7: Redução estereosseletiva da (-)-mentona em (+)-neomentol.

O alcalóide raumaclina, intermediário da biossíntese de raumaclinas substituídas, as precedendo na rota biossintética, foi obtido a partir da ajmalina, quando a última foi adicionada ao meio de cultura de uma suspensão de células de *Rauwolfia serpentina*, planta medicinal de origem indiana. A formação da raumaclina, simplificada representada na **Figura 1.8**, é catalisada por duas enzimas: uma peroxidase ligada à membrana, seguida de uma redutase solúvel NADPH₂-dependente, sendo esta última atividade enzimática exclusiva de suspensões de células de *Rauwolfia*. A redutase foi purificada, e verificou-se que é altamente substrato-específica (OBITZ, ENDREB & STÖCKIGT, 1995).

A biotransformação de alquil-ciclo-hexanodionas empregando culturas em suspensão de *Caragana chamlagu*, no escuro, forneceu ácidos oxo-carboxílicos por clivagem oxidativa com rendimentos entre 40 e 95 %, após períodos entre 4 e 14 dias, com exceção da biotransformação da 2-metilciclo-hexano-1,3-diona, que se deu em 7 horas e se encontra representada na **Figura 1.9**, assim como a redução estereosseletiva da 1,2- e da 1,4-ciclo-hexanodiona, em ambos os casos se obtendo o diastereoisômero *trans*, com rendimentos de 37% e 53%, respectivamente, após 14 dias (CHAI *et al.*, 2003).

Dentre inúmeros exemplos citados em um artigo de revisão bibliográfica, apenas um se referia ao emprego de plantas em biorreduções, sendo reportado apenas o

excesso enantiomérico, para este caso. O produto de redução se encontra representado na **Figura 1.10**, a seguir, ao lado de exemplos de produtos obtidos pelo uso de microorganismos (MATSUDA, YAMANAKA & NAKAMURA, 2009; ORDEN *et al.*, 2006; PFRUENDER *et al.*, 2004; COMASSETO *et al.*, 2006).

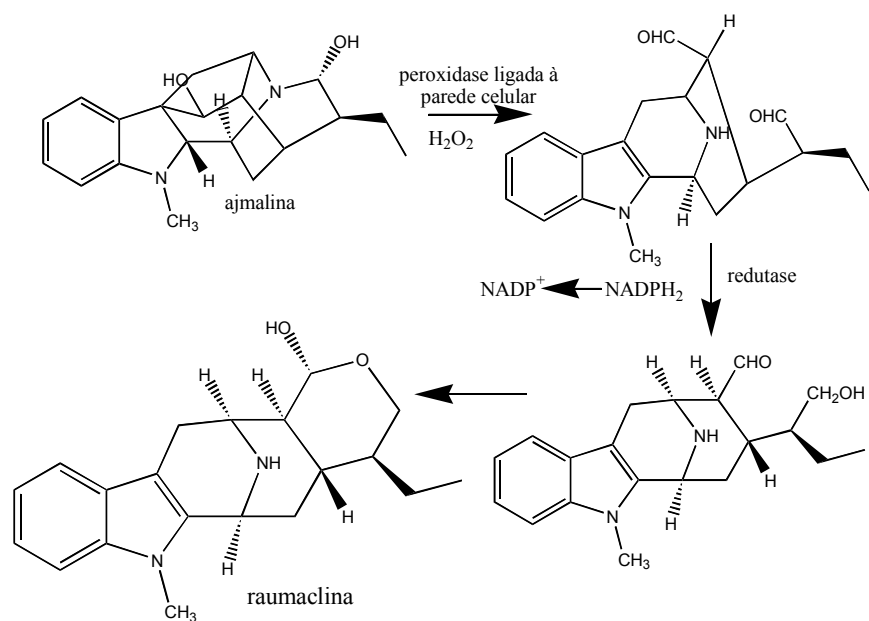


Figura 1.8: Biossíntese da rauhaclina a partir da ajmalina, por culturas de células de *Rauwolfia serpentina* em suspensão.

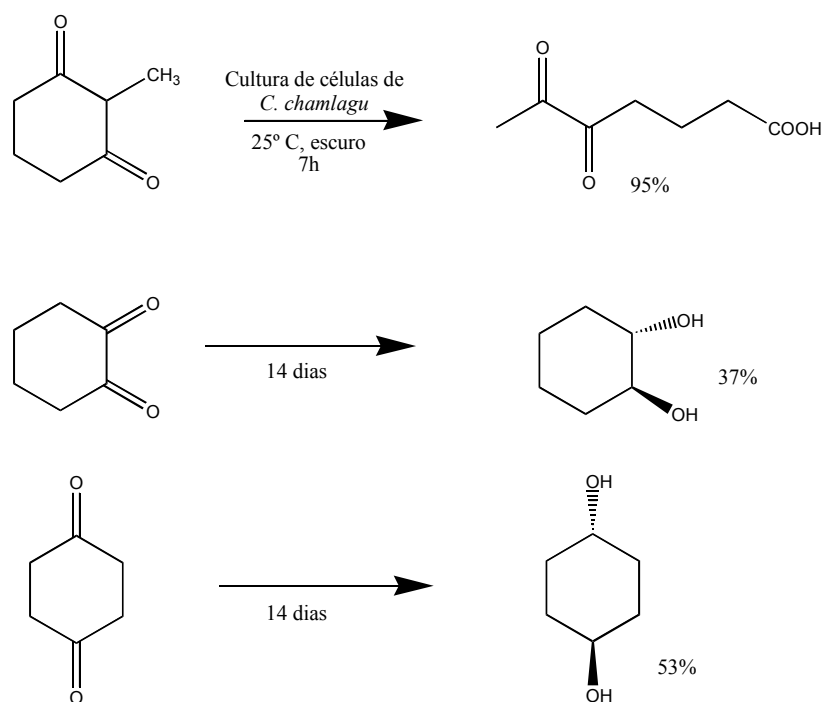


Figura 1.9: Biotransformações de ciclo-hexanodionas por cultura de células de *C. chamlagu*.

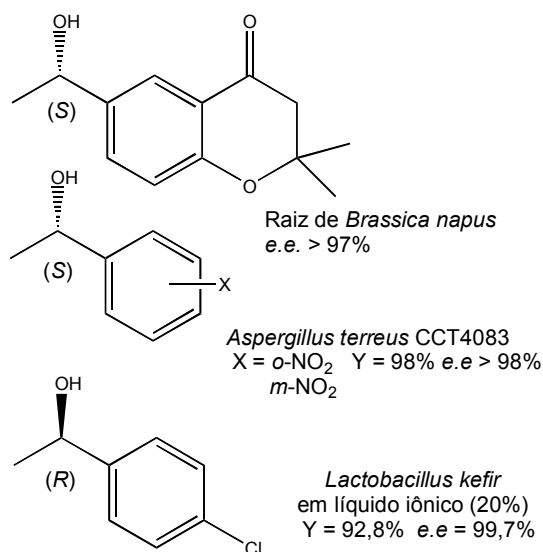


Figura 1.10: Alcoóis enantiomericamente enriquecidos obtidos por biorredução.

O trabalho de Bruni *et al.* (2002) refere-se à hidrólise do 1-acetóxi-2-metilciclo-hexeno e posterior redução da 2-metilciclo-hexanona obtida (*vide* **Figura 1.11**). É especialmente interessante devido à semelhança entre os substratos nele tratados e aqueles que foram empregados em nossa investigação sobre biotransformação em culturas de células em suspensão de *Rauwolfia sellowii* e *Cereus peruvianus*, assim como em homogenatos obtidos de folhas. No trabalho relatado, empregaram-se partes de plantas inteiras, em água, na proporção 400:1 (massa de biocatalisador / massa de substrato). Os tempos de conversão, rendimentos e pureza óptica dos produtos obtidos estão expostos na Tabela 1.1, tomando-se algumas espécies como exemplo.

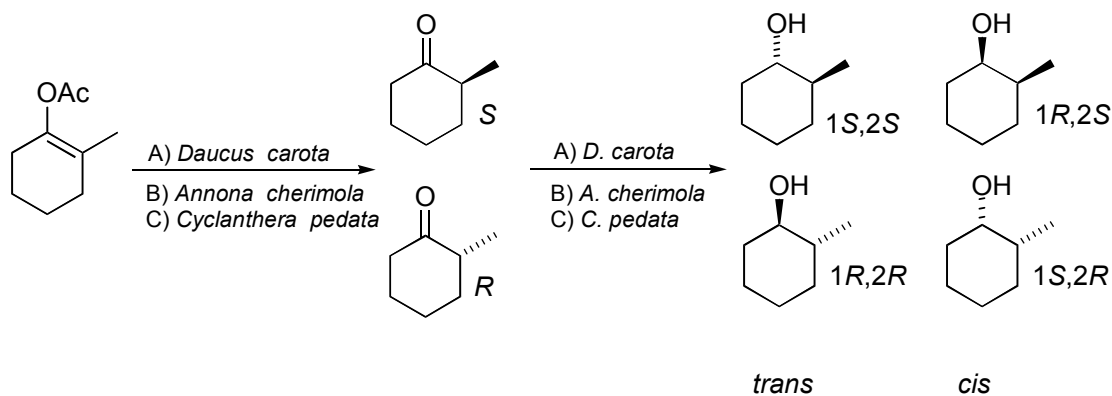


Figura 1.11: Hidrólise e redução por partes de plantas desenvolvidas.**Tabela 1.1:** Hidrólise e redução de acetato de enol com biocatalisadores vegetais.

Planta (parte)	Tempo ^a (h)	Cetona		<i>trans</i> -Álcool		<i>cis</i> -Álcool	
		η (%)	ee (%) ^b	η (%)	ee (%) ^b	η (%)	ee (%) ^b
<i>D. carota</i> (raiz)	002	089	045 (S)	05		-	
	024	014	100 (R)	75	100 (1S,2S)	11	
<i>A. cherimola</i> (fruta)	024	090	015 (S)	-		-	
	072	024	085 (S)	30	100 (1S,2S)	46	95 (1S,2R)
<i>C. pedata</i> (fruta)	024	100	008 (R)	-		-	
	144	042	035 (S)	33	100 (1S,2S)	25	50 (1S,2R)

a. Biotransformações monitoradas por cromatografia a gás com 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 3 e 6 dias.

b. Configuração absoluta entre parênteses.

YADAV *et al.* (2007) relataram o emprego de sistemas de células íntegras com a raiz de *D. carota* com excelentes rendimentos e enantiosseletividades, sem a necessidade de adição de co-fator, mas se referem equivocadamente a seu próprio sistema como “homogenato de planta” e tratam das enzimas atuantes como “enzimas presentes na *D. carota*”, quando, na realidade, não é possível garantir se esta é mesmo a origem da atividade enzimática observada. Homogenatos são, como dito anteriormente, sistemas do tipo “*cell-free extract*”, em que se rompem as paredes da célula vegetal para obter as enzima em solução, cujo emprego em prospecções biocatalíticas com substratos exógenos não havia, até então, sido reportado.

A utilização da raiz de cenoura em biocatálise despertou a atenção dos químicos orgânicos pela facilidade de execução dos experimentos e altos rendimentos observados, sem a adição de co-fator. Mas a estereosseletividade do processo é imprevisível. Mesmo quando se empregam sistemas de células idênticas entre si, existem enzimas que atuam simultaneamente. Já em sistemas em que coexistem diversas espécies de microorganismos, pertencentes a centenas de linhagens distintas, a estereosseletividade do sistema não é, necessariamente, reproduzível.

Ensaio de triagem por atividade de redutase de aldeído foram realizados com partes de diversas famílias de plantas desenvolvidas descontaminadas

superficialmente, coletadas em Córdoba (Argentina) e identificadas por um botânico. Foram selecionadas espécies cujas raízes se assemelhavam em forma e textura às raízes da cenoura. Os ensaios foram realizados em meio aquoso, imediatamente após a aquisição das plantas, com rendimentos elevados de álcool benzílico em intervalos de biotransformação entre 1 e 6 dias (SALVANOVA *et al.*, 2011).

CAPÍTULO 2:

OBJETIVOS

Embora na literatura haja relatos do emprego de homogenatos de células vegetais no estudo de rotas biossintéticas, o uso desses homogenatos na triagem de novos biocatalisadores é inovador, permitindo avaliar seu potencial como ferramenta na seleção de enzimas vegetais para a biotransformação de xenobióticos.

O método proposto tem foco em redutases solúveis e é uma alternativa à triagem de biocatalisadores de origem vegetal em que se empregam tecidos vegetais desenvolvidos descontaminados superficialmente, que podem ser úteis em etapas de síntese em escala de pesquisa, mas não garantem, necessariamente, a origem da atividade enzimática observada. Portanto, preenche uma lacuna na triagem por enzimas próprias de tecidos vegetais diferenciados, a partir de amostras ambientais, que possibilita o fornecimento de enzimas selvagens para posterior modificação e seleção por métodos de biologia molecular.

Assim, o objetivo central do presente trabalho é avaliar a viabilidade de se reduzirem cetonas por enzimas vegetais, para a obtenção de álcoois quirais, substâncias que têm importância como intermediários sintéticos.

Assim será:

- avaliada a eficiência e estereosseletividade da redução de cetonas-modelo por culturas de células vegetais;
- avaliada a eficiência e estereosseletividade da redução de cetonas-modelo em homogenatos de células vegetais;
- desenvolvido um procedimento para a triagem de diversas espécies vegetais obtidas no *campus* “Armando Salles de Oliveira” quanto à ação de enzimas vegetais solúveis, empregando-se tecidos vegetais diferenciados (folhas).

CAPÍTULO 3:

**REDUÇÃO DE CETONAS POR
REDUTOR CONVENCIONAL**

3.1. Reação em solventes práticos

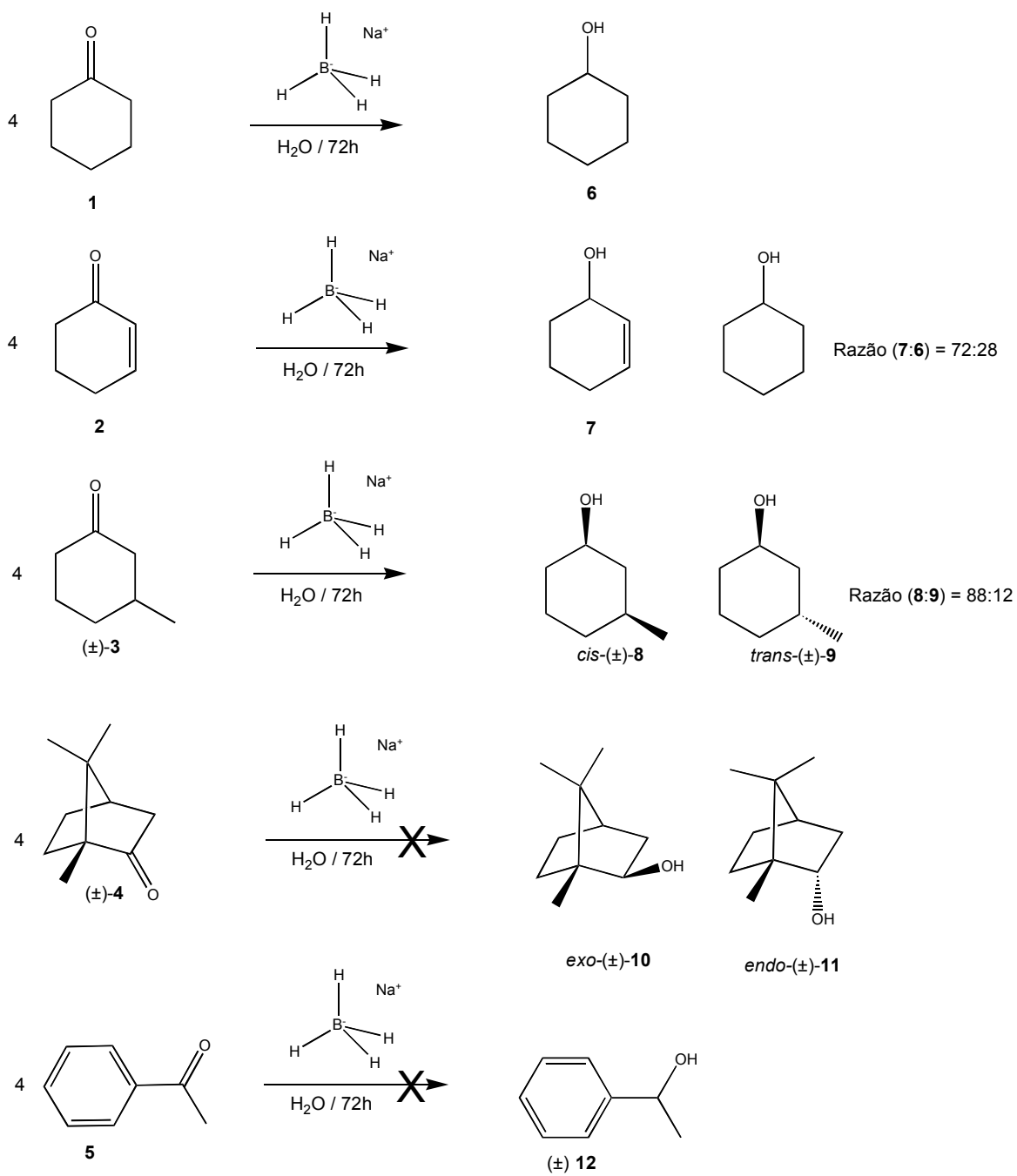
Procederam-se às reações de redução de cetonas por boro-hidreto de sódio para obtenção dos padrões, escolha do solvente mais adequado para sua extração do meio aquoso e para estabelecer um procedimento químico convencional como padrão de comparação com os métodos biocatalíticos. Inicialmente, as reações foram executadas em meio aquoso (tampão borato 0,1 mol/L, pH 9,0), o reagente redutor foi empregado em excesso de mais de 5 vezes com relação à quantidade indicada pela estequiometria da reação e o sistema reacional foi mantido sob agitação por 72 horas, à temperatura ambiente. As cetonas submetidas a este procedimento, separadamente, foram: ciclo-hexanona (**1**), 2-ciclo-hexen-1-ona (**2**), 3-metilciclo-hexanona (**3**), cânfora (**4**) e acetofenona (**5**), conforme representado no ESQUEMA 3.1.

O ciclo-hexanol (**6**) foi obtido com 99% de rendimento e, após purificação com sódio metálico, com 99,5% de pureza cromatográfica, enquanto os compostos **7**, **8** e **9** foram obtidos em baixos rendimentos, juntamente com o composto de partida e/ou subprodutos. Na redução da 2-ciclo-hexen-1-ona com boridreto de sódio, o 2-ciclo-hexen-1-ol é obtido juntamente com o composto **6**, ou seja, não se observou a conhecida quimiosseletividade do reagente quando as reações foram realizadas em meio aquoso. Já no caso da cânfora, sua baixa solubilidade em meio aquoso certamente contribuiu para a não ocorrência da reação neste meio.

As reações de redução dos compostos em tela também foram executadas em metanol, porém, o rendimento e a pureza dos produtos obtidos foram considerados, ainda, inadequados para os propósitos delineados neste trabalho, possivelmente porque o metanol reage rapidamente com o boro-hidreto, diminuindo o rendimento da reação.

As reações em tampão borato foram realizadas em 5 erlenmeyers para cada uma das cetonas, sendo os produtos de reação extraídos com *n*-hexano, acetato de etila, éter etílico, diclorometano e clorofórmio, empregando-se um solvente para cada uma das 5 amostras. O acetato de etila foi o solvente que extraiu mais eficientemente os produtos de redução dos compostos **1**, **2** e **3**, enquanto o emprego de *n*-hexano forneceu maior rendimento na extração da cânfora e seus produtos de redução e o diclorometano se mostrou mais eficiente para a extração da acetofenona e seus produtos de redução do meio aquoso. No entanto, a diferença observada com relação ao procedimento de extração com acetato de etila não foi significativa, de modo que o acetato de etila foi eleito o solvente a ser utilizado em todas as extrações de cetonas de meio aquoso a partir de então.

ESQUEMA 3.1



3.2. Redução das cetonas-modelo por boro-hidreto de sódio em hexano (YAKABE, HIRANO & MORIMOTO, 1998)

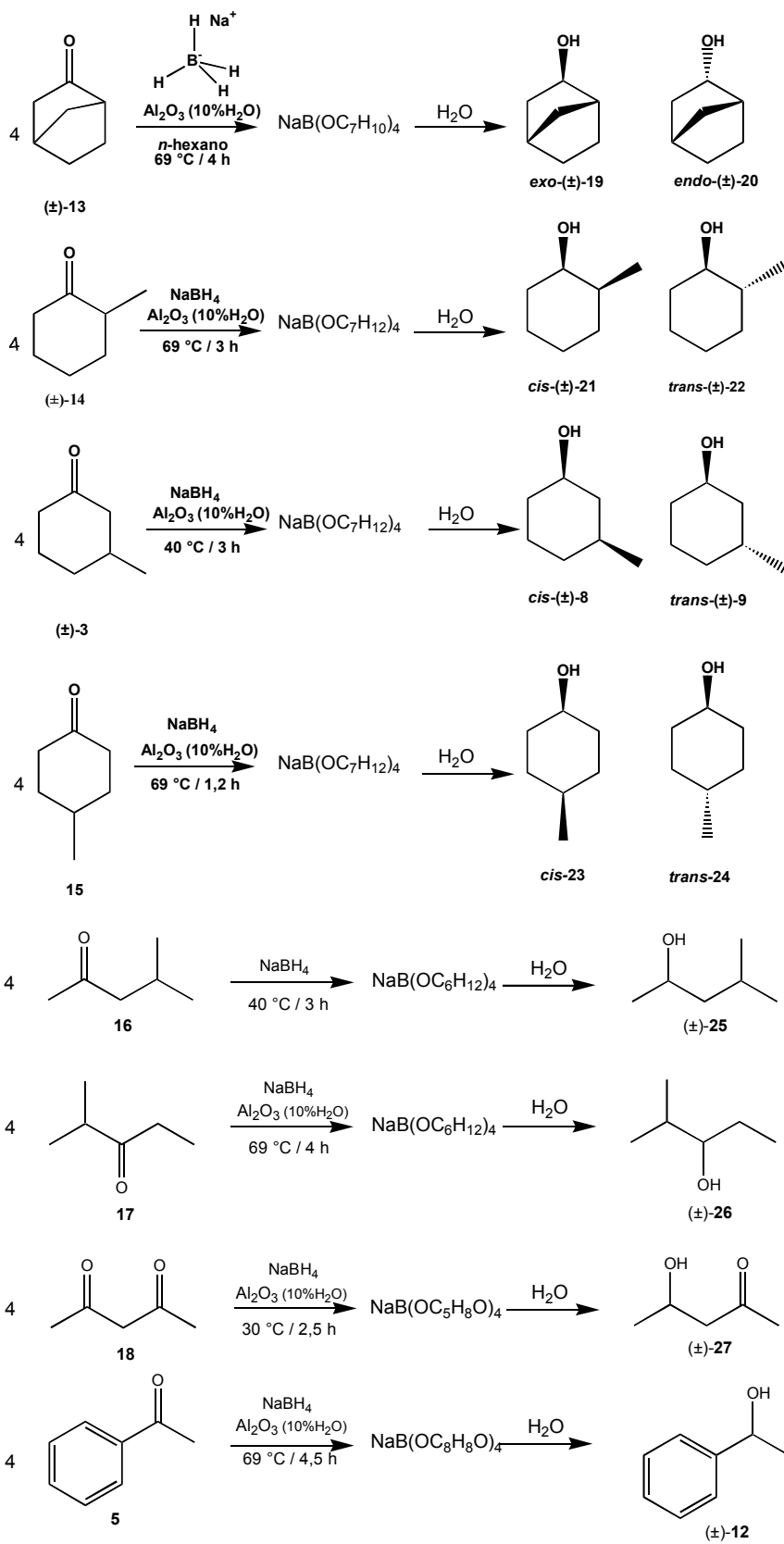
As reduções para obtenção dos padrões em hexano, com o emprego de alumina hidratada (10% m/m de água), foram de execução razoavelmente simples, com tempos de reação entre 1 e 4 horas, requerendo apenas filtração para a obtenção dos produtos em solução (*vide* ESQUEMA 3.2). O boro-hidreto de sódio foi utilizado em excesso, em quantidade entre 4 a 30 vezes a indicada pela estequiometria da reação, porém este método apresenta a possibilidade de reciclagem do boro-hidreto. O papel do óxido de alumínio consiste em servir como sítio de adsorção do boro-hidreto e das cetonas e em ceder a água complexada para o intermediário da reação. A água ligada à alumina rompe o retículo cristalino do NaBH₄, dispersando espécies ativas sobre o suporte, favorecendo a formação do intermediário de reação, e age na decomposição deste complexo de boro.

O método de Yakabe e colaboradores foi adaptado visando rendimentos quantitativos na obtenção dos alcoóis de interesse, através da realização das reações em temperaturas um pouco mais elevadas ou em refluxo a 69 °C, ou por incrementos de até 2 horas no tempo reacional, ou através do emprego de até 2 vezes a proporção redutor:cetona usada pelos autores. Para minimizar a perda de solvente por evaporação durante as reduções, optou-se por passar o argônio através de um *trap* contendo *n*-hexano, precedendo a introdução do gás na atmosfera reacional, mantida, dessa forma, saturada do solvente. Também se empregou uma conexão em Y (bifurcada), possibilitando a entrada do gás por uma via e sua saída por outra, sendo a extremidade de saída ligada a um *trap* com mercúrio.

As reduções da (±)-norcânfora (**13**), da (±)-2-metilciclo-hexanona (**14**), da (±)-3-metilciclo-hexanona (**3**) e da (±)-4-metilciclo-hexanona (**15**) se deram em 100% de conversão, enquanto os rendimentos relatados para a redução da 2-metilciclo-hexanona (**14**), da (±)-3-metilciclo-hexanona (**3**) e da (±)-4-metilciclo-hexanona (**15**) por Yakabe, Hirano e Morimoto foram de 87%, 93% e 91%, respectivamente.

O produto 2-metil-3-pentanol foi obtido com 100% de rendimento, enquanto o 4-metil-2-pentanol foi obtido juntamente com a cetona de partida, com 82% de rendimento. Já a 4-hidróxi-2-pentanona foi obtida com 45% de rendimento, determinado por cromatografia a gás convencional (**FID**) e identificada por CG/MS com ionização por feixe de elétrons ou por ionização química. O resultado atendeu às expectativas, tendo em vista que se empregaram condições reacionais brandas

ESQUEMA 3.2



(temperatura ambiente por 2,5 horas) e menor proporção redutor:cetona do que no caso das demais cetonas (1:4, ou seja, a razão estequiométrica), a fim de se lograr a adição de hidreto a apenas uma das carbonilas da 2,4-pentanodiona, descartando a suspeita de que a 4-hidróxi-2-pentanona fosse uma das substâncias interferentes nas análises (*vide* o item 3.3.1). Este resultado é, também, mais uma demonstração de que, neste método, é necessário fazer uso de quantidades de redutor superiores às indicadas pela razão estequiométrica, quando o objetivo é a conversão completa. Uma razão redutor:cetona de 30:1 garantiu o rendimento quantitativo dos produtos de redução da maior parte das cetonas em estudo. Estas cetonas-modelo, assim como a (\pm)-norcânfora, não foram investigadas no trabalho relatado na literatura (YAKABE, HIRANO & MORIMOTO, 1998).

O 1-fenil-1-etanol (**12**) foi inicialmente obtido com rendimento de 88%, inferior ao relatado por Yakabe *et al.* (98%), quando a reação foi realizada a 40 °C por 3 horas. A redução da acetofenona foi refeita a refluxo (69 °C), e por mais tempo, o que resultou em conversão completa. Além disso, foi preciso mais controle sobre a percentagem de água da alumina, já que o suporte se mostra essencial ao sucesso da reação, pois na ausência do mesmo a redução não ocorre em hexano e na presença de alumina seca não são detectadas quantidades apreciáveis dos produtos.

3.3. Origem da diastereosseletividade

Conforme relatado no item anterior (3.2), as conversões da (\pm)-norcânfora (**13**), da (\pm)-2-metilciclo-hexanona (**14**), da (\pm)-3-metilciclo-hexanona (**3**) e da (\pm)-4-metilciclo-hexanona (**15**) nos respectivos alcoóis, através da redução por boro-hidreto de sódio com alumina hidratada, em hexano, foi completa (*vide* Figura 3.1). Na redução da (\pm)-norcânfora (**13**), os produtos *exo*-(\pm)-norborneol (**19**) e *endo*-(\pm)-norborneol (**20**) foram obtidos com 13 e 87% de rendimento cromatográfico, respectivamente. Na redução da 2-metilciclo-hexanona (**14**), os produtos *cis*-(\pm)-2-metilciclo-hexanol (**21**) e o *trans*-(\pm)-2-metilciclo-hexanol (**22**) foram obtidos com 29 e 71% de rendimento cromatográfico, respectivamente. Já na redução da (\pm)-3-metilciclo-hexanona (**3**), os alcoóis *cis*-(\pm)-3-metilciclo-hexanol (**8**) e *trans*-(\pm)-3-metilciclo-hexanol (**9**) foram obtidos com rendimentos cromatográficos de 93 e 7%, respectivamente. Os rendimentos cromatográficos do *cis*-4-metilciclo-hexanol (**23**) e do *trans*-4-metilciclo-hexanol (**24**) para a redução da 4-metilciclo-hexanona (**15**) foram de 16 e 84%, respectivamente. Estas proporções diastereoisoméricas se encontram relacionadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Rendimento cromatográfico (CG/DIC e CG/EM) de isômeros geométricos obtidos por redução de cetonas.

CETONA ^a	ÁLCOOL (%)	
	<i>cis</i> / <i>exo</i>	<i>trans</i> / <i>endo</i>
Norcânfora	13	87
2-Metilciclo-hexanona	29	71
3-Metilciclo-hexanona	93	07
4-Metilciclo-hexanona	16	84

a. redução por NaBH₄, na presença de alumina hidratada, em hexano

Para explicar como se atribuiu a identidade aos compostos *cis* e *trans* supracitados, a partir de seus espectros de massas, um esquema de fragmentação com uma proposta para a interpretação dos espectros de massas obtidos para *cis*-(±)-3-metilciclo-hexanol (**8**) e **9** (Figuras 3.2 e 3.3) está apresentado na Figura 3.5, a seguir, considerando-se as conformações mais estáveis destes compostos (Figura 3.4).

Para o *cis*-(±)-3-metilciclo-hexanol (**8**), o pico-base é aquele cuja relação massa-carga é igual a 71, que resulta da homólise da ligação C1-C6, concertada com a eliminação de C4 (heterólise da ligação C3-C4, em verde, conforme representado na Figura 6). O estado de transição correspondente a essa fragmentação teria os carbonos C2 e C3 com cargas parciais positivas e algum caráter sp², ou seja, o mecanismo da fragmentação estaria em concordância com a regra de Saytzeff, com formação do alceno mais substituído.

O fragmento mais estável do espectro de massas do *trans*-(±)-3-metilciclo-hexanol (**9**) é aquele de m/z = 57, enquanto aquele de m/z = 71 aparece com menor intensidade. É plausível que as interações 1,3-diaxiais da hidroxila ionizada no íon-molecular do composto **9** desestabilizem-no de modo a induzir a ruptura precoce da ligação C2-H ou C6-H, com desenvolvimento de carga negativa no carbono que perde o próton. Logo, o grupamento metila em C3, como doador de elétrons, aumenta a energia do complexo ativado quando a ligação C2-H começa a se romper. Portanto, o rompimento da ligação C6-H, concertado com a heterólise da ligação C4-C5 (em verde), fica relativamente favorecido.

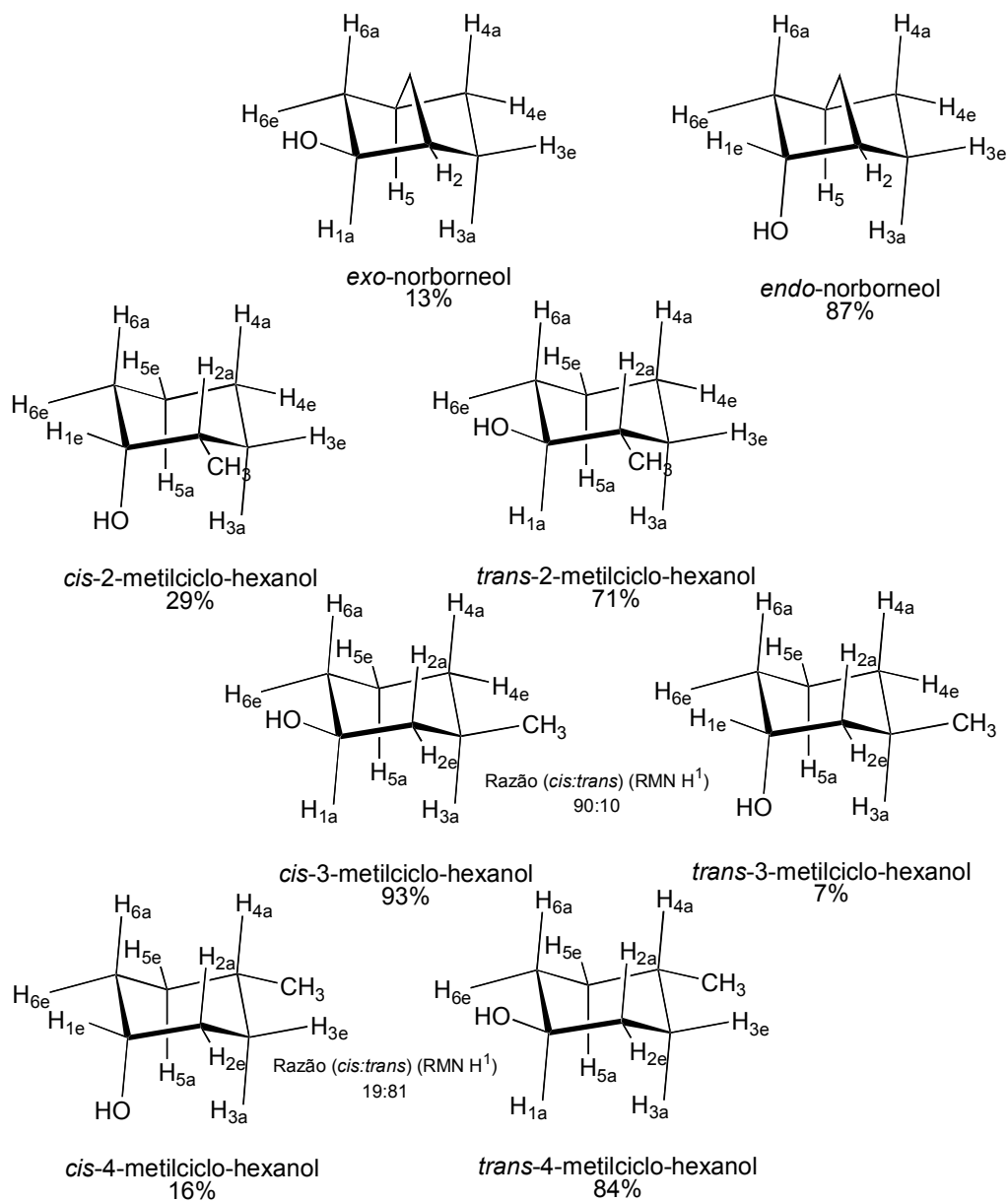


Figura 3.1: Produtos isoméricos da redução química de **13**, **14**, **3** e **15**, considerando a conformação mais estável de **14**, **3** e **15**. São dados rendimentos determinados por CG/EM e razões molares determinadas por RMN ^1H .

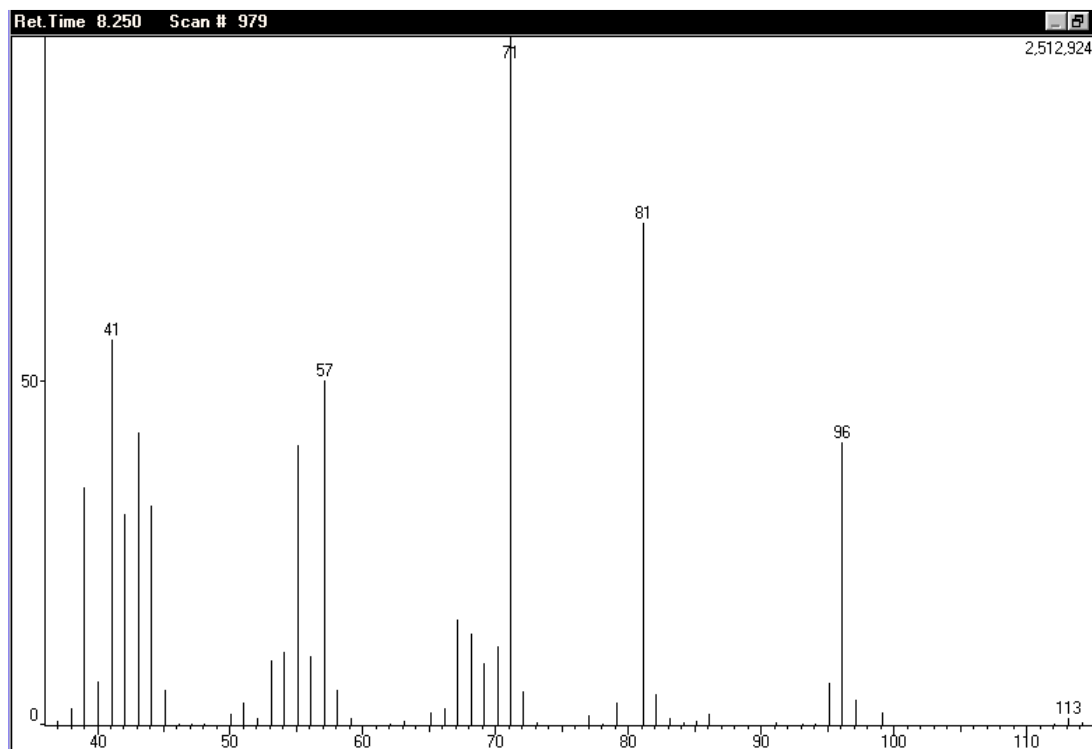


Figura 3.2: Espectro de massas do *cis*-(±)-3-metilciclo-hexanol (8).

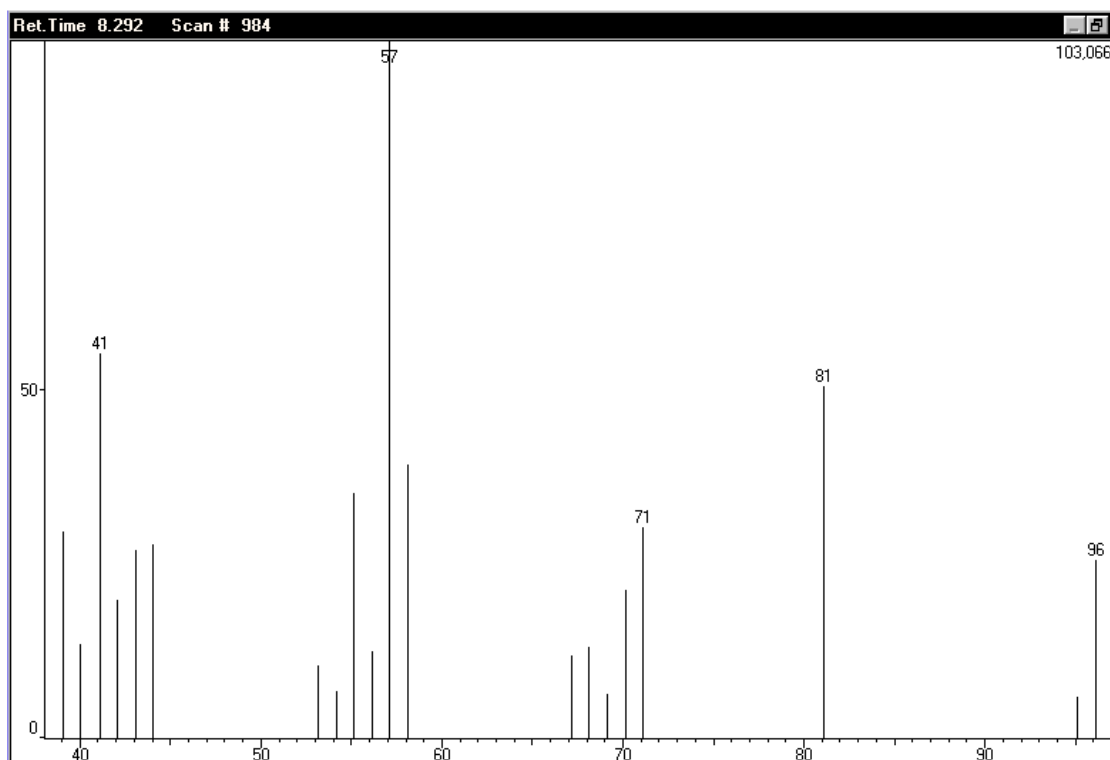


Figura 3.3: Espectro de massas do *trans*-(±)-3-metilciclo-hexanol (9).

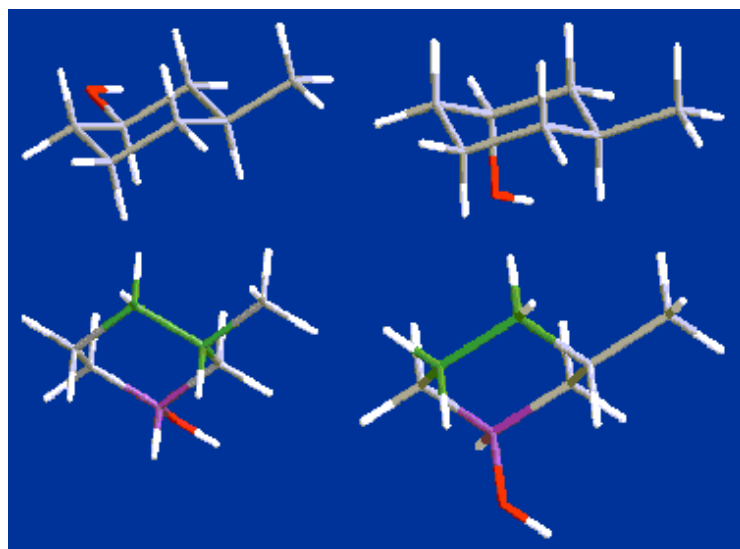


Figura 3.4: Visão tridimensional de *cis*-(±)-3-metilciclo-hexanol (**8**, à esquerda) e do *trans*-(±)-3-metilciclo-hexanol (**9**, à direita).

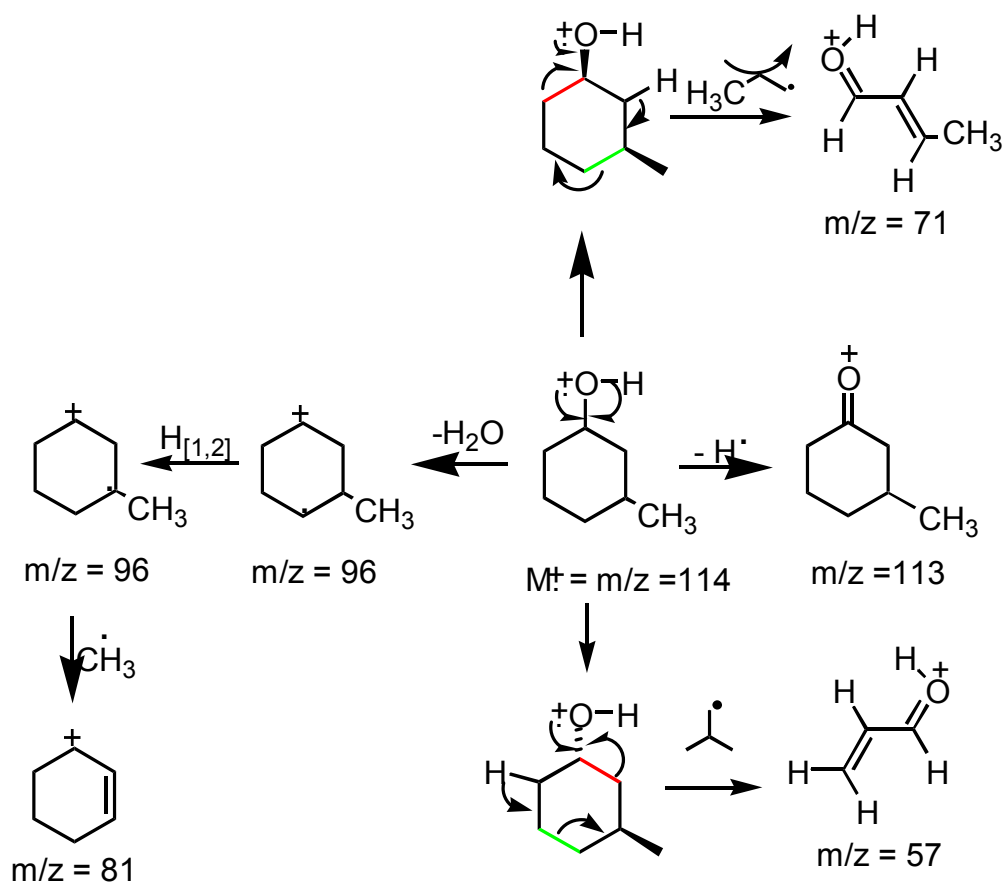


Figura 3.2: Proposta de fragmentação para 3-metilciclo-hexanol.

O resultado obtido por cromatografia a gás com detecção por espectrometria de massas com ionização por impacto eletrônico foi confirmado por dados obtidos do espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H , para a redução da (\pm)-3-metilciclohexanona (**3**) e da 4-metilciclohexanona (**15**), do qual se tem que a razão molar entre *cis*-3Me e *trans*-3Me é de 90%:10%. Para tanto, compararam-se as intensidades relativas dos sinais devidos aos hidrogênios CH-OH (3,565 ppm (tt, $J_{ax} = 7,3\text{Hz}$); 1,000 e 3,718 ppm (tt, $J_{ax} = 4,5\text{Hz}$); 0,106) de ambas espécies que, certamente, devem ter tempos de relaxamento semelhantes (veja Figura 3.2). Além disso, o espectro foi adquirido com um intervalo de 4,87 segundos entre os pulsos de radiofrequência para que a intensidade relativa dos picos observados para os hidrogênios fosse pouco distorcida pelas eventuais diferenças existentes entre os tempos de relaxamento dos hidrogênios presentes nas duas estruturas-problema. Já a razão molar entre *cis*-4Me e *trans*-4Me é de 19%:81%, determinada pela interpretação do espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H dos produtos de redução da (\pm)-4-metilciclohexanona, consideradas as médias obtidas das integrações relativas para os sinais devidos à metila e ao H *ipso* à metila, para os dois isômeros. Para tanto, compararam-se as intensidades relativas dos sinais devidos aos hidrogênios CH-OH (3,937 ppm (ml; 0,2) e 3,536 ppm (tt, $J_{ax} = 4,5\text{Hz}$); 1,00) dos isômeros *cis* e *trans*, respectivamente. O mesmo foi feito para os sinais devidos às metilas dos isômeros *cis* e *trans*, cujos deslocamentos químicos foram de 0,916 ppm (**d**, $J_{ax} = 5,6\text{ Hz}$; 0,87) e 0,879 ppm (**d**, $J_{ax} = 6,6\text{ Hz}$; 3,28). Neste caso, o espectro foi adquirido com um intervalo de 6,67 segundos entre os pulsos de radiofrequência.

Deduz-se que, no estado de transição que origina os produtos majoritários supra-citados, não se desenvolvem interações diaxiais do oxigênio, admitindo que o grupo metila sempre ocupe a posição equatorial. É provável que o produto *endo*-(\pm)-norborneol seja o majoritário por não se desenvolverem, no estado de transição, interações entre o oxigênio e o lado mais congestionado do ciclo, assim como não há interações diaxiais do oxigênio no complexo ativado que origina os intermediários que darão origem aos compostos *trans*-(\pm)-2-metilciclohexanol, *cis*-(\pm)-3-metilciclohexanol e *trans*-(\pm)-4-metilciclohexanol.

Agentes redutores como boro-hidreto de sódio (NaBH_4) ou tetra-hidretoaluminato de lítio (LiAlH_4) são tradicionalmente empregados na redução do grupo carbonila. A quimiosseletividade do boro-hidreto de sódio é conhecida: este não costuma reduzir ligações duplas carbono-carbono, mesmo quando conjugadas ao grupo carbonila e, portanto, tem aplicação na redução deste tipo de composto a alcoóis insaturados. Entretanto, a origem da diastereosseletividade observada na redução das cetonas-

modelo por boro-hidreto de sódio, em que ocorre a adição nucleófila de hidreto ao carbono carbonílico, ainda não era bem estabelecida. Em 2009, no trabalho de Suzuki, Kaneno e Tomoda, a determinação da estrutura do complexo ativado com o uso de aplicativos específicos permitiu a predição da razão diastereoisomérica entre os produtos de redução de cetonas cíclicas substituídas, considerando a distribuição de Boltzmann, com base nas energias relativas ao estado de transição para o ataque do hidreto por cada um dos lados, demonstrando boa correlação com as razões diastereoisoméricas observadas experimentalmente. O modelo de complexo ativado proposto tem a participação do cátion sódio, além do ânion boro-hidreto e uma molécula do composto carbonílico em sua conformação mais estável, e evidencia a preferência pelo ataque axial do hidreto, que, conseqüentemente, explica a tendência observada na proporção entre isômeros *cis* e *trans*.

CAPÍTULO 4:

ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA A GÁS

4.1. Seleção de condições cromatográficas

Dentre as três colunas inicialmente testadas nas análises cromatográficas, a saber: Shimadzu CBP-20, com revestimento interno de polietilenoglicol; Hewlett-Packard HP-5, com revestimento interno contendo 5% de fenilmetilsilicone; e Quadrex 007, com revestimento interno de metilsilicone; apenas a Shimadzu CBP-20 separava eficientemente as cetonas de seus respectivos álcoois. No entanto, a interação desses compostos com a coluna se traduziu em picos largos e baixos induzindo, necessariamente, ao aumento da concentração-limite de detecção. Além disso, essa coluna não resolve muito bem entre álcoois estereoisoméricos, mesmo em baixa temperatura (40 °C). Já com a coluna capilar HP-FFAP, com revestimento interno de polietilenoglicol modificado com ácido nitrotereftálico e 50 metros de comprimento, se obtiveram picos com melhor resolução entre álcoois isômeros e com melhor razão sinal/ruído, além de o pico ter menor largura à meia-altura, indicando que os erros associados às interações existentes entre a antiga fase estacionária e o analito foram adequadamente minimizados.

Já as determinações de excessos enantioméricos foram realizadas na coluna Supelco Astec Chiraldex™ B-PM, 50 m, com revestimento interno de β -ciclodextrina derivatizada. Dentre as cetonas-modelo submetidas a ensaios de biotransformação, apenas as ciclohexanonas metil ou metileno-substituídas apresentaram rendimentos correspondentes a concentrações nas amostras da ordem de 100 vezes o limite de detecção ou superiores. Observou-se que a separação entre os enantiômeros dos álcoois foi mais eficiente que entre os enantiômeros das correspondentes cetonas estudadas. Também se verificou a inversão da ordem de saída da coluna entre os isômeros *cis* e *trans* do 2-metilciclo-hexanol, ficando o *trans* menos retido que o *cis* nesta coluna, enquanto na coluna HP-FFAP ocorre o inverso. As misturas racêmicas do composto norcânfora, 3-metilciclo-hexanona e seus correspondentes álcoois, e do *trans*-2-metilciclo-hexanol não foram eficientemente separadas nesta coluna nas condições testadas e, por isso, a resolução entre seus picos foi considerada inadequada para quantificar os excessos enantioméricos, enquanto a 4-metilciclo-hexanona e os correspondentes álcoois não apresentam isômeros óticos. Portanto, a avaliação da resolução dos racematos de cetona empregados como substrato foi determinada apenas para a 2-metilciclo-hexanona, enquanto os excessos enantioméricos dos produtos de redução foram calculados para o *exo*-norborneol, para o *endo*-norborneol e para o *cis*-2-metilciclo-hexanol e a configuração absoluta foi estabelecida para o (+) e o (-)-*endo*-norborneol, por comparação entre seus tempos de retenção e os de padrões comerciais.

4.2. Método de quantificação

Os fatores de resposta do detector de ionização de chama (FID) para as diferentes funcionalidades químicas são necessários para a quantificação das biotransformações por cromatografia a gás. Para isso, as curvas de calibração (equação 1) foram confeccionadas pela razão entre os valores de concentração e área dos picos dos compostos norcânfora (**13**), *exo*-norborneol (**19**), 2-metilciclo-hexanona (**14**), *trans*-2-metilciclo-hexanol (**22**), 3-metilciclo-hexanona (**3**), *cis*-3-metilciclo-hexanol (**8**), 4-metilciclo-hexanona (**15**), *trans*-4-metilciclo-hexanol (**24**), 4-metil-2-pentanona (**16**), 4-metil-2-pentanol (**25**), 2-metil-3-pentanona (**17**), 2-metil-3-pentanol (**26**) e acetofenona (**5**); e os valores de concentração e área dos picos do padrão interno (ciclo-hexanona, **1**), com o cromatógrafo munido da coluna capilar HP-FFAP. No caso das curvas de calibração para a ciclo-hexanona (**1**) e para o ciclo-hexanol (**6**), necessárias à quantificação dos ensaios iniciais de biotransformação, a coluna empregada foi a Shimadzu CBP-20 e o padrão interno utilizado foi o propilenoglicol. Os fatores de resposta assim determinados estão apresentados na Tabela 4.1 (coeficiente angular da reta correspondente à equação 1, obtido pelo método da regressão linear, fazendo a curva passar pelo zero e adotando-se o desvio padrão da média como peso para as medidas). Admitiu-se que o fator de resposta dos compostos **20**, **21**, **9** e **23** fosse equivalente ao de seus respectivos isômeros, já que a quantidade e a carga total de espécies iônicas geradas na chama do detector não devem diferir significativamente no caso dessas substâncias.

$$(A_C / A_{p.i.}) = F \cdot ([C] / [p.i.]) \quad (\text{equação 1})$$

Sendo:

F = coeficiente angular ou fator de resposta,

A_C = área do pico do composto,

A_{p.i.} = área do pico do padrão interno,

[C] = concentração do composto,

[p.i.] = concentração do padrão interno.

Tabela 4.1: Fatores de resposta do detector FID, em relação à ciclo-hexanona

Composto	Fator de resposta	Coeficiente de correlação
Ciclo-hexanona	2,23 ^a ± 0,02	0,9909
Ciclo-hexanol	3,82 ^a ± 0,02	0,9986
Norcânfora	1,0027 ± 0,0004	0,99999
Norborneol	1,2614 ± 0,0002	0,99973
2-Metilciclo-hexanona	1,1079 ± 0,0009	0,9969
2-Metilciclo-hexanol	1,4881 ± 0,0009	0,9998
3-Metilciclo-hexanona	1,1758 ± 0,0005	0,9997
3-Metilciclo-hexanol	1,5128 ± 0,0005	0,9995
4-Metilciclo-hexanona	0,931 ± 0,001	0,99750
4-Metilciclo-hexanol	1,134 ± 0,005	0,99840
4-Metil-2-pentanona	1,246 ± 0,007	0,9995
4-Metil-2-pentanol	1,538 ± 0,001	0,9999
2-Metil-3-pentanona	1,192 ± 0,004	0,9992
2-Metil-3-pentanol	1,471 ± 0,003	0,9993
Acetofenona	1,52 ± 0,01	0,99922

^a Em relação ao padrão interno propilenoglicol.

4.3. Validação do método analítico

O método de quantificação das biotransformações em culturas de células vegetais e em homogenatos de tecidos vegetais foi avaliado com base no “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”, Resolução ANVISA/MS nº 899, de 29 de maio de 2003, publicado no D.O.U. de 02/06/2003.

4.3.1. Especificidade e seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de possíveis interferentes (impurezas, metabólitos, produtos de degradação e componentes da matriz).

Algumas das cetonas comerciais não foram consideradas suficientemente puras para a quantificação dos experimentos de biotransformação: a norcânfora (98%) apresentava cerca de 2% de *exo*-norborneol, a 3-metilciclo-hexanona (97%) continha *cis*-3-metilciclo-hexanol (0,1%) e *trans*-3-metilciclo-hexanol (0,2%) e a acetofenona (98%) continha cerca de 0,04% de 1-fenil-1-etanol, enquanto a 4-metil-2-pentanona (98%) continha substância não identificada com tempo de retenção próximo ao do 4-metil-2-pentanol (0,2% da área da 4-metil-2-pentanona), por isso, foram submetidas a tratamentos de recristalização em metanol (norcânfora) ou destilação fracionada até que não se detectassem mais os alcoóis citados.

Na análise das cetonas cíclicas e dos correspondentes alcoóis na coluna HP-FFAP se avaliou a interferência entre compostos estruturalmente semelhantes: os tempos de retenção dos isômeros foram comparados, com base em uma amostra produzida com todas as substâncias elencadas na Tabela 4.2, em acetona P.A., a partir de padrões comerciais de ciclo-hexanona (**1**), norcânfora (**13**), *exo*-norborneol (**19**), 2-metilciclo-hexanona (**14**), *trans*-2-metilciclo-hexanol (**22**), 3-metilciclo-hexanona (**3**), 4-metilciclo-hexanona (**15**) e *trans*-4-metilciclo-hexanol (**24**); enquanto os demais alcoóis foram obtidos da redução das cetonas correspondentes com boro-hidreto de sódio. Cada substância usada para preparar a amostra e o solvente foi, também, analisada em separado. A amostra com todas as substâncias elencadas foi analisada em três momentos distintos, com intervalo de um mês entre a obtenção dos cromatogramas sendo, neste ínterim, deixada exposta ao calor e à radiação solares. A razão percentual dos interferentes foi dada com base na razão entre as áreas deste e a da ciclo-hexanona. O interferente com tempo de retenção de 16,5 minutos é uma impureza da acetona. A resolução entre os picos das cetonas, dos alcoóis correspondentes e do padrão interno, assim como a resposta dos interferentes (inferiores a 0,3% da resposta da ciclo-hexanona), foram consideradas adequadas para os propósitos delineados neste trabalho. Cumpre ressaltar que, nas alíquotas obtidas de biotransformações para análise havia: a cetona de partida, os correspondentes alcoóis e o padrão interno (ciclo-hexanona), não sendo analisados, simultaneamente, outros isômeros de posição.

Já a análise das substâncias relacionadas na Tabela 4.3 foi avaliada com outra programação de temperatura, seguindo o mesmo procedimento descrito para a avaliação das cetonas cíclicas e dos correspondentes alcoóis, com uma amostra produzida com padrões comerciais de ciclo-hexanona (**1**), 4-metil-2-pentanona (**16**), 4-metil-2-pentanol (**25**) e 2-metil-3-pentanona (**17**), enquanto o 2-metil-3-pentanol (**26**) foi obtido da redução química. A resolução entre os picos e a concentração estimada de interferentes foram consideradas adequadas para os propósitos delineados neste trabalho.

Tabela 4.2: Tempos de retenção das ciclo-hexanonas e dos correspondentes alcoóis

COMPOSTO	Cmolar/ 10 ⁻³ mol/L	TEMPOS DE RETENÇÃO (min)		
		T.R.1	T.R.2	T.R.3
Ciclo-hexanona	5,6	13,177	13,137	12,924
2-Metilciclo-hexanona	1,8	14,017	13,917	13,404
3-Metilciclo-hexanona	1,6	14,745	14,717	14,698
4-Metilciclo-hexanona	2,0	15,297	15,192	14,959
Interferente não identificado (0,3%)		16,521	16,505	16,349
Norcânfora	1,7	18,257	18,254	18,022
<i>cis</i> -2-Metilciclo-hexanol	1,7	19,167	19,133	18,983
<i>trans</i> -2-Metilciclo-hexanol	1,8	19,998	20,001	19,901
<i>trans</i> -3-Metilciclo-hexanol	1,7	20,436	20,354	20,275
Interferente não identificado (0,3%)		20,714	20,672	20,487
<i>cis</i> -4-Metilciclo-hexanol	1,8	20,828	20,805	20,732
<i>cis</i> -3-Metilciclo-hexanol	1,8	22,005	21,869	21,780
Interferente não identificado (0,2%)		22,236	-	-
<i>trans</i> -4-Metilciclo-hexanol	1,9	22,595	22,445	22,434
<i>exo</i> -Norborneol	1,7	25,124	25,117	25,006
<i>endo</i> -Norborneol	1,8	26,074	26,078	25,975

Coluna HP-FFAP 50 m.

Programação de temperatura: 50 °C por 0 min, 10 °C/min até 100 °C, 100 °C por 19 min

A análise da acetofenona (**5**) não apresentou interferentes em nenhuma das análises de amostras produzidas com acetofenona (tempos de retenção entre 11,942 e 12,074 minutos) e/ou 1-fenil-1-etanol (tempos de retenção entre 14,588 e 14,713 minutos), mesmo naquelas deixadas expostas ao calor e à luz.

Foram produzidas amostras contendo as cetonas e os correspondentes alcoóis: (±)-2-metilciclo-hexanona, (±)-*cis*-2-metilciclo-hexanol e (±)-*trans*-2-metilciclo-hexanol, que foram analisadas na coluna Supelco Astec Chiraldex™ B-PM, enquanto as soluções de (±)-norcânfora e dos isômeros (±)-*exo*-norborneol e (±)-*endo*-norborneol foram analisadas em outra programação linear de temperatura, em temperaturas mais elevadas, com 3 (três) medidas para cada amostra, tomadas em dias diferentes. Nas condições indicadas na Tabela 4.4, a resolução (equação 2) entre os picos de pares de enantiômeros iguais ou

superiores a 0,82 foram aceitos, enquanto a não separação entre os picos de enantiômeros (para (±)-norcânfora e (±)-*trans*-2-metilciclo-hexanol) impossibilitou a determinação de excessos enantioméricos, nesses casos. As tentativas de otimização da resolução para estas substâncias não foram bem sucedidas, uma vez que o tempo de análise aumentava significativamente sem que se observasse resolução aceitável entre os picos de enantiômeros, assim como na análise da 3-metilciclo-hexanona e de seus correspondentes alcoóis.

$$R = 2\Delta t / (t_{w1} + t_{w2}) \quad (\text{equação 2})$$

Sendo:

R = resolução entre os picos de enantiômeros,

Δt = diferença entre os tempos de retenção dos picos,

t_{w_n} = largura da base do pico (em minutos).

Em todas as análises de amostras obtidas de homogenatos foram incluídos controles, em duplicata, de homogenatos aos quais não foi adicionada nenhuma das cetonas-modelo. Para todas as espécies vegetais consideradas, não foram detectados interferentes em nenhum dos intervalos de tempo de retenção em que eram detectados os analitos.

Tabela 4.3: Tempos de retenção das cetonas lineares, dos correspondentes alcoóis e da ciclo-hexanona

COMPOSTO	Cmolar/ 10 ⁻³ mol/L	TEMPOS DE RETENÇÃO (min)		
		T.R.1	T.R.2	T.R.3
2-metil-3-pentanona	1,9	6,222	6,217	6,255
4-metil-2-pentanona	1,8	6,416	6,382	6,433
Interferente não identificado (0,2%)		9,068	9,068	9,215
2-metil-3-pentanol	1,7	9,119	9,116	9,396
4-metil-2-pentanol	1,9	9,472	9,467	9,508
Ciclo-hexanona	2,8	15,635	15,065	15,723

Coluna HP-FFAP 50 m.

Programação de temperatura: 40 °C por 0 min, 10 °C/min até 90 °C, 90 °C por 8 min, 20 °C/min até 110 °C, 110 °C por 2 min.

Tabela 4.4: Tempos de retenção de cetonas e dos correspondentes alcoóis na coluna quiral

COMPOSTO	Cmolar/ 10 ⁻³ mol/L	Enantiômero ^x	TEMPOS DE RETENÇÃO (min)		
			T.R.1	T.R.2	T.R.3
Norcânfora	2,1	(±)	5,917	5,854	5,968
<i>exo</i> -Norborneol	1,8	1	7,127	7,011	7,145
		2	7,223	7,108	7,240
<i>endo</i> -Norborneol	1,9	(+)	7,395	7,385	7,399
	1,8	(-)	7,490	7,483	7,520
2-Metilciclo-hexanona	2,0	1	8,156	8,280	8,296
		2	8,220	8,348	8,370
<i>trans</i> -2-Metilciclo-hexanol	1,9	(±)	9,900	10,281	10,337
<i>cis</i> -2-Metilciclo-hexanol	2,0	1	10,637	10,923	10,960
		2	10,739	11,020	11,032

Coluna Supelco Astec ChiralDEX™ B-PM 50 m.

Programação de temperatura para norcânfora, *exo*-norborneol e *endo*-norborneol: 80 °C por 0 min, 10 °C/min até 120 °C, 120 °C por 6 min.

Programação de temperatura para 2-metilciclo-hexanona, *cis*-2-metilciclo-hexanol e *trans*-2-metilciclo-hexanol: 50 °C por 0 min, 10 °C/min até 90 °C, 90 °C por 9 min.

4.3.2. Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

A curva de calibração, neste caso, incluiu a análise da amostra branco (amostra de homogenato com 45% de acetona P.A., isento das outras cetonas, alcoóis e do padrão interno), da amostra zero (homogenato com o padrão interno, em acetona) e de 5 (cinco) amostras em concentrações diferentes, em duplicata, de cada uma das substâncias elencadas na Tabela 4.1 do item 4.2, com o padrão interno, do limite inferior de quantificação (vide o item 4.3.5) até a concentração mais alta (entre 1,7 e 2,0 × 10⁻² mol/L), em homogenatos com 45% de acetona centrifugados (sem atividade enzimática).

As curvas de calibração de todas as substâncias foram consideradas adequadas de acordo com os seguintes critérios de aceitação:

Nenhuma das concentrações analisadas apresentou desvio maior ou igual a 15% em relação à concentração nominal, sendo os maiores desvios iguais a 3,1%, na análise da ciclo-hexanona, e 2,6%, na análise da acetofenona.

Os coeficientes de correlação lineares, relacionados na Tabela 4.1 do item 4.2, eram todos superiores a 0,98.

4.3.3. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma mesma amostra. Foi avaliada em nível de precisão intra-corrída (repetibilidade) e precisão inter-corrídas (precisão intermediária).

Foram realizadas 6 determinações com amostras de cada uma das substâncias elencadas na Tabela 4.1, em concentrações entre 8,2 e 10,0 × 10⁻⁵ mol/L, com intervalo aproximado de um mês entre as determinações.

A precisão do método foi considerada adequada, já que nenhum dos analitos considerados apresentou desvio maior ou igual a 20% em relação à concentração média determinada, sendo o maior desvio igual a 17%. O valor máximo aceitável foi definido em 20%, já que nestas amostras os analitos estavam em concentrações próximas ao limite inferior de quantificação.

A reprodutibilidade foi avaliada apenas para as biotransformações da norcânfora em homogenatos obtidos de folhas de *Bauhinia variegata*, coletadas por volta das 10 horas da manhã, em 96 horas de biotransformação. O ensaio foi realizado em dezembro de 2008, com folhas coletadas da mesma árvore e no mesmo horário do ensaio de referência, realizado em dezembro de 2007. Os resultados se encontram relacionados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Recuperação do substrato e rendimentos cromatográficos percentuais em ensaios de biotransformação em homogenatos de *B. variegata*

ANALITO	CO-FATORES					
	Não adicionado		NADPH		NADH	
	ENSAIO					
	1	2	1	2	1	2
Norcânfora	97 ± 2	95 ± 2	96 ± 1	96 ± 2	97 ± 2	95 ± 3
<i>exo</i> -Norborneol	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,1	1,5 ± 0,4	1,8 ± 0,6	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,0
<i>endo</i> -Norborneol	-	-	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0	-	-

Os espaços com – traduzem a não detecção do composto na condição tabelada.

4.3.4. Limite de detecção

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

A estimativa dos limites de detecção foi feita com base na relação de **3 vezes o ruído da linha de base**, com base na curva de calibração construída com amostras com concentrações dos analitos entre $3,8 \times 10^{-5}$ mol/L e $1,9 \times 10^{-3}$ mol/L, com 3 (três) medidas para cada concentração. Deste modo, puderam ser determinados pela equação 3; os resultados se encontram relacionados na Tabela 4.6. Os limites de detecção dos alcoóis equivalem a aproximadamente 0,05% de rendimento nos ensaios de biotransformação com homogenatos obtidos de folhas.

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad (\text{equação 3})$$

Sendo:

DP_a = desvio padrão da área referente ao intercepto com o eixo Y da curva de calibração.

IC = inclinação da curva de calibração (coeficiente angular obtido pelo método da regressão linear, sem fazer a curva passar pelo zero e adotando-se o desvio padrão das áreas dos picos como peso para as medidas).

Tabela 4.6: Limites de detecção das cetonas-modelo e dos correspondentes alcoóis

LIMITES DE DETECÇÃO			
COMPOSTO	Cmolar/ 10^{-6} mol/L	COMPOSTO	Cmolar/ 10^{-6} mol/L
Norcânfora	5,4	<i>trans</i> -4-Metilciclo-hexanol	3,7
exo-Norborneol	3,3	4-Metil-2-pentanona	5,9
2-Metilciclo-hexanona	5,3	4-Metil-2-pentanol	3,4
<i>trans</i> -2-Metilciclo-hexanol	3,1	2-Metil-3-pentanona	6,1
3-Metilciclo-hexanona	5,1	2-Metil-3-pentanol	4,3
<i>cis</i> -3-Metilciclo-hexanol	2,8	Acetofenona	4,1
4-Metilciclo-hexanona	5,9	1-Feniletanol	2,4

4.3.5. Limite de quantificação

O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis.

Foram produzidas 5 (cinco) amostras de padrão para cada uma das substâncias relacionadas na Tabela 4.6, com concentrações entre 1,1 e $1,4 \times 10^{-5}$ mol/L, que foram escolhidas para manter a relação sinal-ruído aproximadamente igual a 10:1 (*vide* o item 4.3.4. “Limite de detecção”). O pico de resposta dos analitos foi identificável e reproduzível com desvios de até 20% em relação à concentração média determinada e exatidão (razão percentual entre as médias e o valor nominal) entre 80 e 120 %.

4.3.6. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

A exatidão foi calculada como a razão percentual entre as médias e o valor nominal. Foi determinada a partir de amostras, em triplicata, em 3 (três) concentrações distintas dos analitos, contemplando o intervalo linear do procedimento. Todos os valores encontrados estavam entre 88 e 110%.

4.3.7. Intervalo analítico

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta linearidade (item 4.3.2), precisão (item 4.3.3) e exatidão (item 4.3.6) adequadas à aplicação. Os limites destes intervalos, para cada um dos analitos, se encontram listados na Tabela 4.7.

4.3.8. Recuperação

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação.

Os resultados analíticos de amostras extraídas do meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), com 3 porções de acetato de etila, em duplicata, foram comparados com os resultados obtidos com soluções de padrão não extraídas, que representam 100% de

recuperação, em concentrações entre $8,5$ e $10,0 \times 10^{-3}$ mol/L, contemplando a faixa de linearidade do método. Os resultados obtidos estão relacionados na Tabela 4.8, a seguir.

As amostras para a determinação da recuperação a partir de homogenatos para **CG/FID** foram obtidas por adição de soluções dos padrões, em separado, de modo que a concentração final ficasse entre $8,5$ e $10,0 \times 10^{-3}$ mol/L, e imediatamente após, de acetona a -20 °C, para promover a precipitação das proteínas. Após intervalos de tempo de, no mínimo, 24 horas, a -20 °C, procedia-se à centrifugação das amostras e à adição do padrão interno (ciclo-hexanona) em concentração conhecida, de modo que a solução resultante contivesse cerca de 45% de acetona. As razões entre as áreas do composto e do padrão interno foram relacionadas entre estas amostras e aquelas preparadas pela adição do analito e do padrão interno a soluções de água/acetona (55:45). Os valores de recuperação ficaram entre 97 e 100%.

Tabela 4.7: Intervalo entre os limites de quantificação superior e inferior das cetonas-modelo e dos correspondentes alcoóis

COMPOSTO	LQ inferior/ 10^{-5} mol/L	LQ superior/ 10^{-2} mol/L
Norcânfora	1,1	1,7
exo-Norborneol	1,1	1,7
2-Metilciclo-hexanona	1,2	1,8
trans-2-Metilciclo-hexanol	1,2	1,8
3-Metilciclo-hexanona	1,1	1,6
cis-3-Metilciclo-hexanol	1,2	1,8
4-Metilciclo-hexanona	1,4	2,0
trans-4-Metilciclo-hexanol	1,3	1,9
4-Metil-2-pentanona	1,2	1,8
4-Metil-2-pentanol	1,3	1,9
2-Metil-3-pentanona	1,3	1,9
2-Metil-3-pentanol	1,1	1,7
Acetofenona	1,1	1,7
1-Feniletanol	1,1	1,7

Tabela 4.8: Rendimento percentual da extração das cetonas-modelo e dos correspondentes alcoóis com acetato de etila.

COMPOSTO	RECUPERAÇÃO PERCENTUAL
Norcânfora	85 ± 3
<i>exo</i> -Norborneol	81 ± 2
2-Metilciclo-hexanona	87 ± 5
<i>trans</i> -2-Metilciclo-hexanol	84 ± 6
3-Metilciclo-hexanona	92 ± 4
<i>cis</i> -3-Metilciclo-hexanol	88 ± 4
4-Metilciclo-hexanona	91 ± 8
<i>trans</i> -4-Metilciclo-hexanol	86 ± 5
4-Metil-2-pentanona	84 ± 3
4-Metil-2-pentanol	82 ± 2

4.3.9. Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal.

As amostras em soluções dos homogenatos com acetona usadas nos ensaios de recuperação (item 4.3.8) foram deixadas expostas ao calor e à radiação solares durante 6 meses. As razões entre as áreas do composto e do padrão interno foram relacionadas entre estas amostras e aquelas preparadas pela adição do analito e do padrão interno a soluções de água/acetona (55:45) recém-preparadas. Os valores de recuperação ficaram entre 96 e 100%, indicando que estas soluções são relativamente estáveis.

As amostras de homogenatos obtidos de folhas de *Bauhinia variegata* utilizadas no ensaio de reprodutibilidade descrito no item 4.3.3 foram submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento (as amostras permaneciam 48 horas à temperatura ambiente) entre janeiro de 2009 e janeiro de 2011, e foram analisadas a cada 5 ciclos, sendo comparadas as intensidades dos sinais de cada uma das substâncias, inclusive do padrão interno, com os sinais obtidos na análise após o primeiro ciclo de congelamento e descongelamento. Após 20 ciclos de congelamento e descongelamento, as intensidades dos sinais da norcânfora e da ciclo-hexanona caíram para menos de 60% das intensidades

médias dos sinais observadas na primeira análise e os produtos de redução não foram mais detectados nestas amostras.

Constatou-se, também, que o método é susceptível a variações nos tempos de retenção dos analitos em função de variações na velocidade do gás de arraste e na temperatura, mas esta limitação foi controlada evitando-se alterar a vazão do gás de arraste, ajustando esta vazão quando eram observados tempos de retenção fora dos intervalos delimitados pelos valores citados no item 4.3.1, para cada composto, e mantendo constante a temperatura da sala do cromatógrafo.

Além disso, foram produzidas 7 (sete) amostras de controle de qualidade para cada um dos substratos, contendo também todos os possíveis produtos de redução, no grupo carbonila. Para aferir com maior precisão o tempo de retenção dos compostos citados, que foram pesquisados nos homogenatos após incubação, essas amostras eram injetadas, manualmente, após a análise de 6 (seis) amostras de ensaios de biotransformação de um dado substrato.

CAPÍTULO 5:

**REDUÇÃO DE CETONAS POR
ESPÉCIES VEGETAIS**

5.1. Culturas de células em suspensão - estabelecimento, manutenção e biotransformações

5.1.1. Estabelecimento e manutenção de culturas de *Rauwolfia sellowii* em suspensão

Os meios de cultura e todo o material utilizado para conter culturas de células vegetais e as manipular devem ser adequadamente esterilizados, e as manipulações devem ser executadas em ambiente estéril. No caso, as culturas foram manipuladas em fluxo laminar horizontal e próximo à chama de um bico de Bunsen.

Para o estabelecimento das culturas, foram testados diferentes meios de cultura. Os principais componentes de um meio de cultura para células vegetais são: sais inorgânicos (micro e macro nutrientes), ferro complexado a um quelante, vitaminas, fontes de carbono, fitoreguladores e outros suplementos, que variam de acordo com a espécie e a variedade da planta. Para iniciar a formação de calos são retirados explantes da espécie vegetal de interesse, geralmente folhas jovens, que são submetidos a um processo de desinfecção superficial, seccionados em pequenas porções quadrangulares e transferidos para o meio de cultura, na forma semi-sólida. Caso o procedimento seja bem sucedido, o desenvolvimento do tecido de calo ocorre com a formação de uma massa celular indiferenciada e desorganizada nas placas de cultura. No meio MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962), os tecidos de calo de *R. sellowii* cresceram muito pouco, adaptando-se melhor ao meio B5 (GAMBORG, MILLER, OJIMA, 1968), no qual duplicaram a massa inicial em 14 dias, ainda considerado um crescimento lento. A partir de então, foram transferidos para o meio líquido.

Adicionalmente, foram variadas as concentrações de fito-hormônios. As concentrações de cinetina foram variadas por serem as citocininas de suma importância na promoção do crescimento e da divisão celulares. A atuação das citocininas inclui também o retardo da senescência das plantas, conseqüentemente, o tipo e a concentração de citocinina influenciam o processo de multiplicação *in vitro* e a manutenção de culturas de células em suspensão. Já as auxinas, entre elas o picloram e o 2,4-D, têm como principal efeito o alongamento celular, com pequena atuação nos processos de multiplicação celular (EVANS, 2002). As concentrações expostas na Tabela X do item 5.X.X, em "Materiais e Métodos", foram selecionadas com base nos resultados de crescimento e multiplicação celular observados nas

culturas em suspensão, a partir do aumento visível da viscosidade do meio quando aumenta a densidade celular, assim como pelas medidas de massa fresca destas culturas (obtidas da filtração sob pressão reduzida).

5.1.2. Estabelecimento de culturas de *Cestrum amictum* em suspensão

Os tecidos de calo foram, inicialmente, produzidos pela inoculação de explantes de caule em placas de cultura com o meio MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962), acrescido de Phytigel™ (substituto de agar empregado em culturas de tecidos vegetais, composto de ácido glicurônico, ramnose e glicose) e reguladores de crescimento: picloram, 2 ppm; e cinetina, 200 ppm (mg/L), não apresentando crescimento satisfatório. Os calos foram, então, introduzidos em meio líquido sob fluxo laminar, sendo as culturas assim obtidas mantidas sob agitação a cerca de 110 rpm, a 25°C e sob luz branca de intensidade constante. A partir de então, foram testadas diferentes concentrações de picloram e cinetina, conforme detalhado na Tabela X do item 5.X.X, em “Materiais e Métodos”, quando se verificou, pelo aumento visível da viscosidade das culturas e pela determinação do volume de células decantadas em provetas apropriadas (*packed cell volume*), maior crescimento celular em duas amostras de culturas em suspensão de *Cestrum amictum*, com as seguintes concentrações de picloram e cinetina, respectivamente, em mg/L: 0,50 e 0,20; 0,10 e 0,40. Entretanto, o crescimento e a multiplicação celulares não puderam ser quantificados, pois todos os meios de cultura foram contaminados 2 meses após o início dos experimentos, sendo este período de tempo insuficiente para o estabelecimento das células nos meios líquidos de cultura.

5.1.3. Manutenção de calos de *Cereus peruvianus*

Os calos de *Cereus peruvianus* foram introduzidos em placas de cultura com o meio MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962), semi-sólido, modificado pela utilização de vitaminas nas concentrações do meio B5 (GAMBORG, MILLER, OJIMA, 1968) e reguladores de crescimento cinetina e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ambos na concentração 2,2 mg/L. Os tecidos de calo cresceram satisfatoriamente, mas com escurecimento de parte das células, sugerindo oxidação de compostos polifenólicos como consequência de estresse celular. Posteriormente, os calos foram inoculados em meio líquido (o mesmo meio MS modificado), sob fluxo laminar, e as culturas

assim obtidas foram mantidas sob agitação, a 25°C, em fotoperíodo de 14 horas de luz/dia.

5.1.4. Biotransformações por *Rauwolfia sellowii* em suspensão

As biotransformações com culturas de células vegetais de *Rauwolfia sellowii* em suspensão foram realizadas através da seguinte sequência de operações, descritas no item 7.4.2, Capítulo 7 – “Materiais e Métodos”:

1) inoculação em meio de cultura período de crescimento e divisão celulares	5) adição do substrato período de incubação (biotransformações)
2) decantação ou filtração do meio	6) filtração sob pressão reduzida
3) pesagem	7) extração extracelular (filtrado)
4) transferência para o meio de indução período de estresse	8) extração do lisado celular
	9) análise por CG-FID e CG-EM

Quadro 5.1: Protocolo para os ensaios de biotransformação com culturas de células vegetais em suspensão.

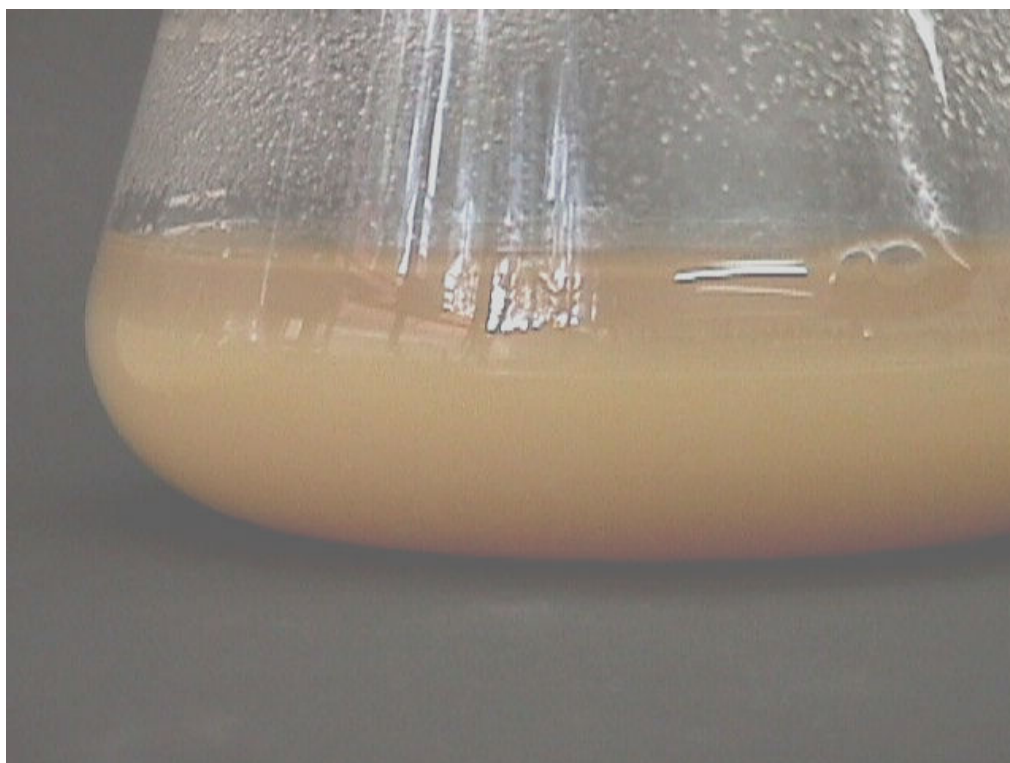


Figura 5.1: Aspecto da cultura de *Rauwolfia sellowii* em suspensão.

Em todos os ensaios com culturas de células de *R. sellowii*, as células foram transferidas para o meio de indução (B5 modificado) após 10 dias da inoculação em

meio B5 líquido, por ser este período de tempo considerado adequado ao estabelecimento de densidade celular satisfatória e para que se alcance o ápice da atividade metabólica, considerando a curva de crescimento e a duplicação da massa celular em 14 dias. O primeiro substrato a ser acrescido às culturas em suspensão foi a ciclo-hexanona, por sua semelhança estrutural às cetonas-modelo sob investigação e sua ampla disponibilidade, já que, nesta etapa do estudo, o objetivo era estabelecer as condições gerais para as biotransformações. A redução da ciclo-hexanona (1) somente foi bem sucedida quando as células de *R. sellowii* em suspensão foram previamente incubadas no meio B5 modificado, do qual se retiraram fontes de nitrogênio e fósforo, vitaminas e fito-hormônios. Também foi aumentada a concentração de sacarose no meio, com relação ao meio no qual as culturas cresceram. As depleções de nitrogênio, fósforo e fito-hormônios visavam inibir o crescimento e a diferenciação celulares e, em conseqüência, estimular o metabolismo secundário das células vegetais (KNOBLOCH, BERLIN, 1980). A alta concentração de açúcar deveria provocar um choque osmótico, induzindo enzimas de rotas biossintéticas diversas do metabolismo primário (SCRAGG *et al.*, 1990). Também é possível que a presença de sacarose seja necessária para a regeneração de cofatores envolvidos nas reduções (VILLA *et al.*, 1998), de modo que sua presença em alta concentração no meio de cultura possivelmente favoreça estas rotas de regeneração. O período de permanência das células no meio B5 modificado (período de estresse), que precedeu a adição do substrato ao meio, e o período de incubação das culturas com o substrato foram variados, visando estabelecer a condição de maior conversão da ciclo-hexanona em ciclo-hexanol, conforme representado na Tabela 5.1.

Os rendimentos de redução foram melhores em concentrações mais baixas de substrato. Aqui reside uma das principais limitações ao emprego de culturas de células vegetais em suspensão em biotransformações de xenobióticos, cuja toxicidade pode ser limitante em função de sua concentração. Apenas na concentração de substrato de 38,4 mmol L⁻¹ se observou um rendimento cromatográfico da ordem de 3,2%, que equivale a cerca de 5% de rendimento na biotransformação (considerando a recuperação de 63% de ciclo-hexanol com clorofórmio como fase extratora). Os rendimentos de redução não foram significativamente afetados pelo período de estresse, também não houve influência perceptível do tempo de incubação com o substrato (*vide* Tabela 5.1). Também se levantou a hipótese de que maior rendimento do produto de redução pudesse ser alcançado com menos de 24 horas de incubação. Os baixos rendimentos observados dever-se-iam, conseqüentemente, a uma posterior

metabolização dos produtos de redução, uma vez que apenas cerca de 50% da massa da cetona adicionada como substrato estava presente no meio de cultura após 24 horas de ensaio de biotransformação (e também não foi detectada nos extratos de lisados celulares) ou a efeitos tóxicos do substrato sobre as células, já que o maior rendimento observado foi obtido quando se utilizou a menor concentração de substrato.

Tabela 5.1. Rendimentos da redução da ciclo-hexanona em diferentes condições reacionais por culturas de células de *R.sellowii*.

CONDIÇÕES				
Período de estresse (dias)	Cetona (mmol·L ⁻¹)	Período de incubação (dias)	Álcool (% rendimento) ^a	Cetona (% recuperação) ^b
0	192,0	1	0,00	n.d.
2	38,4	5	3,2 ± 0,7	n.d.
2	96,0	1	0,5 ± 0,4	51 ± 21
2	96,0	2	0,6 ± 0,1	65 ± 12
2	96,0	5	0,7 ± 0,4	62 ± 10
2	96,0	7	0,5 ± 0,1	56 ± 06
2	192,0	5	0,05 ± 0,03	n.d.
2	384,0	5	0,03 ± 0,00	n.d.
5	192,0	5	0,10 ± 0,05	n.d.

^aOs rendimentos de redução são expressos como razão (m/m) de ciclohexanol obtido (determinado por cromatografia a gás dos extratos concentrados) e do ciclo-hexanol esperado na extração ideal.

^bA recuperação do substrato é expressa como razão (m/m) de ciclohexanona recuperada (determinado por cromatografia a gás dos extratos concentrados) e da ciclo-hexanona esperada para a extração com clorofórmio, com 82% de eficiência.

n.d.: não determinado.

Para a biotransformação da 2-ciclo-hexenona (**2**), da (±)-cânfora (**4**) e da acetofenona (**5**), as células permaneceram no período de indução (ou estresse) por 2, 3 ou 5 dias. Adicionaram-se, então, os substratos em diferentes concentrações entre 96 e 100 mmol L⁻¹, após o que as células foram incubadas por 1, 2, 4, 5 ou 7 dias, sob agitação e luz branca de intensidade constante. Não foram detectados produtos de redução nos ensaios de biotransformação dos compostos **4** e **5** e, após 24 horas de incubação com o substrato **2**, apenas uma pequena quantidade de ciclo-hexanona foi

encontrada, juntamente com o substrato que não reagiu, indicando que as enzimas das culturas de células reduziram apenas a dupla ligação do composto **2**. Estes resultados se deveram, provavelmente, à toxicidade dos substratos nas concentrações em que foram empregados nesta fase inicial do trabalho e à baixa solubilidade da cânfora em meio aquoso.

A massa seca de células obtida da filtração sob pressão reduzida que interrompeu os ensaios de biocatálise discutidos acima foi congelada e posteriormente triturada com areia em presença de solvente, para promover a lise celular, sendo necessária mais uma etapa de filtração sob pressão reduzida para se obter uma solução. Os produtos de redução não foram detectados neste filtrado quando este foi submetido a análises por cromatografia a gás com detecção por ionização em chama, sugerindo que, nestas condições de biotransformação, estes produtos são preferencialmente encontrados no meio extracelular.

Foram realizados novos ensaios com concentrações mais baixas de substrato, tendo em vista alcançar melhores rendimentos, variando-se os períodos de estresse, que eram de 1, 2, 3 ou 5 dias, e de incubação com o substrato, sendo estes últimos períodos de 8, 12, 18, 24, 48 e 120 horas. Nesta ocasião, os seguintes substratos foram testados: a 2-ciclo-hexenona (**2**) e uma das ciclo-hexanonas metil-substituídas, a 3-metilciclo-hexanona (**3**). Os resultados mais relevantes das biotransformações realizadas pelas culturas de células de *R.sellowii* estão apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Rendimentos da biotransformação da 2-ciclo-hexenona (**2**) e 3-metilciclo-hexanona (**3**) em diferentes condições reacionais por culturas de células de *R.sellowii*.

CONDIÇÕES			
Período de estresse (dias)	Cetona (mmol·L ⁻¹)	Período de incubação (horas)	Produto (% rendimento) ^a
2	3 ; 16,3	8	(±)- 9 ; 84 ± 7
2	2 ; 200,2	24	1 ; 0,6 ± 0,0
3	2 ; 20,0	48	1 ; 0,9
5	2 ; 20,0	48	1 ; 0,5
5	2 ; 20,0	120	1 ; 0,4 ± 0,3

^aOs rendimentos de biotransformação são expressos como razão (m/m) de produto (determinado por cromatografia a gás dos extratos concentrados) e do produto esperado.

Observou-se que a 3-metilciclo-hexanona (**3**) foi quase totalmente consumida com apenas 8 horas de incubação, não sendo mais detectada nos extratos do meio de

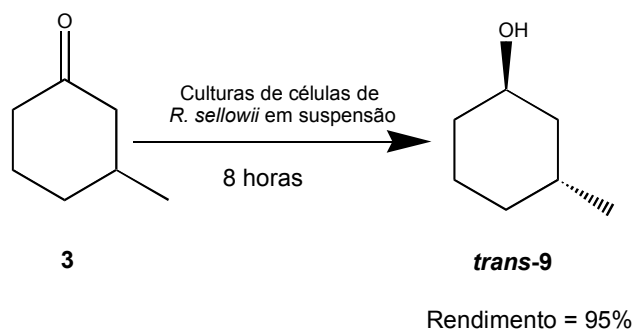
cultura de células em períodos superiores a este. O melhor rendimento observado foi de 84 %, considerando a razão (m/m) de produto obtido e de produto esperado da extração quantitativa, com formação exclusiva do composto *trans*-(±)-3-metilciclo-hexanol (**4**).

Na redução da (±)-3-metilciclo-hexanona (**3**) com boro-hidreto de sódio e alumina em hexano, descrita no item 7.2.2, em “Materiais e Métodos”, obtiveram-se o *cis*-(±)-3-metilciclo-hexanol (**8**) e o *trans*-(±)-3-metilciclo-hexanol (**9**) com 93 e 7% de rendimento cromatográfico, respectivamente. O composto **9** não foi detectado quando as culturas foram submetidas a períodos de indução inferiores a 2 dias ou quando foram incubadas com o substrato por períodos mais longos, indicando que, nestas condições, o *trans*-(±)-3-metilciclo-hexanol possivelmente seja consumido em outras rotas de biotransformação. Juntamente com o composto **9**, foram detectados mais 2 produtos minoritários de biotransformação, por CG/FID, em concentração muito baixa, o que prejudicou a identificação dos mesmos quando a análise foi refeita por CG/EM, onde não foram sequer detectados. Considerando que a recuperação do *cis*-(±)-3-metilciclo-hexanol de soluções aquosas com acetato de etila como fase extratora é de 88%, este rendimento cromatográfico equivale a aproximadamente 95% de rendimento na biotransformação, conforme representado no Esquema 5.1. Os ensaios seriam refeitos para confirmar os resultados, quando todas as culturas foram perdidas em virtude de contaminação por fungos. Como o reestabelecimento das culturas a partir de explantes de espécies adultas demandaria um tempo excessivo, decidiu-se por adotar imediatamente um novo enfoque, empregando-se homogenatos de células obtidas de folhas de espécimens adultos.

Já o consumo da 2-ciclo-hexenona (**2**) pelas culturas foi de 71 a 83%, nas condições descritas na Tabela 5.2, com formação de pequenas quantidades de ciclo-hexanona (**1**), pela redução da ligação dupla conjugada à carbonila. A quantidade de **1** formada não foi significativamente afetada pelo período de estresse ou de incubação, embora fosse possível perceber que os períodos mais longos de indução e/ou incubação faziam com que as células ficassem escuras, possivelmente diminuindo sua capacidade de biotransformação. A indesejada redução de cetonas α,β -insaturadas às correspondentes cetonas saturadas por enolato redutases já foi relatada anteriormente (KROUTIL *et al.*, 2004) e se constitui em uma desvantagem do emprego de sistemas de células intactas, que possuem enzimas competidoras com as

redutases de carbonila, diminuindo, em conseqüência, a quimio-seletividade das reduções.

Esquema 5.1



5.1.5. Biotransformações por *Cereus peruvianus* em suspensão

As células de *C. peruvianus* cresceram satisfatoriamente em meio semi-sólido, mas com escurecimento de parte delas, sugerindo oxidação de compostos polifenólicos como conseqüência de estresse celular. Mesmo assim, os tecidos de calo foram inoculados em meio líquido, seguindo o mesmo procedimento adotado nas biotransformações com culturas de *R. sellowii* e descrito no item 5.1.4, com exceção da transferência para o meio de indução, que não foi realizada. Após 4 dias da inoculação em meio MS, foram acrescentados os 5 substratos elencados na Tabela 5.3, e incubados por 96 horas. Nesta ocasião, todos os substratos foram acrescentados a partir de soluções aquosas com 50% (v/v) de isopropanol, adicionado tanto para garantir a dissolução completa das cetonas-modelo, como, principalmente, para atuar como possível co-substrato de reações de regeneração dos co-fatores envolvidos nas reduções. Desta forma, a concentração molar do isopropanol era cerca de 5 vezes a concentração molar dos substratos no meio reacional. Os produtos de redução foram pesquisados nos extratos do meio reacional e nos extratos de células submetidas a lise em almofariz com nitrogênio líquido, sílica e acetona, mas apenas foram detectados no meio reacional (extracelular), conforme indicado na Tabela 5.3.

Nas biorreduções com culturas em suspensão de *C. peruvianus* se observou menor diastereosseletividade na redução dos compostos **14**, **3** e **15** do que na redução por redutor convencional, com preferências diastereoisoméricas semelhantes.

No caso da redução da 2-metilciclo-hexanona (**14**) pelas culturas, verificou-se a formação dos compostos *cis*-(**21**) e *trans*-(±)-2-metilciclo-hexanol (**22**) com 12 e 10% de rendimento cromatográfico, enquanto na redução do composto com boro-hidreto de sódio e alumina em hexano, o *cis*-(±)-2-metilciclo-hexanol (**21**) e o *trans*-(±)-2-metilciclo-hexanol (**22**) foram obtidos com 29 e 71% de rendimento, respectivamente. No entanto, o *cis*-(±)-2-metilciclo-hexanol (**21**) foi obtido com excesso enantiomérico de 90%, conforme representado no Esquema 5.2. Os rendimentos apresentados se referem ao rendimento da biotransformação propriamente dita e são expressos como razão (m/m) de produto obtido (determinado por CG/FID) e do produto esperado na extração com acetato de etila (*vide* o item 4.3.8. “Recuperação”).

Tabela 5.3: Rendimentos de biotransformação de cetonas por culturas de células de *C. peruvianus* com 96 horas de biotransformação.

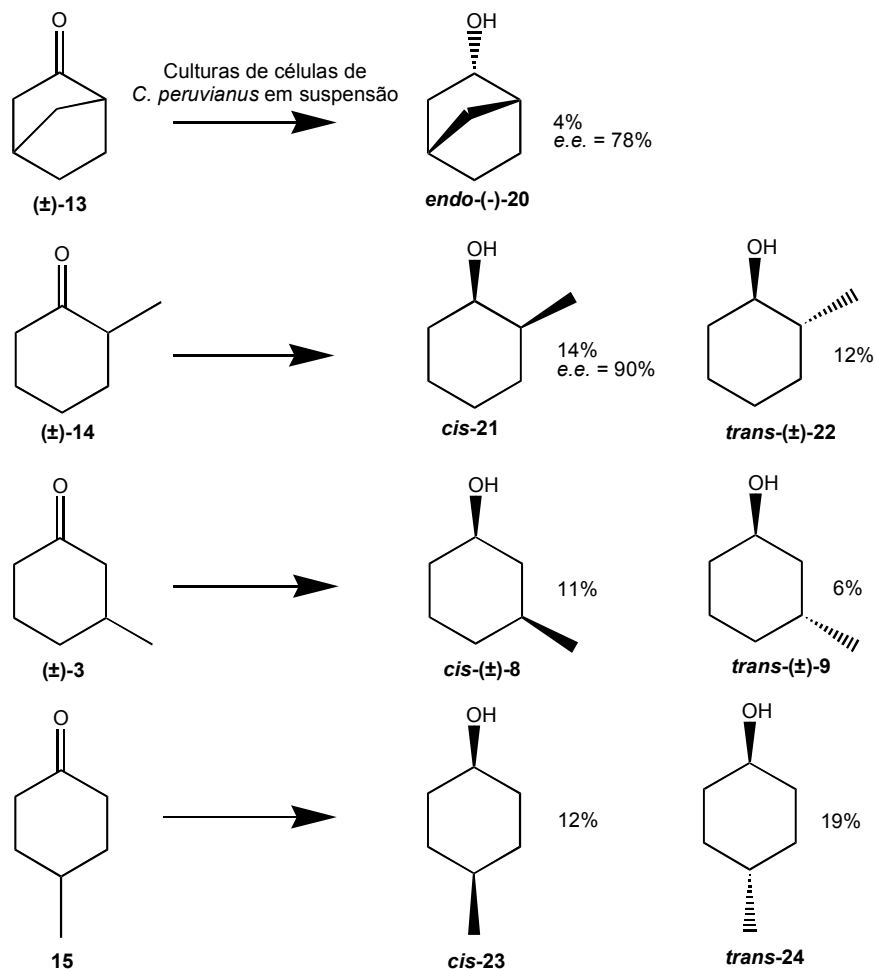
SUBSTRATO	CONCENTRAÇÃO (mmol·L ⁻¹)	CETONA (% recuperação) ^a	ÁLCOOL (% rendimento) ^a	
			<i>cis</i> / <i>exo</i>	<i>trans</i> / <i>endo</i>
Norcânfora (13)	11,1	49 ± 2		3,3 ± 0,7 (e.e. ^b = 78 ± 23) ^c
2-Metilciclo-hexanona (14)	12,6	4 ± 4 (e.e. = 3,5 ± 0,5)	12,0 ± 0,9 (e.e. ^b = 90 ± 10)	10,1 ± 0,5
3-Metilciclo-hexanona (3)	12,3	5 ± 1	9,8 ± 2,0	4,9 ± 0,5
4-Metilciclo-hexanona (15)	12,3	3 ± 2	10,5 ± 0,5	16,7 ± 0,6
4-Metil-2-pentanona (16)	12,0	3,0 ± 0,6	0	

^aas percentagens referentes a recuperação de substrato ou rendimento de biotransformação são expressos, respectivamente, como razão (m/m) de substrato recuperado e do substrato adicionado ou de produto obtido e do produto esperado na extração quantitativa (determinados por CG/DIC).

^be.e. (excesso enantiomérico) = $(A_R - A_S) / (A_R + A_S)$, onde A_R ou A_S são as áreas dos picos de cada um dos enantiômeros, determinadas por CG/DIC.

^c(-)-*endo*-norborneol.

Esquema 5.2



5.2. Homogenatos de tecidos vegetais diferenciados e de cultura em suspensão - modo de obtenção e aplicação na biotransformação de cetonas

5.2.1. Estabelecimento do procedimento de obtenção dos homogenatos

As espécies vegetais das quais se obtiveram os homogenatos que foram testados na biotransformação de cetonas pertencem às famílias: Fabaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Anacardiaceae, Rosaceae, Theaceae, Moraceae, Solanaceae e Rutaceae.

As folhas foram escolhidas como fonte de enzimas para a incubação das cetonas exógenas por serem abundantes e terem atividade enzimática acentuada,

principalmente as mais jovens, em comparação a outras partes das plantas. Por exemplo, a atividade da enzima monoterpene sintase nas folhas de carvalho (*Quercus ilex*) com 1 ano de idade é de cerca de 1/3 da atividade enzimática nas folhas recém-emergidas (FISCHBACH *et al.*, 2002). A maceração das folhas em nitrogênio líquido é o método de escolha para acessar enzimas vegetais, já que a celulose e outros polissacarídeos da parede celular são, dessa forma, eficientemente rompidos (FISCHBACH *et al.*, 2002; LOOMIS & BATTAILE, 1966).

A polivinilpirrolidona (PVPP) empregada no processo tem estrutura semelhante à polivinilpirrolidona, porém, é insolúvel em função de ligações cruzadas entre as cadeias do polímero, o que facilita a retirada deste dos homogenatos nas etapas de centrifugação. A PVPP é necessária para complexar compostos fenólicos e polifenólicos, que podem formar complexos estáveis com as enzimas, inibindo suas atividades (LOOMIS, BATTAILE, 1966). Deve ser empregada na razão de, no mínimo, 1,25 g de PVPP/g de tecido. Os ensaios em que se empregaram menos de 1,25 g de PVPP/g de tecido na obtenção dos homogenatos de células vegetais não foram bem sucedidos, tendo sido obtido um preparado de coloração marrom-escuro. Além disso, é preciso deixar o polímero pré-hidratando no dia anterior à preparação dos homogenatos, já que os grupamentos amídicos do polímero pré-hidratado ficam mais expostos para a adsorção dos compostos fenólicos e a hidratação requer certo tempo. A adição de agentes redutores ao tampão extrator tem a função de reduzir as quinonas formadas a partir da oxidação dos compostos fenólicos ainda não complexados com a PVPP, pois essas quinonas podem oxidar grupos essenciais das proteínas ou, mesmo, formar ligações covalentes com elas.

O ditioneitol (DTT) é usado para prevenir a formação de ligações dissulfeto intra e intermoleculares entre os resíduos de cisteína das proteínas. O EDTA foi empregado para complexar metais que possam inibir enzimas ou induzir a atividade de metaloproteases. Optou-se por adicionar Mg^{2+} a alguns dos tampões extratores, no lugar do EDTA, já que algumas desidrogenases são dependentes deste metal.

A purificação de uma enzima envolve, em geral, etapas de precipitação fracionada, diálise ou procedimentos altamente seletivos como cromatografia de afinidade, de custo elevado e com risco de inativação de sítio ativos, principalmente em função de contaminantes da fase adsorvente. Como o objetivo principal da obtenção destes homogenatos era utilizá-los em um procedimento geral de triagem por enzimas solúveis presentes em folhas, para a biotransformação de substratos

exógenos, optou-se por empregá-los sem adotar procedimentos prévios de filtração ou cromatografia para a clarificação destes extratos brutos, que foram utilizados após centrifugação a 17000 RPM por 20 minutos, a 4 °C (OWEN, MCCREATH & CHASE, 1996).

A adição dos co-fatores β -NADH e β -NADPH às preparações enzimáticas fundamentou-se no fato de a maior parte das desidrogenases e redutases empregadas na redução de cetonas requererem co-fatores de nicotinamida (KROUTIL *et al.*, 2004). O NADPH é usado quase exclusivamente para biossínteses redutivas, enquanto o NADH é usado primariamente para a produção de adenosina-trifosfato (ATP) (STRYER, 1992). Todos os ensaios também foram realizados sem a adição dos co-fatores, uma vez que se espera que estas substâncias estejam presentes no interior das células, dispensando a adição de co-fatores aos homogenatos, que encarecem os ensaios, no entanto, desejava-se avaliar, também, a influência de concentrações adicionais destes co-fatores sobre os resultados.

A conversão da forma reduzida dos co-fatores em forma oxidada, que resulta da transferência de hidreto para o substrato, encontra-se representada no Esquema 5.3, e segue a estequiometria 1:1 (co-fator : cetona). O procedimento inicial de empregar quantidades sub-estequiométricas de co-fator foi adotado considerando a hipótese, amplamente aceita na literatura para situações similares, de que os homogenatos, além de biotransformarem as cetonas-modelo, deveriam também conter enzimas que regenerassem o co-fator. No entanto, para a reciclagem de co-fator, questão central quando se usam oxi-redutases, geralmente se adota uma das seguintes estratégias, ambas com o emprego de um co-substrato: a aplicação de um sistema de substrato-acoplado, no qual a mesma enzima que reduz o substrato também oxida um co-substrato, regenerando o co-fator na forma reduzida, ou a utilização de um sistema de enzima-acoplada, quando se faz uso de uma segunda reação enzimática, preferencialmente irreversível (ROCHA *et. al.*, 2005). Embora a primeira abordagem seja mais elegante, por empregar uma única enzima, o co-substrato deve ser utilizado em grande excesso, para deslocar o equilíbrio na direção desejada, o que pode provocar a chamada inibição da enzima pelo co-substrato. Nas etapas finais do trabalho, foram realizadas alterações relacionadas à re-escala dos experimentos para a utilização de co-fator em concentração próxima à condição estequiométrica e todos os substratos foram acrescentados a partir de soluções aquosas com 40% (v/v) de isopropanol, adicionado para atuar como co-substrato nas reações de regeneração dos co-fatores, em concentração molar de cerca de 26 vezes a concentração molar

dos substratos no meio reacional. Adicionalmente, foram testados diversos substratos, com estrutura linear e cíclica, e um representante aromático (Figura 5.2).

Esquema 5.3

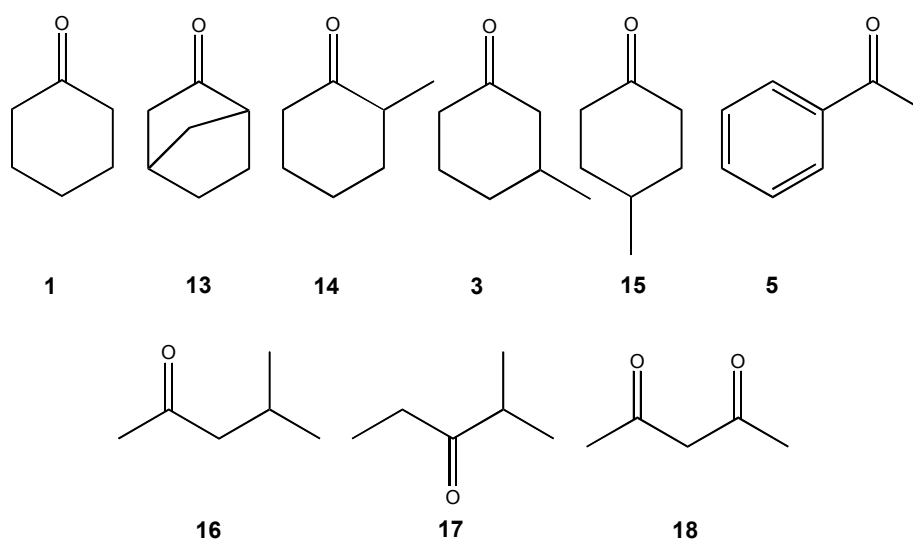
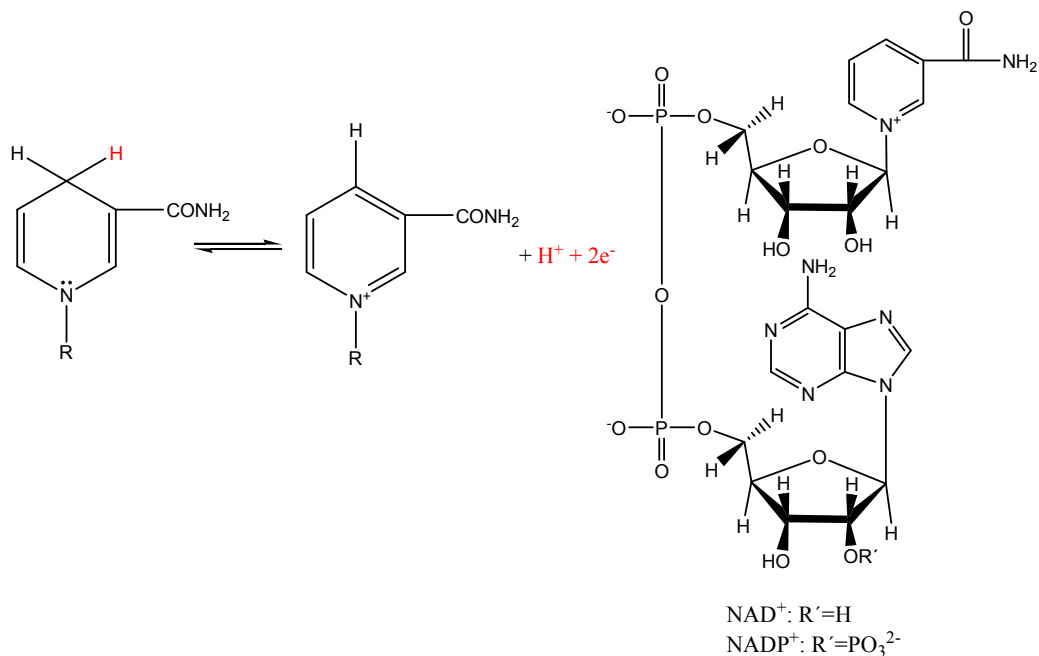


Figura 5.2: Cetonas-modelo de substrato dos experimentos de biotransformação por homogenatos de células vegetais

A recuperação dos substratos e produtos de reação a partir dos homogenatos se deu com rendimento cromatográfico praticamente completo (*vide* o item 4.3.8. “Recuperação”). As amostras para CG/FID foram obtidas por precipitação das

proteínas com acetona a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguida de centrifugação, sendo analisado o sobrenadante. A adição de um solvente miscível com a água (acetona) promove as precipitações das proteínas do homogenato, que são favorecidas em baixas temperaturas (BELTER, CUSSLER & HU, 19XX). O injetor do cromatógrafo foi mantido a $270\text{ }^{\circ}\text{C}$ para proporcionar maior proteção à coluna cromatográfica, sendo retirado para limpeza a cada 15 dias.

Outras características das preparações enzimáticas como: a massa de folhas empregada na sua obtenção, a concentração e o tipo de tampão extrator, a adição de cátions, de inibidores de protease ou a concentração de co-fator adicionado, relativa ao substrato, foram estabelecidas através da adaptação de métodos utilizados na manipulação de redutases comerciais e homogenatos de células vegetais em estudos de rotas biossintéticas (KALUZNA, ROZZELL & KAMBOURAKIS, 2005; OWEN, MCCREATH & CHASE, 1997; FISCHBACH *et al.*, 2002; FISCHBACH *et al.*, 2000; ITOSAWA & KISE, 1995; MOONMANGMEE *et al.*, 2001; SHIGEMATSU *et al.*, 1995; OBERSCHALL *et al.*, 2000). O procedimento detalhado se encontra descrito no item 7.4.5. (Capítulo 7, p.XX).

Todos os ensaios foram realizados em duplicata, com um controle dos homogenatos ao qual não se adicionou substrato, apenas os co-fatores, para servir como amostra-branco. Adicionalmente, os substratos foram incubados com os co-fatores NADH e NADPH na proporção 1:1 (cetona:co-fator), em tampão fosfato 50 mM, pH 6,8, durante 6 e 96 horas, não sendo detectados os produtos de redução neste ensaio.

A seguir, serão relacionados alguns dos resultados iniciais, que orientaram a elaboração do protocolo definitivo de triagem por biorreduções com homogenatos:

5.2.2 Biotransformações com homogenatos de células vegetais em diferentes períodos de incubação com o substrato e pH dos meios reacionais

Uma das variáveis consideradas no estabelecimento do procedimento de obtenção dos homogenatos de células vegetais (*cell-free extract*) para a triagem por novos biocatalisadores foi o pH do tampão utilizado nas biotransformações, sendo testados valores entre 4,5 e 8,5, com a concentração hidrogênio-iônica do tampão de lise e extração fixa em 6,5. Também foram avaliados diversos intervalos de tempo de

biotransformação, entre 6 e 96 horas. Nesta etapa, o co-fator foi adicionado em concentração equivalente a, no máximo, 2% da concentração molar da cetona, sem a adição de co-substrato.

A metil-*iso*-butil cetona (**16**) foi biotransformada por homogenatos de folhas de *Bauhinia variegata* de pH 6,0 e de pH 6,5, com EDTA 1 mmol·L⁻¹, incubados a 30 °C por 2 e 4 dias. O 4-metil-2-pentanol (**25**) foi obtido em quantidade ainda insuficiente para ser quantificada, juntamente com outros produtos de biotransformação, independentemente da adição de NADH (0,3 mmol·L⁻¹), em maior quantidade nos extratos de pH 6,5 incubados por 4 dias. A identidade do produto foi confirmada por espectrometria de massas, mas os subprodutos não puderam ser identificados, já que os mesmos não foram eficientemente separados na coluna cromatográfica que precede a injeção no espectrômetro de massas. O ciclo-hexanol (**6**) foi obtido em 1% de rendimento, quando a ciclo-hexanona (**1**) foi incubada por 3 dias em homogenatos da mesma espécie vegetal, contendo Mg²⁺ 1 mmol·L⁻¹ em lugar de EDTA, e na presença de NADH 0,3 mmol·L⁻¹. A biotransformação do composto **1** em homogenatos com EDTA 1 mmol·L⁻¹ não foi observada. Optou-se, então, por ensaiar o substrato norcânfora (**13**; 23,3 mmol·L⁻¹) em homogenatos acrescidos de Mg²⁺ 1 mmol·L⁻¹. Neste caso, obtiveram-se resultados apenas em homogenatos com adição de NADPH (0,05 mmol·L⁻¹), na relação co-fator : cetona de 0,002:1 (0,2%), enquanto a razão empregada na biotransformação de **1** era de 0,008:1 (0,8%). Estes resultados se encontram expressos na Tabela 5.4. Nesta etapa, ainda não havia sido feita distinção entre *exo* e *endo*-norborneol porque a resolução da coluna utilizada até então (Shimadzu CBP-20, com revestimento interno de polietilenoglicol), não era suficiente para a separação desses álcoois isoméricos.

O ciclo-hexanol (**6**) foi obtido com rendimentos entre 0,2 e 5,3% com homogenatos de folhas de *Laurus* spp, *Eriobotrya japonica* e *Artocarpus heterophyllus* Lam. Os substratos foram incubados em homogenatos de *Eriobotrya japonica* e *Artocarpus heterophyllus* com EDTA ou Mg²⁺ 1 mmol·L⁻¹ e NADH 0,7 mmol·L⁻¹ ou NADPH 0,03 mmol·L⁻¹, sendo a razão NADH : cetona igual a 2% e a razão NADPH : cetona igual a 0,1% ou 0,2%. Os resultados apresentados na Tabela 5.5 referem-se a ensaios com *Eriobotrya japonica* e *Artocarpus heterophyllus* nos quais se empregou EDTA como complexante de eventuais cátions metálicos presentes no meio, não sendo detectados os produtos de redução nas amostras com Mg²⁺. Nesta fase do trabalho, também se constatou que, na maior parte das amostras de homogenatos de células usadas nas biotransformações em que foram detectados os produtos de redução, o

pH das preparações enzimáticas era 6,5. A partir destes resultados iniciais, optou-se por produzir todos os homogenatos em tampão fosfato pH 6,8.

Tabela 5.4: Rendimentos cromatográficos percentuais dos ensaios de biotransformação em homogenatos de *B. variegata*, com adição de co-fator em condições sub-estequiométricas.

Tempo (h)	Ciclo-hexanol (com NADH)				Norborneol (com NADPH)		
	EDTA	Mg ²⁺					
	pH 6,5	pH 4,5	pH 6,5	pH 8,5	pH 4,5	pH 6,5	pH 8,5
18	-	-	-	-	0,2	0,4	1,1
74	-	-	1,0	-			
90					1,1	1,8	0,5

Os espaços em branco representam condições não testadas, enquanto aqueles com – traduzem a não ocorrência da transformação desejada na condição tabelada.

Tabela 5.5: Rendimentos cromatográficos percentuais dos ensaios de biotransformação em homogenatos de *A. heterophyllus* e de *E. japonica*, com adição de co-fator em condições sub-estequiométricas.

Tempo (h)	<i>A. heterophyllus</i>									<i>E. japonica</i>								
	Ciclo-hexanol (NADPH)			Norborneol (NADPH)			1-Fenil-etanol (NADPH)			Ciclo-hexanol (NADH)			Ciclo-hexanol (NADPH)			Norborneol (NADPH)		
	pH			pH			pH			pH			pH			pH		
	4,5	6,5	8,5	4,5	6,5	8,5	4,5	6,5	8,5	4,5	6,5	8,5	4,5	6,5	8,5	4,5	6,5	8,5
18	-	-	-	0,6	0,5	-	-	0,2	0,1	-	0,2	-	-	-	-	0,4	3,4	1,2
96				0,7	0,5	0,3	0,1	0,2	0,3	-	2,0	3,0	-	-	2,0	1,0	0,6	-
120	-	5,3	-															

Os espaços em branco representam condições não testadas, enquanto aqueles com – traduzem a não ocorrência da transformação desejada na condição tabelada.

A norcânfora (**13**) foi biotransformada apenas em homogenatos de *Morus nigra* com NADPH 0,04 mmol·L⁻¹, em 96 horas, ainda empregado em condição sub-estequiométrica, sendo observada conversão de 1%, com Mg²⁺ ou EDTA. Em condições semelhantes, foi detectado 0,4% de **16**, formado na biotransformação da metil-iso-butil cetona (**25**) em homogenatos com EDTA, de pH 8,5, incubados a 30 °C por 96 horas. Resultado semelhante se deu em homogenatos de pH 8,5 de *Eugenia*

uniflora, nos quais a 4-metil-2-pentanona (**25**) converteu-se em 0,3% de 4-metil-2-pentanol (**16**), com NADH e EDTA, após 72 horas.

As preparações obtidas das espécies *Psidium guajava*, *Mangifera* spp. e *Camellia* spp. não reduziram as cetonas-modelo nas condições experimentais.

5.2.3 Biotransformações com homogenatos de células de *Eriobotrya japonica* em diferentes concentrações de NADPH adicionado

O rendimento percentual dos produtos de biorredução dos ensaios discutidos no item 5.2.2 foi igual ou ligeiramente superior à razão co-fator adicionado : cetona (máximo 2% ou 0,02:1), provavelmente em virtude da existência de uma pequena quantidade de co-fator nos interior das células vegetais ou mesmo pela regeneração de parte do co-fator adicionado na forma reduzida. A concentração do co-fator parecia ser um fator limitante e a avaliação de uma possível regeneração deste por alguma enzima presente nestes extratos enzimáticos era necessária. Os co-fatores NADH e NADPH foram testados em diversas concentrações próximas à condição estequiométrica, em homogenatos de células de *Eriobotrya japonica*, com o substrato (\pm)-norcânfora. As biotransformações deste substrato ou não foram bem sucedidas ou não apresentaram rendimentos de norborneóis significativamente distintos dos observados quando do emprego do co-fator na condição sub-estequiométrica. Ainda assim, para garantir que a concentração dos co-fatores não fosse um fator limitante da reação, estes passaram a ser utilizados, no procedimento definitivo de triagem, na razão 1:2 co-fator adicionado : cetona e em conjunto com um co-substrato (isopropanol), visando favorecer a eventual atividade de enzimas em reações do regeneração dos co-fatores.

5.2.4. Biotransformações com homogenatos de células de *Artocarpus heterophyllus* e inibidores de protease

A avaliação do efeito da adição de inibidores de protease aos homogenatos sobre as biotransformações também se fez necessária. O indicado no caso das classes de proteases degradando uma amostra serem desconhecidas é o emprego de uma mistura de inibidores de proteases de serina, de metaloproteases, de proteases ácidas ou carboxílicas e de proteases de tiol. Apenas não foi adicionado um inibidor de protease ácida, como, por exemplo, pepstatina.

As biotransformações estudadas com homogenatos de células de *Artocarpus heterophyllus* e os inibidores de protease PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila) e leupeptina não foram bem sucedidas. Esta inibe proteases de serina e cisteína, ou seja, enzimas proteolíticas que apresentam serina ou cisteína no centro ativo, que estabilizam o estado de transição na hidrólise da ligação peptídica, enquanto aquele inibe apenas proteases de serina. A adição de inibidores de proteases oferece o risco de inibir as atividades das redutases de interesse, o que pode explicar a não ocorrência de redução dos substratos acetofenona (**5**) e norcânfora (**13**), que foi anteriormente observada em homogenatos de *Artocarpus heterophyllus* com EDTA $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ como complexante de metais e inibidor de metaloproteases, e razões molares entre co-fator adicionado e **5** ou **13**, de cerca de 0,2%, enquanto as razões molares entre os co-fatores e estes mesmos substratos, no ensaio com inibidores de protease, foi de aproximadamente 50%. Naquela ocasião, mesmo com o co-fator em concentrações sub-estequiométricas, obtiveram-se rendimentos cromatográficos de 0,5% de norborneol e 0,2% de 1-feniletanol, em pH 6,5, após 18 horas de biotransformação (Tabela 5.5). Portanto, optou-se por não adicionar inibidores de protease aos homogenatos nos ensaios subseqüentes.

5.2.5. Triagem por biocatalisadores para a redução de cetonas com homogenatos obtidos de folhas

As biotransformações com homogenatos de células vegetais de diversas espécies cultivadas no *campus* “Armando Salles de Oliveira” da Universidade de São Paulo foram realizadas através da sequência de operações mostrada no Quadro 5.2 e detalhadas no item 7.4.5.1, no Capítulo 7 – “Materiais e Métodos”:

1) preparação do tampão fosfato ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6,5, com ascorbato de sódio, ditioneitol, EDTA ou MgSO_4)	7) centrifugação por 3 minutos, em frascos tipo "falcon" mantidos a 0°C
adição de PVPP, que será hidratado por 24 horas nesse meio.	8) centrifugação do sobrenadante por 20 minutos, a 4°C
2) coleta de folhas de indivíduo (planta) identificado	9) pipetagem das amostras em fluxo laminar
manutenção a 0°C para utilização no mesmo dia	10) adição de co-fator (NADH ou NADPH) a parte das amostras
3) pesagem, lavagem e descontaminação das folhas	11) adição de substrato / co-substrato
4) maceração em N_2 líquido (sem descongelar) com sílica	período de incubação (biotransformações) a 30°C
5) adição do tampão com PVPP	12) interrupção pela adição de acetona a -20°C , com o padrão interno
descongelamento lento em banho de gelo	precipitação das proteínas a -20°C por 24 horas
6) mistura suave da pasta descongelada por 20 minutos	13) microcentrifugação por 15 minutos
	transferência para vials
	14) análise por CG-FID e CG-EM

Quadro 5.2: Protocolo para os ensaios de biotransformação com homogenatos de folhas

5.2.5.1. *Bauhinia variegata* – Fabaceae

As plantas do gênero *Bauhinia* são espécies arbóreas da família das leguminosas, muito utilizadas como plantas ornamentais e comuns no paisagismo urbano no Brasil. A espécie *B. variegata* é popularmente conhecida por pata de vaca ou casco-de-vaca lilás. O extrato aquoso de suas folhas, tradicionalmente empregado no tratamento do diabetes, contém glicopiranosídeos de atuação hipoglicemiante (FRANKISH *et al.*, 2010).

Os resultados das biotransformações realizadas em homogenatos de células vegetais, conforme descrito no item 7.4.5.1, em "Materiais e Métodos", com folhas de *Bauhinia variegata* como biocatalisador, serão aqui discutidos. Como, em ensaios anteriores, a biotransformação da ciclo-hexanona em homogenatos com EDTA $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ não foi observada, optou-se por realizar os experimentos com esta espécie com $\text{Mg}^{2+} 1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.6, a seguir.

O produto *exo-norborneol* (sub-produto da redução com boro-hidreto de sódio) parece formar-se mais rapidamente, já que o isômero *endo* só foi detectado após 96 horas de incubação, em amostras às quais foi adicionado NADPH. O substrato *norcânfora* também foi biotransformado na presença dos inibidores de protease PMSF ($0,8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), leupeptina ($2 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e TLCK ($0,8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, hidrocloreto de *L*-1-cloro-3-[4-tosilamido]-7-amino-2-heptanona, inibe proteases de serina e cisteína), sem

diferenças significativas de rendimento em relação ao ensaio sem a mistura de inibidores, em condições semelhantes. A quantidade total dos produtos formados não se altera substancialmente com mais de 24 horas de biotransformação. No caso do ensaio com o co-fator NADPH, o rendimento de *exo*-norborneol em 24 horas se mantém 1,5% após 96 horas de biotransformação. Em ensaios anteriores (sem a adição de co-substrato), o rendimento para a biotransformação do mesmo substrato por homogenatos de *Bauhinia variegata*, é 0,4% em 18 horas, e 1,8% em 90 horas. A relação co-fator : cetona empregada naquele experimento foi 0,002:1 (0,2%), enquanto os resultados expressos na Tabela 5.6 referem-se ao uso de co-fator na razão 1:2 (co-fator : cetona). Nem a adição de co-substrato ao meio, nem o aumento da razão co-fator : substrato proporcionaram aumento do rendimento, para essa espécie vegetal. O uso de inibidores de protease nos homogenatos também não produziu incremento nos rendimentos de redução.

Tabela 5.6: Recuperação do substrato e rendimentos cromatográficos percentuais dos ensaios de biotransformação em homogenatos de *B. variegata*.

CO-FATORES		Não adicionado	NADPH		NADH		NADPH + i ^a
Tempo (h)		96	24	96	24	96	96
CETONA / ALCOÓIS	Norcânfora	97 ± 2	95 ± 2	96 ± 1	97 ± 3	97 ± 2	97 ± 3
	<i>exo</i> -Norborneol	0,7 ± 0,2	1,5 ± 0,3	1,5 ± 0,4	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,2
	<i>endo</i> -Norborneol	-	-	0,6 ± 0,0	-	-	0,5 ± 0,0
	2-Metilciclo-hexanona	77 ± 2	59 ± 1	42 ± 16	56 ± 12	49 ± 11	
	<i>cis</i> -2-Metilciclo-hexanol	-	0,5 ± 0,0	1,2 ± 0,6	0,7 ± 0,3	0,5 ± 0,1	
	<i>trans</i> -2-Metilciclo-hexanol	-	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,3	-	0,2 ± 0,1	
	3-Metilciclo-hexanona	52 ± 1	58 ± 5	27 ± 13	59 ± 5	49 ± 2	
	<i>cis</i> -3-Metilciclo-hexanol	-	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	-	0,2 ± 0,0	
	<i>trans</i> -3-Metilciclo-hexanol	-	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	-	-	
	4-Metilciclo-hexanona	80 ± 4	77 ± 10	57 ± 13	104 ± 3	43 ± 9	
	<i>cis</i> -4-Metilciclo-hexanol	-	-	-	-	-	
	<i>trans</i> -4-Metilciclo-hexanol	-	-	1,2 ± 0,3	-	-	
	4-Metil-2-pentanona	48 ± 5	47 ± 3	41 ± 1	55 ± 6	59 ± 4	
	4-Metil-2-pentanol	-	-	-	-	-	
	2-Metil-3-pentanona		19 ± 5	31 ± 7	45 ± 7	31 ± 4	
	2-Metil-3-pentanol		0,2 ± 0,1	-	-	-	
	Acetofenona	41 ± 4	106 ± 7	47 ± 3	73 ± 6	45 ± 5	
1-Feniletanol	0,3 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,3 ± 0,1	-	-		

Os espaços com – traduzem a não detecção do composto na condição tabelada.

^ai = inibidores de protease

A formação dos isômeros geométricos *cis* foi favorecida na biotransformação da 2-metilciclo-hexanona (**14**) e da 3-metilciclo-hexanona (**3**). No caso de **14**, este é sub-produto da redução química. A redução da 4-metilciclo-hexanona (**15**) produziu apenas o isômero *trans*, com NADPH como co-fator adicionado, que, de modo geral, apresentou melhores resultados que o NADH.

A recuperação dos substratos, com exceção da norcânfora, foi abaixo do esperado, já que se obtiveram produtos de redução em rendimentos baixos, o que pode ser um indício do consumo das cetonas em outro(s) tipo(s) de reação ou da posterior biotransformação dos álcoois já produzidos.

5.2.5.2. *Eriobotrya japonica* – Rosaceae

Lorenzi *et al.* (2006) atribuem as seguintes características à espécie:

“A nespereira é uma frutífera exótica originária do Japão e amplamente cultivada na região Sudeste do Brasil, tanto em pomares domésticos como comerciais. É uma árvore perenifólia, de 6-10m de altura, (...). Muito apreciados, os frutos são consumidos *in natura*, compotas e licores”. (p. 482)

Os resultados das biotransformações realizadas conforme descrito no item 7.4.5.1, em “Materiais e Métodos”, com folhas de *Eriobotrya japonica*, do indivíduo de número identificador “G-01 / N° 0179”, estão apresentados na Tabela 5.7, a seguir.

Neste caso, o produto *exo-norborneol* (sub-produto da redução com boro-hidreto de sódio, descrita no relatório anterior) foi o único produto formado, e o rendimento em sua obtenção não sofreu variação significativa com a quantidade ou o tipo de co-fator adicionado. A quantidade total dos produtos formados não se altera substancialmente com mais de 6 horas de biotransformação.

A formação do isômero geométrico *cis* (subproduto da redução química) foi favorecida na biotransformação da 2-metilciclo-hexanona (**14**). A redução da 4-metilciclo-hexanona produziu apenas o isômero *trans*, com ou sem a adição de co-fator, sendo que os rendimentos não foram significativamente afetados com mais de 6 horas de biotransformação.

Tabela 5.7: Recuperação do substrato e rendimentos cromatográficos percentuais dos ensaios de biotransformação em homogenatos de *E. japonica*.

CO-FATORES		Não adicionado	NADPH		NADH	
			6	96	6	96
Tempo (h)		96	6	96	6	96
CETONA / ALCOÓIS	Norcânfora	106 ± 3	105 ± 2	104 ± 1	105 ± 2	106 ± 2
	exo-Norborneol	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1
	endo-Norborneol	-	-	-	-	-
	2-Metilciclo-hexanona	69 ± 2	92 ± 11	71 ± 10	102 ± 15	69 ± 11
	cis-2-Metilciclo-hexanol	-	1,2 ± 0,2	1,7 ± 0,6	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1
	trans-2-Metilciclo-hexanol	-	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	-	-
	3-Metilciclo-hexanona	80 ± 11	84 ± 6	66 ± 10	101 ± 11	70 ± 8
	cis-3-Metilciclo-hexanol	-	-	-	-	-
	trans-3-Metilciclo-hexanol	-	-	-	-	-
	4-Metilciclo-hexanona	103 ± 4	106 ± 10	102 ± 6	104 ± 6	93 ± 4
	cis-4-Metilciclo-hexanol	-	-	-	-	-
	trans-4-Metilciclo-hexanol	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,2	0,3 ± 0,0
	4-Metil-2-pentanona	70 ± 6	74 ± 4	48 ± 6	78 ± 5	52 ± 8
	4-Metil-2-pentanol	-	-	-	-	-
	2-Metil-3-pentanona	28 ± 3	64 ± 4	38 ± 5	78 ± 2	31 ± 5
	2-Metil-3-pentanol	-	-	-	-	-
	Acetofenona	51 ± 8	102 ± 8	49 ± 6	103 ± 5	58 ± 7
	1-Feniletanol	-	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	-	0,1 ± 0,0

Os espaços com – traduzem a não detecção do composto na condição tabelada.

5.2.5.3. *Morus nigra* - Moraceae

Lorenzi *et al.* (2006) atribuem as seguintes características à espécie:

“A amoreira-preta é uma frutífera exótica, nativa da China e Japão e muito cultivada na região Sul e Sudeste do Brasil, principalmente para a produção de folhas para a criação do bicho-da-seda. É uma árvore caducifólia, geralmente dióica, de 7-12 m de altura. (...) Os frutos são drupas compostas cilíndricas, ou seja, são infrutescências, de textura suculenta, de sabor acidulado e agradável, que amadurecem na primavera. (...) consumidos *in natura* ou na forma de doces e geléias”. (p. 442)

Os resultados das biotransformações realizadas conforme descrito no item 7.4.5.1, em “Materiais e Métodos”, com folhas de *Morus nigra* como biocatalisador, estão apresentados na Tabela 5.8, a seguir.

Tabela 5.8: Recuperação do substrato e rendimentos cromatográficos percentuais dos ensaios de biotransformação em homogenatos de *M. nigra*.

CO-FATORES		Não adicionado	NADPH		NADH	
Tempo (h)		96	6	96	6	96
CETONA / ALCOÓIS	Norcânfora	115 ± 13	106 ± 8	106 ± 10	109 ± 12	99 ± 6
	exo-Norborneol	1,5 ± 0,4	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,0	0,6 ± 0,1
	endo-Norborneol	0,2 ± 0,1	-	0,7 ± 0,2	-	-
	2-Metilciclo-hexanona	68 ± 5	90 ± 8	56 ± 7	86 ± 11	68 ± 6
	cis-2-Metilciclo-hexanol	0,5 ± 0,0	3,9 ± 0,4	3,3 ± 0,6	1,0 ± 0,2	1,3 ± 0,3
	trans-2-Metilciclo-hexanol	-	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,2	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,1
	3-Metilciclo-hexanona	75 ± 3	95 ± 5	64 ± 2	94 ± 4	79 ± 2
	cis-3-Metilciclo-hexanol	-	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	-	0,2 ± 0,0
	trans-3-Metilciclo-hexanol	0,1 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0
	4-Metilciclo-hexanona	93 ± 2	107 ± 6	101 ± 4	105 ± 5	79 ± 3
	cis-4-Metilciclo-hexanol	0,3 ± 0,0	0,9 ± 0,2	1,5 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,2
	trans-4-Metilciclo-hexanol	-	1,3 ± 0,2	-	-	-
	4-Metil-2-pentanona	47 ± 4	80 ± 2	38 ± 4	79 ± 3	44 ± 5
	4-Metil-2-pentanol	-	-	-	-	-
	2-Metil-3-pentanona	39 ± 2	64 ± 3	29 ± 5	64 ± 2	42 ± 16
	2-Metil-3-pentanol	-	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,0	-
	Acetofenona	55 ± 7	110 ± 8	46 ± 5	104 ± 3	61 ± 6
1-Feniletanol	-	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,2	-	-	

Os espaços com – traduzem a não detecção do composto na condição tabelada.

Neste caso, o isômero *endo*-norborneol só foi detectado após 96 horas de incubação. A formação do isômero geométrico *cis* (subproduto da redução química) foi favorecida na biotransformação da 2-metilciclo-hexanona (**14**), especialmente nas amostras incubadas com NADPH, obtendo-se até 3,9% deste isômero. Nos ensaios com esta espécie vegetal, o composto *cis*-4-metilciclo-hexanol (**23**) foi formado em maior proporção com relação ao *trans* que a observada nos ensaios com outras espécies, sendo que, na maior parte destes ensaios, o composto **23** não foi sequer foi detectado.

Como o consumo da 2-metilciclo-hexanona (**14**) foi próximo de 50%, optou-se por avaliar a enantiosseletividade pelo substrato neste caso, esperando que uma das formas enantioméricas tivesse sido preferencialmente biotransformada, o que possibilitaria a resolução da cetona de partida. As cetonas restantes após a

biotransformação foram, então, analisadas por cromatografia a gás em coluna quiral com fase estacionária β -ciclodextrina, os excessos enantioméricos foram determinados através da equação 4 e os resultados estão apresentados na Tabela 5.9.

Tabela 5.9: Excessos enantioméricos percentuais (e.e. \times 100) da cetona de partida (**14**) e do produto **23** em ensaios de biotransformação com homogenatos de *M. nigra*.

CO-FATORES	Não adicionado	NADPH	
		6	96
Tempo (h)	96	6	96
2-Metilciclo-hexanona ^a	57	4	62 \pm 15
<i>cis</i> -2-Metilciclo-hexanol ^a	66 \pm 28	63 \pm 30	100 \pm 0

^aConfiguração absoluta não estabelecida.

$$\boxed{E.e. = (A_R - A_S) / (A_R + A_S)} \quad \text{(equação 4)}$$

Sendo:

A_R ou A_S = áreas dos picos de cada um dos enantiômeros nos cromatogramas obtidos por CG/DIC.

O enriquecimento enantiomérico da cetona de partida foi favorecido em períodos maiores de biotransformação, mesmo em amostras às quais não se adicionou co-fator, sugerindo que outras enzimas, além das redutases-alvo, podem estar ativas nos homogenatos, consumindo enantiosseletivamente a 2-metilciclo-hexanona (**14**), já que o rendimento da redução foi de apenas 0,5% (pouco acima de 3 vezes o limite inferior de quantificação) em amostras às quais não se adicionou co-fator e a recuperação de **14** foi de 68% após 96 horas, com e.e. de 57%. Já a(s) redutase(s) que atuou(aram) na biorredução deste substrato demonstrou(aram) reconhecimento das faces enantiotópicas. Embora o tempo de incubação com o substrato (6 e 96 horas) não tenha influenciado significativamente o rendimento, tempos maiores de biotransformação, com homogenatos de *Morus nigra*, favorecem a enantiosseletividade do processo, tanto com relação ao substrato, quanto com relação ao produto. A adição de NADPH favoreceu tanto o rendimento da redução quanto a enantiosseletividade do processo, especialmente do produto, sugerindo a presença de

enzima(s) dependente(s) deste co-fator, que, quando da adição de NADPH ao meio reacional, permitiu(iram) a obtenção do produto *cis*-2-metilciclo-hexanol (**21**) enantiomericamente puro após 96 horas de biotransformação. Para a otimização do rendimento, é preciso purificar os homogenatos e ensaiar intervalos intermediários de biotransformação, que gerariam uma quantidade de amostras inviável ao processamento manual, e, portanto, não foram abrangidos nesta investigação com homogenatos brutos de amostras ambientais, etapa primária de uma sequência de procedimentos de triagem por enzimas vegetais para biocatálise em tecidos diferenciados, a partir da qual se empregam as técnicas de purificação e de “engenharia de proteínas” para melhorar determinado aspecto da atividade da enzima, no caso, sua produtividade. O emprego de enzimas comerciais com alto grau de pureza certamente supera, em produtividade, a utilização de homogenatos de tecido vegetal em que estão presentes, simultaneamente, enzimas com atividades distintas, oligosacarídeos, compostos fenólicos, sais e outras biomoléculas solúveis no tampão extrator que, mesmo em quantidades-traço, podem inibir atividades enzimáticas. A utilização de sistemas de células íntegras (em atividade ou em repouso) também fornece maiores rendimentos, já que as enzimas se encontram em seu meio natural de atuação, no interior ou na superfície das células.

5.2.5.4. *Artocarpus heterophyllus* - Moraceae

Lorenzi *et al.* (2006) atribuem as seguintes características à espécie:

“A jaqueira é uma frutífera exótica introduzida no Brasil ainda nos tempos coloniais e amplamente cultivada em pomares domésticos de todas as regiões tropicais do país; é originária da Índia de onde é provavelmente nativa, contudo, hoje ocorre na natureza em toda a Ásia tropical. É uma árvore monóica, perenifólia e lactescente de 10-20 m de altura. (...) Os frutos são do tipo sincarpo, de amadurecimento no verão, com polpa crocante ou mole, de sabor doce e aromática, que envolve as sementes”. (p. 435)

Os resultados das biotransformações realizadas conforme descrito no item 7.4.5.1, em “Materiais e Métodos”, com folhas de *Artocarpus heterophyllus* como biocatalisador, estão apresentados na Tabela 5.10.

Os homogenatos obtidos da espécie vegetal biotransformaram somente duas das cetonas-modelo, nas amostras às quais se adicionou NADPH, após 96 horas de incubação a 30 °C, obtendo-se apenas um dos diastereoisômeros.

Os resultados obtidos com esta espécie podem se dever à presença de inibidores das enzimas de interesse nas folhas, já que componentes com atividade inibitória de 5 α -redutase (enzima que atua na conversão da testosterona em androgênios mais potentes, daí a potencial utilidade destes inibidores no tratamento de anormalidades relacionadas a estes hormônios, como a hiperplasia da próstata) já foram identificados em extratos de folhas de plantas do gênero *Artocarpus* em acetona, como a cloroforina e a artocarpina (SHIMIZU *et al.*, 2000).

Tabela 5.10: Recuperação do substrato e rendimentos cromatográficos percentuais dos ensaios de biotransformação em homogenatos de *A. heterophyllus*.

CO-FATORES		Não adicionado	NADPH		NADH	
			6	96	6	96
Tempo (h)		96	6	96	6	96
CETONA / ALCOÓIS	Norcânfora	108 ± 8	103 ± 5	96 ± 7	98 ± 6	102 ± 8
	exo-Norborneol	-	-	1,1 ± 0,2	-	-
	endo-Norborneol	-	-	-	-	-
	2-Metilciclo-hexanona	72 ± 4	87 ± 6	59 ± 2	86 ± 7	66 ± 6
	cis-2-Metilciclo-hexanol	-	-	-	-	-
	trans-2-Metilciclo-hexanol	-	-	-	-	-
	3-Metilciclo-hexanona	72 ± 4	93 ± 2	63 ± 5	95 ± 7	73 ± 6
	cis-3-Metilciclo-hexanol	-	-	-	-	-
	trans-3-Metilciclo-hexanol	-	-	-	-	-
	4-Metilciclo-hexanona	86 ± 5	97 ± 3	78 ± 4	95 ± 5	77 ± 4
	cis-4-Metilciclo-hexanol	-	-	-	-	-
	trans-4-Metilciclo-hexanol	-	-	0,5 ± 0,1	-	-
	4-Metil-2-pentanona	42 ± 2	85 ± 6	40 ± 3	79 ± 6	41 ± 6
	4-Metil-2-pentanol	-	-	-	-	-
	2-Metil-3-pentanona	36 ± 2	62 ± 7	26 ± 5	66 ± 4	39 ± 5
	2-Metil-3-pentanol	-	-	-	-	-
	Acetofenona	48 ± 5	90 ± 6	47 ± 4	97 ± 5	65 ± 3
	1-Feniletanol	-	-	-	-	-

Os espaços com – traduzem a não detecção do composto na condição tabelada.

5.2.5.5. *Eugenia uniflora* - Myrtaceae

Lorenzi *et al.* (2006) atribuem as seguintes características à espécie:

“A pitangueira é muito cultivada em pomares domésticos de todo o país e freqüente em seu habitat natural nas matas semidecíduas do Planalto e da Bacia do Paraná desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, bem como nas restingas de toda a costa brasileira. É uma árvore semidecídua muito variável, de 6-12 m, com brotação nas raízes que chegam a formar touceira. (...) Frutos globoso-costados, de tamanho e cor variáveis com a forma, de polpa succulenta doce ou acidulada, ocasionalmente resinosa; maturação de outubro a janeiro. (...) Os frutos são consumidos *in natura* (frescos ou em sucos) e na forma de geléias”. (p. 214)

Os resultados das biotransformações realizadas conforme descrito no item 7.4.5.1, em “Materiais e Métodos”, com folhas de *Eugenia uniflora*, do indivíduo de número identificador “G-01 / N° 0261”, estão apresentados na Tabela 5.11.

Tabela 5.11: Recuperação do substrato e rendimentos cromatográficos percentuais dos ensaios de biotransformação em homogenatos de *E. uniflora*.

CO-FATORES		Não adicionado	NADPH		NADH	
			6	96	6	96
Tempo (h)		96	6	96	6	96
CETONA / ALCOÓIS	Norcânfora	98 ± 8	105 ± 5	103 ± 7	102 ± 6	98 ± 8
	exo-Norborneol	-	-	2,0 ± 0,2	-	-
	endo-Norborneol	-	-	-	-	-
	2-Metilciclo-hexanona	68 ± 5	94 ± 4	71 ± 5	92 ± 5	70 ± 8
	cis-2-Metilciclo-hexanol	-	-	-	-	-
	trans-2-Metilciclo-hexanol	-	-	-	-	-
	3-Metilciclo-hexanona	52 ± 4	58 ± 5	70 ± 5	53 ± 5	44 ± 2
	cis-3-Metilciclo-hexanol	-	-	-	-	-
	trans-3-Metilciclo-hexanol	-	-	-	-	-
	4-Metilciclo-hexanona	93 ± 2	97 ± 6	79 ± 4	96 ± 5	78 ± 3
	cis-4-Metilciclo-hexanol	-	-	-	-	-
	trans-4-Metilciclo-hexanol	-	-	0,9 ± 0,2	-	-
	4-Metil-2-pentanona	77 ± 6	84 ± 4	52 ± 6	67 ± 5	58 ± 8
	4-Metil-2-pentanol	-	-	-	-	-
	2-Metil-3-pentanona	42 ± 2	52 ± 7	31 ± 5	58 ± 4	37 ± 5
	2-Metil-3-pentanol	-	-	-	-	-
	Acetofenona	55 ± 7	110 ± 8	48 ± 5	94 ± 3	65 ± 6
1-Feniletanol	-	-	-	-	-	

Os espaços com – traduzem a não detecção do composto na condição tabelada.

Os homogenatos obtidos das folhas de pitangueira biotransformaram somente duas das cetonas-modelo, nas amostras às quais se adicionou NADPH, após 96 horas de incubação a 30 °C, mostrando a mesma preferência, observada em homogenatos de folhas da jaqueira, pela formação de *exo*-norborneol e *trans*-4-metilciclo-hexanol.

5.2.5.6. *Citrus sinensis* - Rutaceae

Lorenzi *et al.* (2006) atribuem as seguintes características à espécie:

“A laranjeira é uma frutífera exótica, originária possivelmente do sul da China e nordeste da Índia; introduzida no Brasil no início da colonização, é amplamente cultivada em pomares domésticos e comerciais de todo o país. É uma árvore perenifólia, epinescente, de 5-10 m de altura. (...) Frutos globosos ou subglobosos, com casca aromática de difícil remoção, com polpa de 10-14 gomos, subácida a doce, com ou sem sementes; maturação do verão ao inverno”. (p. 564)

Tabela 5.12: Recuperação do substrato e rendimentos cromatográficos percentuais dos ensaios de biotransformação em homogenatos de *C. sinensis*.

CO-FATORES		Não adicionado	NADPH		NADH	
			Tempo (h)	96	6	96
CETONA / ALCOÓIS	Norcânfora	51 ± 5	101 ± 6	57 ± 3	105 ± 5	53 ± 2
	<i>exo</i> -Norborneol	1,3 ± 0,3	2,1 ± 0,4	1,5 ± 0,2	2,1 ± 0,4	1,5 ± 0,2
	<i>endo</i> -Norborneol	-	-	-	-	-
	2-Metilciclo-hexanona	78 ± 5	93 ± 8	76 ± 6	98 ± 5	82 ± 4
	<i>cis</i> -2-Metilciclo-hexanol	-	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1
	<i>trans</i> -2-Metilciclo-hexanol	-	-	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0
	3-Metilciclo-hexanona	79 ± 8	98 ± 5	73 ± 6	97 ± 7	73 ± 6
	<i>cis</i> -3-Metilciclo-hexanol	-	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1
	<i>trans</i> -3-Metilciclo-hexanol	-	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0
	4-Metilciclo-hexanona	86 ± 5	101 ± 8	93 ± 5	60 ± 4	87 ± 6
	<i>cis</i> -4-Metilciclo-hexanol	-	0,3 ± 0,0	0,7 ± 0,1	-	0,5 ± 0,1
	<i>trans</i> -4-Metilciclo-hexanol	-	0,7 ± 0,0	1,2 ± 0,1	1,8 ± 0,3	1,0 ± 0,2
	4-Metil-2-pentanona	49 ± 5	80 ± 5	61 ± 7	94 ± 4	62 ± 6
	4-Metil-2-pentanol	-	-	0,3 ± 0,0	-	-
	2-Metil-3-pentanona	36 ± 6	32 ± 14	46 ± 4	93 ± 5	50 ± 2
	2-Metil-3-pentanol	-	-	-	-	-
	Acetofenona	55 ± 4	94 ± 7	61 ± 5	97 ± 6	67 ± 5
	1-Feniletanol	-	-	0,4 ± 0,0	-	0,3 ± 0,0

Os espaços com – traduzem a não detecção do composto na condição tabelada.

]

Os resultados das biotransformações realizadas conforme descrito no item 7.4.5.1, em “Materiais e Métodos”, com folhas de *Citrus sinensis*, do indivíduo de número identificador “G-01 / N° 0260”, estão apresentados na Tabela 5.12.

Embora a biotransformação da 4-metil-2-pentanona não tenha apresentado rendimento apreciável, esta foi a única espécie vegetal que gerou amostras de homogenato nas quais foram produzidas quantidades detectáveis de 4-metil-2-pentanol, com NADPH adicionado ao meio.

5.2.5.7. *Cestrum nocturnum* - Solanaceae

Popularmente conhecida como dama-da-noite, os extratos obtidos de seus tecidos têm atividade larvicida, na inibição do desenvolvimento da pupa e na emergência do inseto adulto do *Aedes aegypti* (PATIL *et al.*, 2011).

Os resultados das biotransformações realizadas conforme descrito no item 7.4.5.1, em “Materiais e Métodos”, com folhas de *Cestrum nocturnum* como biocatalisador, estão apresentados na Tabela 5.13.

A formação do álcool *cis* foi favorecida na biotransformação da 2-metilciclohexanona (**14**), especialmente nas amostras incubadas com NADPH por 96 h, obtendo-se 5,0% de rendimento deste isômero geométrico, com 100% de excesso enantiomérico.

5.2.5.8. *Plectranthus barbatus* - Labiatae

As plantas desta família são espécies herbáceas ou arbustivas, com folhas e outras partes aéreas cobertas de pêlos, alguns dos quais são glandulares e secretam óleos voláteis (EVANS, 2002, p 33-34).

Os resultados das biotransformações realizadas conforme descrito no item 7.4.5.1, em “Materiais e Métodos”, com folhas de *Plectranthus barbatus* (“falso boldo”) como biocatalisador, estão apresentados na Tabela 5.14. Neste ensaio se destaca a total predominância do produto *exo-norborneol*, apenas detectado nas amostras com adição de NADPH, incubadas por 96 horas, em rendimento de 2,8%.

5.2.6. Biotransformações com homogenatos obtidos de culturas de células de *Cereus peruvianus* - Cactaceae

As cactáceas são plantas xerófitas, nativas da América, suculentas e mucilaginosas, armazenando água em seus caules (EVANS, 2002, p 22).

Os resultados das biotransformações realizadas conforme descrito no item 7.4.5.2 (Materiais e Métodos, p.XX), com homogenatos produzidos a partir de células da cultura de *Cereus peruvianus* em suspensão, estão apresentados na Tabela 5,15, a seguir.

Tabela 5.13: Recuperação do substrato e rendimentos cromatográficos percentuais dos ensaios de biotransformação em homogenatos de *Cestrum spp.*

CO-FATORES		Não adicionado	NADPH		NADH	
			6	96	6	96
Tempo (h)		96	6	96	6	96
CETONA / ALCOÓIS	Norcânfora	35 ± 7	109 ± 8	64 ± 6	98 ± 7	62 ± 7
	exo-Norborneol	1,0 ± 0,2	2,4 ± 0,4	1,8 ± 0,2	2,2 ± 0,3	1,7 ± 0,2
	endo-Norborneol	-	-	0,7 ± 0,0	-	-
	2-Metilciclo-hexanona	75 ± 5	99 ± 6	82 ± 3 (e.e. ^a = 32)	97 ± 8	71 ± 4
	cis-2-Metilciclo-hexanol	-	3,2 ± 0,5	5,0 ± 0,5 (e.e. ^a = 100)	2,2 ± 0,1	2,0 ± 0,2
	trans-2-Metilciclo-hexanol	-	0,3 ± 0,0	0,6 ± 0,1	-	-
	3-Metilciclo-hexanona	83 ± 3	101 ± 4	80 ± 2	100 ± 6	73 ± 5
	cis-3-Metilciclo-hexanol	-	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,1	-
	trans-3-Metilciclo-hexanol	-	0,5 ± 0,0	0,7 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1
	4-Metilciclo-hexanona	91 ± 4	107 ± 5	97 ± 5	98 ± 4	88 ± 2
	cis-4-Metilciclo-hexanol	-	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,2	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0
	trans-4-Metilciclo-hexanol	-	0,9 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1
	4-Metil-2-pentanona	61 ± 3	87 ± 5	51 ± 3	78 ± 3	56 ± 4
	4-Metil-2-pentanol	-	-	-	-	-
	2-Metil-3-pentanona	33 ± 1	73 ± 6	48 ± 4	63 ± 3	32 ± 2
	2-Metil-3-pentanol	-	-	-	-	-
	Acetofenona	52 ± 4	85 ± 5	80 ± 2	88 ± 6	64 ± 3
1-Feniletanol	-	-	0,7 ± 0,2	-	-	

Os espaços com – traduzem a não detecção do composto na condição tabelada.

^ae.e. (excesso enantiomérico) = $(A_R - A_S) / (A_R + A_S)$, onde A_R ou A_S são as áreas dos picos de cada um dos enantiômeros, determinadas por CG/DIC. Configuração absoluta não estabelecida.

Tabela 5.14: Recuperação do substrato e rendimentos cromatográficos percentuais dos ensaios de biotransformação em homogenatos de *P. barbatus*.

CO-FATORES		Não adicionado	NADPH		NADH	
Tempo (h)		96	6	96	6	96
CETONA / ALCOÓIS	Norcânfora	98 ± 6	93 ± 5	103 ± 7	96 ± 8	92 ± 7
	exo-Norborneol	-	-	2,8 ± 0,3	-	-
	endo-Norborneol	-	-	-	-	-
	2-Metilciclo-hexanona	65 ± 4	79 ± 7	69 ± 2	84 ± 6	74 ± 6
	cis-2-Metilciclo-hexanol	-	-	1,1 ± 0,2	-	0,6 ± 0,1
	trans-2-Metilciclo-hexanol	-	-	0,5 ± 0,1	-	0,2 ± 0,0
	3-Metilciclo-hexanona	66 ± 3	91 ± 2	68 ± 5	89 ± 4	73 ± 6
	cis-3-Metilciclo-hexanol	-	-	0,7 ± 0,1	-	0,3 ± 0,0
	trans-3-Metilciclo-hexanol	-	-	0,4 ± 0,1	-	0,1 ± 0,0
	4-Metilciclo-hexanona	88 ± 5	95 ± 3	85 ± 5	96 ± 7	86 ± 4
	cis-4-Metilciclo-hexanol	-	-	0,6 ± 0,1	-	-
	trans-4-Metilciclo-hexanol	-	-	1,5 ± 0,1	-	-
	4-Metil-2-pentanona	40 ± 4	83 ± 6	48 ± 3	78 ± 5	42 ± 3
	4-Metil-2-pentanol	-	-	-	-	-
	2-Metil-3-pentanona	38 ± 2	66 ± 4	35 ± 5	62 ± 5	37 ± 2
	2-Metil-3-pentanol	-	-	-	-	-
	Acetofenona	45 ± 5	89 ± 5	51 ± 4	94 ± 6	60 ± 3
1-Feniletanol	-	-	-	-	-	

Os espaços com – traduzem a não detecção do composto na condição tabelada.

5.2.7. Determinação da concentração de proteínas

O método de Bradford (1976) baseia-se na interação, em meio ácido, entre cadeias laterais aromáticas ou básicas dos aminoácidos constituintes das proteínas a serem quantificadas e o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (reagente de Bradford, Figura 5). Esta interação estabiliza a forma aniônica do corante, alterando o comprimento de onda de sua absorbância máxima de 465 para 595 nm, o que produz

uma mudança de coloração da solução de castanho para azul, de acordo com a concentração de proteínas. Os valores de concentrações do padrão gama globulina plasmática bovina e os correspondentes valores de absorvância encontram-se relacionados na Tabela 5.16. A partir desses valores, confeccionou-se uma curva de calibração pelo método da regressão linear, empregando-se o desvio padrão da média (*standard error of the mean*) como peso das medidas de absorvância e fazendo-se a reta passar pelo zero, já que um branco contendo apenas o reagente de Bradford foi utilizado no ajuste de 100% T.

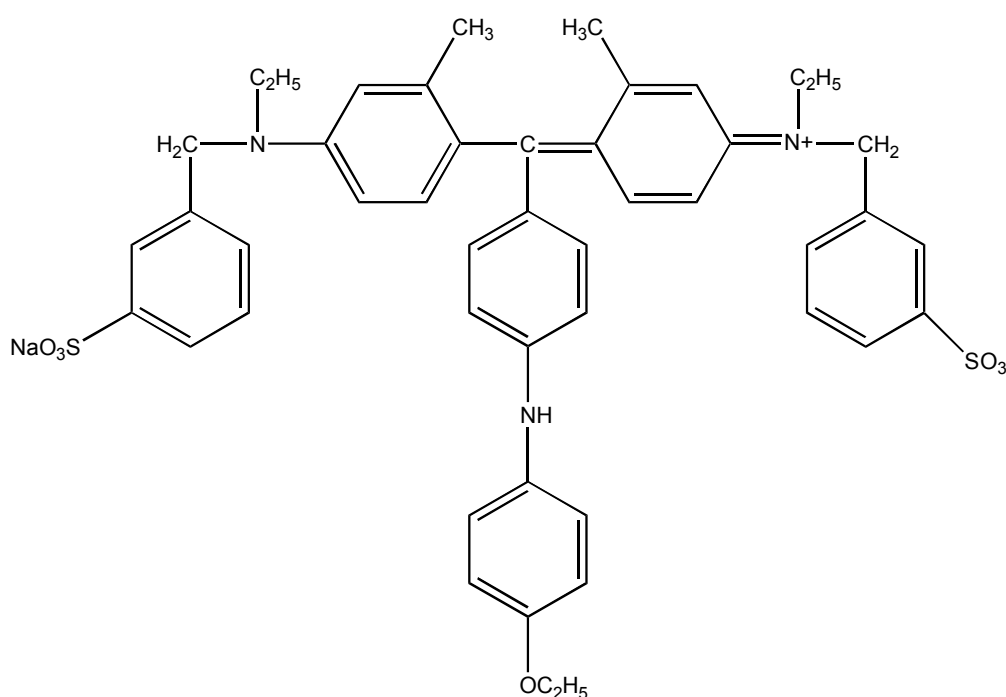


Figura 5: Estrutura do corante Coomassie Brilliant Blue G-250.

Inicialmente, foram tomadas medidas de absorvância em amostras de homogenato de *E. japonica* obtidas pelo procedimento que precedeu o estabelecimento do protocolo definitivo dos ensaios de biotransformação, sendo que a única diferença estava na segunda etapa de centrifugação, a 10000 RPM por 20 minutos em centrífuga não refrigerada, enquanto no procedimento definitivo os sobrenadantes da primeira centrifugação são centrifugados a 17000 RPM por 20 minutos, em ultracentrífuga, à temperatura constante de 4 °C. Os pontos da curva de calibração tomados nesta ocasião estão relacionados na Tabela 5.16.

Esta metodologia foi seguida na determinação da concentração de proteínas totais nos homogenatos reservados e armazenados, conforme descrito no item 7.4.6 (p.XX). Os valores obtidos se encontram relacionados na Tabela 5.17, a seguir.

Tabela 5.15: Recuperação do substrato e rendimentos cromatográficos percentuais dos ensaios de biotransformação em homogenatos de *C. peruvianus*.

CO-FATORES		Não adicionado	NADPH		NADH	
			6	96	6	96
Tempo (h)		96	6	96	6	96
CETONA / ALCOÓIS	Norcânfora	98 ± 10	73 ± 7	94 ± 8	99 ± 11	80 ± 5
	exo-Norborneol	1,5 ± 0,4	0,8 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,1 ± 0,0	1,5 ± 0,1
	endo-Norborneol	-	-	-	0,2 ± 0,0	-
	2-Metilciclo-hexanona	69 ± 6	101 ± 8	70 ± 6	98 ± 5	64 ± 4
	cis-2-Metilciclo-hexanol	-	0,3 ± 0,4	0,3 ± 0,6	-	-
	trans-2-Metilciclo-hexanol	-	-	-	-	-
	3-Metilciclo-hexanona	61 ± 5	96 ± 6	63 ± 3	100 ± 5	61 ± 4
	cis-3-Metilciclo-hexanol	-	0,3 ± 0,0	-	0,3 ± 0,1	-
	trans-3-Metilciclo-hexanol	-	0,3 ± 0,0	-	0,3 ± 0,0	-
	4-Metilciclo-hexanona	68 ± 3	98 ± 6	74 ± 5	96 ± 4	69 ± 4
	cis-4-Metilciclo-hexanol	-	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,0	-
	trans-4-Metilciclo-hexanol	1,0 ± 0,1	2,2 ± 0,2	1,7 ± 0,2	4,2 ± 0,4	1,6 ± 0,2
	4-Metil-2-pentanona	37 ± 5	55 ± 3	37 ± 4	64 ± 2	40 ± 4
	4-Metil-2-pentanol	-	-	-	-	-
	2-Metil-3-pentanona	36 ± 4	62 ± 1	23 ± 7	64 ± 2	38 ± 9
	2-Metil-3-pentanol	-	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,0	-
	Acetofenona	42 ± 4	94 ± 6	48 ± 5	98 ± 6	41 ± 1
1-Feniletanol	-	-	-	0,3 ± 0,2	-	

Os espaços com – traduzem a não detecção do composto na condição tabelada.

Tabela 5.16: Pontos da curva de calibração com padrão γ -globulina.

γ -Globulina (mg/mL)	Absorbância a 595 nm	Dados:	
0,296	0,1765 \pm 0,008	Coefficiente angular	0,484 \pm 0,007
0,592	0,3600 \pm 0,030	Coefficiente de correlação linear	0,99392
0,888	0,4400 \pm 0,020	Absorbância da amostra de <i>E.</i> <i>japonica</i>	0,24 \pm 0,03
1,184	0,5800 \pm 0,040	Concentração de proteínas totais (mg/mL):	0,50 \pm 0,06
1,480	0,6500 \pm 0,020		

Tabela 5.17: Concentração de proteínas totais nos homogenatos obtidos pelo procedimento definitivo, determinada pelo método de Bradford.

ESPÉCIE VEGETAL	Concentração de proteínas totais (mg/mL)
<i>Bauhinia variegata</i>	0,24 \pm 0,02
<i>Eriobotrya japonica</i>	0,40 \pm 0,01
<i>Morus nigra</i>	0,84 \pm 0,05
<i>Artocarpus heterophyllus</i>	0,10 \pm 0,02
<i>Artocarpus heterophyllus</i> ^a	0,21 \pm 0,04
<i>Eugenia uniflora</i>	0,08 \pm 0,02
<i>Citrus sinensis</i>	0,51 \pm 0,06
<i>Cestrum nocturnum</i>	1,50 \pm 0,13
<i>Plectranthus barbatus</i>	0,56 \pm 0,01
<i>Cereus peruvianus</i>	0,56 \pm 0,14

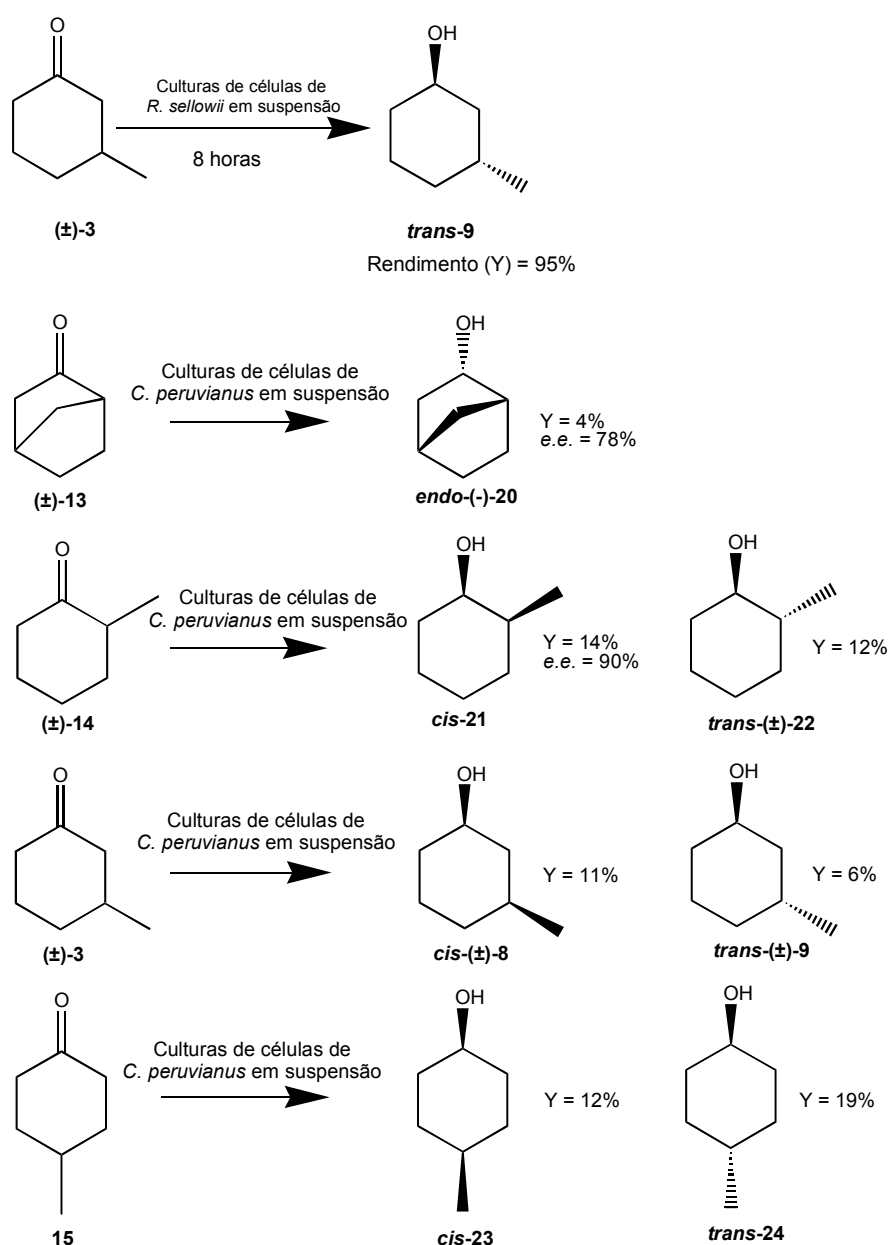
^aAmostras de homogenatos usados no ensaio em que foram testados os inibidores de protease.

Coefficiente angular	0,306 \pm 0,011
Coefficiente de correlação linear	0,99738

5.3. Considerações sobre biorreduções por espécies vegetais

As culturas de células de *R. sellowii* e *C. peruvianus* reduziram algumas das cetonas-modelo, especialmente representantes de cetonas cíclicas metil ou metileno-substituídas, conforme representado no Esquema 5.4.

Esquema 5.4



No caso das culturas em suspensão de *R. sellowii*, o rendimento da biotransformação da 3-metilciclohexanona foi de 95%, com total

diastereosseletividade. Já com as culturas de *Cerus peruvianus* não se observou diastereosseletividade apreciável nas biorreduções de ciclo-hexanonas metil-substituídas, mas os produtos obtidos eram enantiomericamente enriquecidos. Estes resultados demonstraram a capacidade de culturas de células vegetais em suspensão em biotransformar enantiosseletivamente substratos exógenos, sem a necessidade de adição de co-fatores, e exportá-los para o meio extracelular, de onde foram recuperados através de procedimentos de extração com solventes orgânicos imiscíveis com a água.

Os rendimentos de redução com a cultura de *C. peruvianus* como biocatalisador podem ser aumentados pelo ajuste do tempo de biotransformação, que foi de 96 horas, assim estabelecido por limitações de biomassa disponível para ensaiar outros intervalos de biotransformação com todas as cetonas-modelo, em duplicata, para garantir que houvesse biorredução neste ensaio (com base na experiência adquirida na utilização de culturas de células vegetais em suspensão em biocatálise) e para a comparação com os resultados obtidos com homogenatos obtidos desta cultura de células, após 96 horas de biotransformação.

No trabalho de Carballeira e colaboradores (2004) sobre biotransformações com células em crescimento, em repouso e liofilizadas, imobilizadas em diferentes matrizes, de bactérias, actinomicetos, leveduras e fungos filamentosos, em que se buscavam enzimas com atividades de mono-oxigenação de cetonas, com tempo de biotransformação de 72 h, apenas uma pequena parcela das espécies testadas se mostrou ativa, e eram, em sua maioria, leveduras. O substrato ciclo-hexanona foi biotransformado por duas enzimas distintas: uma desidrogenase dependente de NADPH, em um equilíbrio, e uma mono-oxigenase de Baeyer-Villiger (BV), em uma reação irreversível (Figura 1.5, *vide* p. 22).

Os resultados mostraram que, quando são utilizadas concentrações baixas de poliacrilamida no trapeamento das células, apenas a reação de Baeyer-Villiger é observada, enquanto em concentrações maiores da matriz, era possível controlar qual reação seria favorecida em função da velocidade de agitação do meio de cultura, sendo observada maior produção de ciclo-hexanol em condições de menor oxigenação (rendimentos de redução de até 36%). A concentração do substrato também foi um fator determinante na preferência por uma ou outra rota de biotransformação, sendo que, em concentrações de ciclo-hexanona superiores a 100 mM, apenas a reação de redução foi observada, sugerindo uma menor toxicidade

deste substrato para a desidrogenase do que para mono-oxigenase. Além da concentração do substrato, da matriz de imobilização e condições de oxigenação, variáveis como a fase do ciclo celular podem determinar qual reação é favorecida: a mono-oxigenação *BV* ou a redução, sendo privilegiada a redução quando se empregaram células em crescimento. A cinética da redução foi avaliada na biotransformação de ciclo-hexanonas por *Geotrichum candidum*, sendo que a reação de redução predominou nas primeiras 72 horas, após o que o ciclo-hexanol, parte de um equilíbrio químico, foi quase totalmente biotransformado no produto de mono-oxigenação *BV* irreversível. Como o NADPH está relacionado à energia da célula, a mono-oxigenação tem início quando os estoques de energia começam a se esgotar, quando, então, o ciclo-hexanol passa a ser oxidado, para produzir NADPH como “sub-produto”. Além destes fatores citados, reações laterais de degradação da cetona de partida podem contribuir para diminuir o rendimento das biorreduções (CARBALLEIRA, ÁLVAREZ & SINISTERRA, 2004).

Em vista deste conjunto de aspectos, pode-se inferir que o ajuste racional de todas as variáveis que influenciam o processo possibilite a biorredução estereosseletiva e eficiente de cetonas com culturas de células vegetais, cujos sistemas enzimáticos ainda são muito pouco estudados em biocatálise. Sistemas de células inteiras oferecem a possibilidade de regeneração do co-fator a partir co-substratos baratos e acessíveis ou, no caso de cianobactérias e plantas fotossintéticas, a partir de energia luminosa (GOLDBERG *et al.*, 2007). As enzimas também apresentam maior estabilidade nestes sistemas, porém, a toxicidade de substratos exógenos para culturas de células vegetais, usualmente maior que para células de fungos ou bactérias, faz com que os rendimentos de extração dos produtos de redução do meio aquoso sejam baixos, já que os substratos devem ser empregados em baixa concentração e os produtos de redução ficam, conseqüentemente, muito diluídos. Dentre outras limitações ao emprego de culturas de células vegetais em suspensão estão aquelas relacionadas à difusão e à passagem dos xenobióticos para os meios intra e extracelulares, através da parede celulósica; bem como sua sensibilidade às tensões de cisalhamento decorrente de sua tendência a formar agregados. Por isso, culturas de células vegetais ainda são pouco exploradas em biotransformações, apesar de seu potencial para biotransformar substratos volumosos e estericamente impedidos.

Em estudos fitoquímicos de rotas biossintéticas, a atividade enzimática de preparações enzimáticas do tipo *cell-free extract*, como extratos obtidos pela ruptura

da parede celular vegetal através da maceração do tecido em nitrogênio líquido, é quantificada em mol de produto por unidade de tempo, considerando o volume de homogenato ou sua massa de proteínas totais. Assim, 1 mol/s equivale a 1 kat, e 1 pmol/s ou 10^{-12} mol/s equivalem a 1 pkat, que pode ser expresso por massa de proteína ou por volume de homogenato. Na Tabela 5.18 são dados, entre parênteses, os valores de atividade enzimática por 100 μL de homogenato, que corresponde ao volume das amostras utilizadas nos ensaios, que foram planejados para a menor escala possível com o instrumental disponível. Os procedimentos de centrifugação foram adotados no sentido de restringir o estudo às enzimas solúveis no tampão fosfato 50 mM, de pH entre 6,5 e 6,8 (conforme especificado no procedimento experimental, item 7.4.5, p.XX). Os dados de atividade enzimática expostos na Tabela 5.18 foram calculados apenas para algumas das biotransformações selecionadas, que ocorreram em 6 horas. Em todos os casos, com exceção dos indicados por legendas, as biotransformações foram realizadas com a adição do co-fator NADPH ao homogenato.

Tabela 5.18: Atividade enzimática dos homogenatos em biotransformações selecionadas, ocorridas em 6 horas

Atividade enzimática - pkat / mg de proteína (10^{-3} pkat/100 μL)				
	exo-Norborneol	cis-2-Metilciclo-hexanol	cis-4-Metilciclo-hexanol	trans-4-Metilciclo-hexanol
<i>Eriobotrya japonica</i>		25 (1,0)		
<i>Morus nigra</i>		38 (3,2)	9 (0,8)	13 (1,1)
<i>Citrus sinensis</i>	34 (1,8) ^a			
<i>Cestrum nocturnum</i>	13 (2,0)	18 (2,6)		
<i>Cereus peruvianus</i>				64 (3,6) ^b

^aValores coincidentes em amostras com adição de NADH e amostras com adição de NADPH.

^bValores referentes às amostras com adição de NADH.

Os valores de atividade enzimática tabelados estão em correspondência com valores de atividade enzimática normalmente encontrados em homogenatos de células vegetais, em estudos com enzimas do metabolismo secundário e seus substratos específicos. Em culturas de células de *Catharantus roseus*, por exemplo, foi relatada uma atividade enzimática máxima de geraniol-10-hidroxilase de 8,5 pkat/mg de

proteína, em homogenatos obtidos a partir de células desta cultura (MORENO, 1994). Nesta triagem biocatalítica foram utilizados tecidos e células de diversas espécies vegetais, mas apenas algumas espécies mostraram atividade enzimática relevante na biotransformação de alguns dos substratos-modelo; as amostras selecionadas são as que aparecem na Tabela 5.18. Os resultados obtidos levam à constatação de que homogenatos de células vegetais empregados na biotransformação de substratos exógenos podem, em determinadas condições, apresentar atividades enzimáticas semelhantes ou mesmo superiores às observadas em reações próprias do metabolismo secundário. No presente estudo, apenas as cetonas cíclicas metil ou metileno-substituídas foram biotransformadas com velocidade considerável, em até 6 horas de incubação. Em todos os casos da Tabela 5.18, com exceção da redução da 4-metilciclo-hexanona pela *Morus nigra*, as biotransformações se deram de modo completamente ou quase completamente diastereosseletivo. No caso da redução da norcânfora e da 2-metilciclo-hexanona, foram obtidos os isômeros geométricos subprodutos da redução por NaBH_4 .

De todos os homogenatos de tecidos vegetais preparados, apenas aqueles produzidos a partir de *C. peruvianus* foram obtidos de tecidos de calo (células indiferenciadas), enquanto os demais se obtiveram de folhas, e se destacaram dentre os casos para os quais se calculou a atividade enzimática. Isto ocorreu porque culturas de células vegetais são melhores como fonte de enzimas ativas do que tecidos diferenciados, já que suas organelas de reserva, geralmente, não acumulam metabólitos secundários e a quantidade de polímero da parede celular não é tão pronunciada, uma vez que, durante a diferenciação celular, as células vegetais passam a acumular e depositar celulose ou hemicelulose em suas paredes, com posterior incrustação de lignina, cutina ou suberina (EVANS, 2002).

Os homogenatos de *Cereus peruvianus* obtidos a partir de células da cultura em suspensão reduziram a 4-metilciclo-hexanona em *trans*-4-metilciclo-hexanol em 6 horas, naquelas amostras às quais se adicionou NADPH, com atividade enzimática que se destacou também entre os demais substratos ou condições investigadas com esta espécie (64 pkat/mg de proteína). Estes resultados mostram boa correlação com aqueles obtidos em ensaios de biotransformação pelas culturas de *C. peruvianus* em suspensão, sendo que a referida cetona foi biotransformada em homogenatos desta espécie mesmo em amostras sem adição de co-fatores. No entanto, a diastereosseletividade observada nos homogenatos foi consideravelmente menor nas culturas de células. Enquanto naqueles não se observou a formação do *cis*-4-

metilciclo-hexanol ou este foi detectado em valores de concentração que se situavam entre 5 e 17% da concentração do isômero *trans*, nas culturas o isômero *cis* foi obtido em concentração equivalente a 63% da concentração do *trans*. Isto não significa que a biotransformação pelo homogenatos seja mais diastereosseletiva, já que a conversão máxima da cetona em referência em seus produtos de redução, pelos homogenatos, foi de 4,4%, enquanto as culturas de *Cereus peruvianus* propiciaram um rendimento cromatográfico de 27,2% (ou 31%, considerando a eficiência de extração) nesta biotransformação.

Esse conjunto de dados indica que a formação do isômero *trans* é cineticamente favorecida nos homogenatos, o que também forneceu um indício de qual dos isômeros seria predominante na biotransformação pelas culturas de células da mesma espécie vegetal. Observaram-se, também, outras correspondências entre os resultados das biotransformações com homogenatos e com culturas em suspensão de *C. peruvianus*: a predominância do *cis*-2-metilciclo-hexanol e o fato de a biotransformação da 4-metil-2-pentanona não haver produzido o álcool correspondente. Já a biotransformação da 3-metilciclo-hexanona pelos homogenatos não exibiu nenhuma diastereosseletividade apreciável, em contraste com o observado nas culturas (células íntegras), em que se observou baixa diastereosseletividade. A redução da norcânfora pelas culturas forneceu exclusivamente o isômero *endo*, mostrando preferência diastereoisomérica oposta à observada nos homogenatos. Além disso, os rendimentos de 26% e 17% na biotransformação da 2-metilciclo-hexanona e da 3-metilciclo-hexanona pelas culturas corresponderam a apenas 0,3% e 0,6% no caso dos homogenatos. Conclui-se que, para estimar como se dará a biotransformação de determinado substrato por uma cultura de células, a partir de ensaios com homogenatos obtidos da mesma espécie, deve-se levar em conta apenas a ocorrência de um resultado positivo, sendo assim considerado, no presente estudo, todo valor maior que 0,2% de rendimento (acima do limite de quantificação), enquanto os dados de diastereosseletividade não necessariamente se correlacionam entre homogenatos e culturas.

Os maiores rendimentos na biotransformação de cada um dos substratos por cada uma das espécies vegetais foram selecionados e relacionados na Tabela 5.19 e representados no Esquema 5.5, a seguir. Como se pode ver, as cetonas cíclicas alifáticas foram convertidas em pequenas quantidades dos alcoóis correspondentes pela maior parte das espécies vegetais estudadas. Esse tipo de triagem demonstrou ser uma ferramenta importante quando se pretende iniciar estudos de biocatálise com enzimas vegetais, o que será discutido adiante. Os valores em negrito representam os

rendimentos mais expressivos na biotransformação de cada substrato. Deve-se levar em consideração, também, valores próximos a estes na escolha das espécies vegetais que darão início às culturas de células ou serão fonte de isolamento de enzimas, sendo este o passo inicial de uma sequência de procedimentos de seleção enzimática. A maior parte destes valores destacados é resultado de biotransformações em amostras de homogenatos aos quais se adicionou NADPH, incubadas por 96 horas, com exceção da biotransformação da 4-metilciclo-hexanona por *Cereus peruvianus*, cujo melhor resultado se deu em amostras com adição de NADH, incubadas por 6 horas.

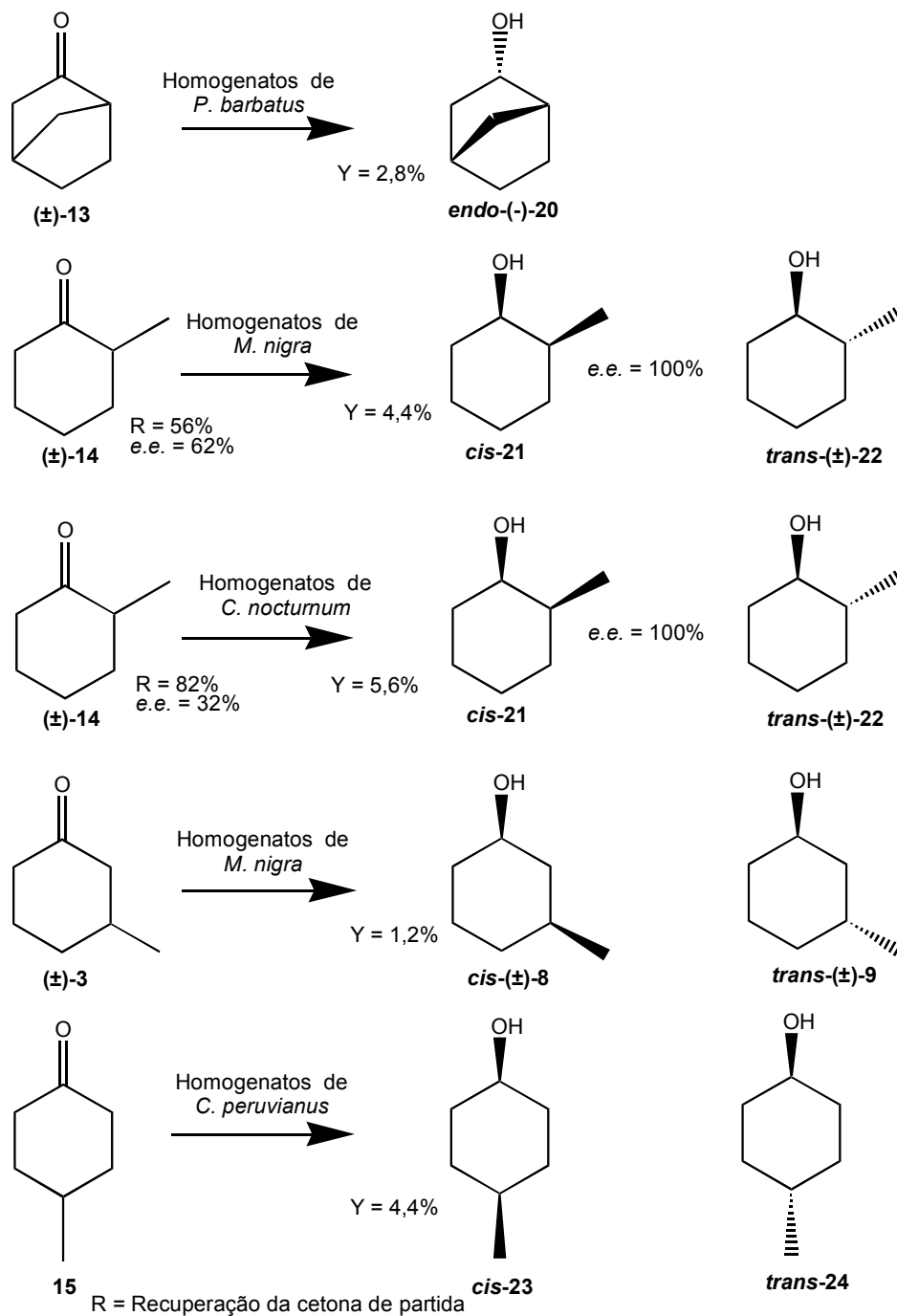
Tabela 5.19: Rendimentos cromatográficos percentuais selecionados dos ensaios de biotransformação com homogenatos.

SUBSTRATO	ESPÉCIE VEGETAL								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Norcânfora	2,1	0,8	1,7	1,1	2,0	2,1	2,5	2,8	1,5
2-Metilciclo-hexanona	1,6	1,8	4,4	-	-	1,3	5,6	1,6	0,3
3-Metilciclo-hexanona	0,5	-	1,2	-	-	1,1	1,1	1,1	0,6
4-Metilciclo-hexanona	1,2	0,5	2,2	0,5	0,9	1,9	1,4	2,1	4,4
4-Metil-2-pentanona	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-
2-Metil-3-pentanona	0,2	-	0,3	-	-	-	-	-	-
Acetofenona	0,8	0,2	0,8	-	-	0,4	0,7	-	-

Os espaços com – traduzem a não detecção do composto em nenhum das condições testadas.

ESPÉCIE VEGETAL	ESPÉCIE VEGETAL	ESPÉCIE VEGETAL
1 <i>Bauhinia variegata</i>	4 <i>Artocarpus heterophyllus</i>	7 <i>Cestrum nocturnum</i>
2 <i>Eriobotrya japonica</i>	5 <i>Eugenia uniflora</i>	8 <i>Plectranthus barbatus</i>
3 <i>Morus nigra</i>	6 <i>Citrus sinensis</i>	9 <i>Cereus peruvianus</i>

Esquema 5.5



Dentre estes resultados em destaque, apenas se observaram diferenças significativas relativas ao tempo de incubação nos seguintes casos: na biotransformação da 2-metilciclo-hexanona por *Cestrum nocturnum* na presença de NADPH, em que se constatou que o rendimento passou de 3,5% com 6 horas de reação para 5,6% em 96 horas; na redução da norcânfora por *Plectranthus barbatus*,

não sendo detectados os produtos nas amostras incubadas com NADPH por 6 horas, enquanto, após 96 horas, o *exo-norborneol* é detectado em 2,8% de rendimento; e na redução da 4-metilciclo-hexanona por *Cereus peruvianus* com adição de NADH ao homogenato, em que o rendimento passa de 4,4% em 6 horas para 1,6% após 96 horas. Esta análise permitiu a confirmação de que o planejamento experimental de uma triagem com homogenatos deve, preferencialmente, ser realizado levando em conta intervalos de tempo de biotransformação curtos, porém razoáveis (ex: 6 horas) e longos (alguns dias), já que, intervalos curtos podem não ser suficientes para a ocorrência da biotransformação desejada e intervalos longos podem ocasionar a degradação dos produtos de interesse no meio reacional, ou seja, a investigação destes extremos é necessária para que se evitem falsos negativos.

A redução da norcânfora em homogenatos de *B. variegata*, *M. nigra*, *C. sinensis* e *C. peruvianus* ocorreu mesmo sem a adição de co-fatores, assim como a biotransformação da 4-metilciclo-hexanona por *M. nigra* e da acetofenona por *C. nocturnum*; inclusive, nos casos das biorreduções da norcânfora por *M. nigra* e *C. peruvianus*, os rendimentos foram idênticos àqueles obtidos com a adição do co-fator NADPH, nas mesmas condições reacionais. Embora estes resultados indiquem a presença destas co-enzimas no interior das células, e conseqüentemente, nos homogenatos, esta triagem por biocatalisadores vegetais não pode dispensar a adição de co-fatores, uma vez que, de um universo de 63 combinações entre 9 espécies vegetais ensaiadas com 7 cetonas-modelo, em apenas 6 destas combinações se detectaram os alcoóis correspondentes em homogenatos aos quais não se adicionaram co-fatores. É possível que, durante o procedimento de obtenção dos homogenatos, ocorra a perda ou degradação dos co-fatores ou a quantidade destes no interior das células é insuficiente para a efetivação das biotransformações nas condições estudadas.

No entanto, o emprego destes co-fatores em condição próxima à estequiométrica é desnecessário, tendo em vista que, em todos os ensaios de triagem através do procedimento definitivo descrito no item 7.4.5 (p.XX), estes foram utilizados na razão cetona : co-fator 2:1, sem que se observassem rendimentos superiores a 6% e que não podem ser considerados significativamente superiores aos observados nos ensaios iniciais em homogenatos com adição de co-fatores na condição sub-estequiométrica, portanto, estes resultados indicam que existem outros fatores limitantes destas biorreduções em homogenatos e afastam a hipótese da eventual

não-regeneração dos co-fatores nas condições de ensaio ser responsável pelos rendimentos observados.

Além disso, a utilização de co-fatores em concentração inferior à indicada pela estequiometria da reação pode fornecer dados sobre a existência de sistemas enzimáticos de regeneração de co-fatores nos homogenatos, em ensaios futuros. Embora a adição destas substâncias aumente o custo dos ensaios, estes foram projetados para a menor escala possível, sendo que 1 (um) grama de NADPH e de NADH, usados na concentração de 0,8 mmol/L nos homogenatos que servirão como meio biocatalítico (proporção cetona : co-fator 100:5, para garantir rendimento mínimo de 5%), é suficiente para a realização de ensaios como estes com, no mínimo, 400 espécies vegetais. O preço de 1 grama dos co-fatores, na forma reduzida, era de R\$ 332,00 para a β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), e de R\$ 826,34 para a β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), em 2006.

Embora os valores de atividades enzimáticas calculados para as biotransformações que se deram em 6 horas estejam dentro da normalidade, tendo como referência enzimas em homogenatos de células vegetais atuando nas reações próprias do metabolismo secundário, modificando seus substratos específicos, verificou-se que, neste estudo com diversas espécies vegetais, das quais foram selecionadas as 9 supracitadas para serem investigadas com o protocolo definitivo de triagem, em nenhuma das condições testadas foi observado um rendimento expressivo, sendo o máximo observado de 5,6%, na biotransformação da 2-metilciclohexanona por *Cestrum nocturnum* na presença de NADPH, em 96 horas. Mesmo após 96 horas de incubação com as cetonas-modelo, não se obtiveram incrementos significativos nos rendimentos. Isto se deve ao fato de enzimas serem moléculas proteicas complexas cuja estrutura tridimensional é moldada por interações hidrofílicas e hidrofóbicas intramoleculares e com o meio. Essa característica leva suas atividades a variarem bruscamente com condições como potencial hidrogênio-iônico, temperatura, força iônica, presença de inibidores ou de espécies iônicas das quais sua estrutura possa depender, dentre outras.

O emprego de enzimas com alto grau de pureza certamente supera, em produtividade, a utilização de homogenatos de tecido vegetal em que podem estar presentes, simultaneamente, enzimas com atividades distintas e concorrentes, oligosacarídeos, compostos fenólicos, sais e outras biomoléculas solúveis no tampão extrator que, mesmo em quantidades-traço, podem inibir atividades enzimáticas. Além

disso, algumas enzimas apresentam alta especificidade pelo substrato, e são extremamente regio- e estereo-específicas. Outras podem ter outros co-fatores atuantes em reações de redução, como o **FAD** (flavina adenina dinucleotídeo) ou o **FMN** (flavina mononucleotídeo).

Entretanto, ensaios considerando todas estas variáveis enumeradas seriam inviáveis, motivo pelo qual se optou por investigar algumas destas condições reacionais nas etapas preliminares do trabalho, antes do estabelecimento do procedimento definitivo.

Os ensaios preliminares e a revisão da bibliografia sobre o assunto foram delimitando o esquema experimental, mas, de antemão, já era possível prever que era altamente improvável a obtenção de rendimentos expressivos, que seria o mesmo que esperar encontrar, nos homogenatos, enzimas anormalmente robustas ou promíscuas, ou acertar, com muita sorte, as condições ótimas para a atividade destas enzimas, mesmo sem considerar todas as variáveis, e desprezando o fato de que não se empregaram enzimas isoladas e purificadas.

Em alguns dos casos, em que a recuperação das cetonas de partida foi baixa, os baixos rendimentos observados podem, alternativamente, dever-se à rápida degradação do produto de redução. Cumpre ressaltar que o objetivo desta triagem com homogenatos é determinar se existe uma boa chance de determinada(s) espécie(s) vegetal(is) biotransformar(em) determinado composto, antes que se inicie uma cultura de células, cujo estabelecimento exige aparato microbiológico e costuma ser extremamente trabalhoso, ou antes de se adotarem procedimentos de purificação e caracterização mais focados. Este procedimento também se mostrou reprodutível e mais confiável para a triagem por enzimas vegetais que aqueles em que se empregam partes de plantas desenvolvidas, descontaminadas superficialmente, como pedaços de cenoura ou mandioca adquiridos no mercado, que podem ser úteis em etapas de síntese em escala de pesquisa, mas não garantem a origem da atividade enzimática observada.

No procedimento com homogenatos, em que foram selecionadas folhas do mesmo indivíduo (mesmo material genético), as células dos microorganismos endofíticos, que constituem uma pequena parcela da biomassa, são lisadas juntamente com as células vegetais no processo de obtenção dos homogenatos (*cell-free extract*) e, portanto, existe maior garantia de que a atividade enzimática observada é originária da espécie vegetal em estudo, e não de microorganismos ainda com atividade metabólica.

A purificação de uma enzima envolve, em geral, etapas de precipitação fracionada, diálise ou cromatografia de permeação em gel ou de afinidade. No trabalho de Obitz *et al.*, publicado em 1995, um protocolo com seis etapas para a purificação da 21-hidróxi-raumaclina redutase de homogenatos de *R. serpentina* resultou em um aumento de atividade enzimática específica de 0,4 para 750 pkat/mg de proteína, com recuperação de 0,4% da enzima. A enzima purificada mantém sua atividade original por mais de seis meses, o que não se observa em extratos brutos (homogenatos). Em 2005, Sezgintürk e Dinçkaya reportaram o desenvolvimento de um biossensor para a determinação de sulfito em amostras de alimento, baseado em homogenatos obtidos de folhas de *Malva vulgaris*, com limite de detecção inferior aos relatados por Tekum, 1986, e por Campanella *et al.*, 1995, que utilizaram a enzima sulfito oxidase purificada, porém mais custosa. Os mesmos autores estabeleceram o pH ótimo deste biossensor como sendo de 7,5, assumindo que a atividade enzimática, determinada em termos de consumo de oxigênio, é de 100% neste pH. Em pH 6, 7 e 8 da matriz alimentícia a atividade enzimática observada foi de 21%, 81% e 83%, exemplificando, mais uma vez, que a atividade enzimática pode sofrer alterações importante em função do ajuste do pH dos homogenatos.

Outras limitações importantes à obtenção de alcoóis a partir de cetonas por biocatálise, especialmente quando em sistemas em que pode haver mais de uma enzima atuante, são: a ocorrência de reações do tipo “retro-Henry”, fornecendo os correspondentes aldeídos e diminuindo o rendimento dos produtos de redução (WALLNER *et al.*, 2008) e a inibição da enzima pelo co-substrato.

CAPÍTULO 6:

**CONCLUSÕES E
PERSPECTIVAS**

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Sistemas de células inteiras de plantas oferecem a possibilidade de regeneração do co-fator a partir co-substratos baratos e acessíveis ou mesmo a partir de energia luminosa. As enzimas também apresentam maior estabilidade nestes sistemas, comparativamente a sistemas em que se lisam as células, porém, a toxicidade de substratos exógenos para culturas de células vegetais restringe a utilização dos substratos, que deve ser em baixa concentração, dificultando a recuperação dos produtos do meio reacional. O ajuste de todas as variáveis que influenciam o processo possibilita a biorredução estereosseletiva e eficiente de cetonas com culturas de células vegetais, cujos sistemas enzimáticos ainda são muito pouco estudados em biocatálise, apesar de seu potencial para biotransformar substratos volumosos e estericamente impedidos.

Os homogenatos de *C. peruvianus* obtidos a partir de células da cultura em suspensão reduziram a 4-metilciclo-hexanona em *trans*-4-metilciclo-hexanol em 6 horas, naquelas amostras às quais se adicionou NADPH, com atividade enzimática de 64 pkat/mg de proteína. Este resultado mostra boa correlação com aqueles obtidos com a cultura de *C. peruvianus* em suspensão, sugerindo que sistemas de homogenatos de células vegetais podem ser úteis na previsão da regioseletividade de biotransformações com culturas de células da mesma espécie.

A investigação da biocatálise por enzimas presentes em homogenatos de células vegetais demonstrou ser uma ferramenta importante na pesquisa por novos biocatalisadores. Trata-se de um método relativamente simples, preciso e confiável de avaliar o potencial destas enzimas, que podem ser exclusivas de tecidos diferenciados, em biotransformar estereosseletivamente as cetonas-modelo. O método proposto tem foco em redutases solúveis, foi adaptado de ensaios de atividade enzimática específica realizados em estudos de rotas biossintéticas e preenche uma lacuna na triagem por enzimas próprias de tecidos vegetais diferenciados, a partir de amostras ambientais, que possibilita o fornecimento de enzimas selvagens para a posterior modificação e seleção por métodos de “engenharia de proteínas”.

Embora uma cultura de células seja a matriz ideal para o isolamento de enzimas ativas, o estabelecimento das culturas é extremamente trabalhoso e requer aparato específico, conforme detalhado no item 7.4.1 (Materiais e Métodos, p. XX), podendo

levar muitos meses. A escolha das espécies vegetais que darão início às culturas de células e/ou serão fonte para o isolamento de enzimas a partir de tecidos desenvolvidos é o passo inicial de uma sequência de procedimentos de seleção enzimática. A disponibilidade de biocatalisadores se dá apenas para algumas reações.

Sabendo-se que são necessários grandes períodos de tempo para a obtenção de novas enzimas para atuar em processos biocatalíticos específicos e que biocatalisadores prontamente acessíveis são triados na fase inicial de desenvolvimento de uma rota sintética, o método de triagem proposto no presente estudo constitui-se em mais um instrumento disponível no arsenal do químico sintético. Até agora, a abordagem mais adotada nos laboratórios de químicos sintéticos tem sido o emprego de coleções de microorganismos, sendo selecionado(s) o(s) mais ativo(s) para a produção do composto-alvo. Entretanto, as enzimas presentes em plantas podem ter ação diferente daquelas que se encontram em microorganismos.

Todas as metodologias utilizadas na busca por novos biocatalisadores tiveram início com a triagem de amostras ambientais (mesmo quando se empregam enzimas comerciais, que também tiveram sua origem na natureza), para, somente após a seleção das espécies mais ativas, partirem para o isolamento e a caracterização das enzimas atuantes, a determinação de suas sequências aminoacídicas e estruturas terciárias e quaternárias, e para a utilização de técnicas de biologia molecular em proteínas. A fonte primária de enzimas modificadas em ciclos sucessivos de mutagênese, expressão e triagem, é a natureza, e a seleção criteriosa na primeira etapa desta sequência, onde se verifica a mais ampla variabilidade genética, pode produzir melhores resultados nas etapas finais do processo, quando as enzimas são empregadas na produção em larga escala dos compostos de interesse.

Em bioprospeções futuras com estas e outras espécies vegetais, procedimentos como precipitação fracionada, diálise, eletroforese ou cromatografia de permeação em gel ou de afinidade podem ser adotados para aumentar as atividades enzimáticas.

A adaptação do método a sistemas bifásicos possibilita a utilização dos homogenatos na investigação de biotransformações de substratos menos solúveis em água.

A automação do procedimento, especialmente com a utilização de um injetor automático acoplado ao cromatógrafo, permite o processamento mais rápido e

eficiente das amostras. No presente estudo, todas as injeções no cromatógrafo a gás foram realizadas manualmente.

Sistemas de homogenatos de células vegetais podem, ainda, ter outras aplicações, como na biorremediação de efluentes, já que folhas são fontes de enzimas abundantes e renováveis.

CAPÍTULO 7:

MATERIAIS E MÉTODOS

7.1. Instrumentos e reagentes

As cetonas norcânfora (98%), 2-metilciclo-hexanona (99%, Merck), 3-metilciclo-hexanona (97%), 4-metilciclo-hexanona (99%, Merck), 4-metil-2-pentanona (98%, Fisher), 2-metil-3-pentanona (99%, Merck), 2,4-pentanodiona (99%, Sigma-Aldrich), e acetofenona (98%, Merck) foram submetidas a tratamentos de destilação sob pressão reduzida ou recristalização de metanol (norcânfora); enquanto a ciclo-hexanona, os solventes (*n*-hexano, acetato de etila, éter etílico, diclorometano, clorofórmio, acetona, isopropanol, P.A.) e demais reagentes utilizados eram comerciais e não foram submetidos a tratamento prévio. Os padrões para cromatografia (+)-*endo*-norborneol (96%), (±)-*exo*-norborneol (98%), (±)-*endo*-norborneol (98%) e (*R*)-1-fenil-etanol (97%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, assim como os padrões (±)-*trans*-2-metilciclo-hexanol e (±)-*trans*-4-metilciclo-hexanol, dentre outros citados neste trabalho.

As massas foram determinadas com o auxílio de uma balança Marte A500, semi-analítica, ou de uma Metler H20T, analítica.

Um evaporador rotativo Buchler PTFE-1GN foi empregado para as evaporações de solvente, operando sob pressão reduzida por uma trompa d'água.

Os cromatogramas foram obtidos em um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-14-A com detector de ionização de chama (FID), acoplado a um integrador/registrator computadorizado Shimadzu CBM-101, que foi munido de diferentes colunas capilares durante o desenvolvimento do trabalho: Shimadzu CBP-20, com revestimento interno de polietilenoglicol (25 m × 0,22 mm × 0,25 μm); Hewlett-Packard HP-5, com revestimento interno contendo 5% de fenilmetilsilicone (30 m × 0,32 mm × 0,25 μm); Quadrex 007, com revestimento interno de metilsilicone (50 m × 0,25 mm × 0,25 μm); Hewlett-Packard HP-FFAP, com revestimento interno de polietilenoglicol modificado com ácido nitrotereftálico (50 m × 0,2 mm × 0,33 μm); ou Supelco Astec Chiraldex™ B-PM (50 m × 0,25 mm × 0,12 μm), com revestimento interno de β-ciclodextrina derivatizada.

Os espectros de massas foram obtidos em um cromatógrafo a gás GC-17A acoplado a um espectrômetro de massas modelo QP5050A, ambos Shimadzu. A coluna utilizada foi uma DBWAX (poli-etilenoglicol, 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm), fluxo de gás de arraste 5,5 mL/min e razão de divisão 2:1.

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos a 300MHz em um espectrômetro Varian Inova, em clorofórmio deuterado, com TMS como padrão.

As culturas de células foram mantidas em agitadores orbitais Nova Ética modelo 109,3. As culturas de calos de *Cereus peruvianus* foram mantidas em placas de Petri, em estantes iluminadas com lâmpadas fluorescentes utilizando-se fotoperíodo de 14 horas de luz por dia. O material utilizado para conter as culturas de células em meio semi-sólido e as manipular foi esterilizado em autoclave vertical Phoenix AV75. As manipulações foram executadas em fluxo laminar horizontal Nuair NU-201-536. Para a filtração das culturas de células empregou-se uma bomba de vácuo Fabbe 0210 - Gast. MGF Corporation.

As medições de pH foram realizadas com o auxílio de um pHmetro Tecnal e de papel indicador para pHs de 0 a 14, Merck.

Os homogenatos de células foram centrifugados em centrífugas modelos Eppendorf[®]5804; e Labnet International, Spectrafuge 7M.

A concentração total de proteínas foi determinada segundo o método de Bradford, empregando como reagente Coomassie Brilliant Blue G-250, e gama globulina plasmática bovina, liofilizada, como padrão na confecção da curva de calibração. A absorbância a 595 nm foi medida em um leitor de microplacas ELISA, com espectrofotômetro Synergy HT[®], Bio-Tek Instruments, Inc. Vermont, USA. O programa usado na leitura dos dados foi o KC4.

7.2. Preparações

7.2.1 Redução de cetonas por boro-hidreto de sódio em solventes próticos

Adicionaram-se 400 μL de ciclo-hexanona (**1**; $3,9 \times 10^{-3}$ mol) a 5 erlenmeyers (para extração com os 5 solventes citados no parágrafo seguinte) contendo 100 mL de tampão borato $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 9,0. Adicionou-se, então, a cada erlenmeyer, 0,20 g de boro-hidreto de sódio ($5,3 \times 10^{-3}$ mol), mantendo-se o sistema reacional sob agitação por 72 horas. O mesmo procedimento foi seguido na redução de 400 μL de 2-ciclohexen-1-ona (**2**; $4,1 \times 10^{-3}$ mol); 0,40 g de (\pm)-cânfora (**4**; $2,6 \times 10^{-3}$ mol) em 1,00 mL

de solução metanólica e 0,40 g de acetofenona (**5**; $3,3 \times 10^{-3}$ mol), separadamente, conforme resumido no Esquema 3.1 (item 3.1).

Às soluções resultantes adicionou-se cloreto de sódio até a saturação, seguindo-se a extração dos produtos com 3 porções de 10,0 mL de *n*-hexano, acetato de etila, éter etílico, diclorometano e clorofórmio, sendo empregado um solvente para cada uma das 5 amostras. Os extratos foram secados com sulfato de magnésio anidro e, em seguida, filtrados. A solução obtida foi analisada por cromatografia a gás pelo método do padrão interno (propilenoglicol, para **1** e **2**; e *n*-tetradecano, para **4** e **5**) e espectrometria de massas.

O ciclo-hexanol (**6**) obtido foi purificado através de refluxo sobre sódio metálico por 1 hora, seguido de destilação em coluna de fracionamento. O composto **6** foi, então, utilizado para construir a curva de calibração para a cromatografia a gás, empregada para quantificar a redução do composto **1**.

As reações de redução dos compostos em tela também foram executadas em metanol, em lugar do tampão borato, seguindo o mesmo procedimento.

7.2.2. Redução das cetonas-modelo por boro-hidreto de sódio em hexano (YAKABE, HIRANO, MORIMOTO, 1998)

Destilaram-se cerca de 20 mL de *n*-hexano secado sobre cloreto de cálcio para um balão de 50 mL tritubulado previamente flambado e, então, adicionaram-se: uma pequena barra magnética seca, entre 2,0 e 3,0 g de alumina para cromatografia com 10% de água, 0,22 g de norcânfora ou 0,24 mL de 2-metilciclo-hexanona (**13** ou **14**; $2,00 \times 10^{-3}$ mol) e entre 0,2 g e 0,6 g de boro-hidreto de sódio ($0,5$ a $1,6 \times 10^{-2}$ mol), conforme indicado pelas equações mostradas no Esquema 3.2. O mesmo procedimento foi seguido na redução da 3-metilciclo-hexanona, da 4-metilciclo-hexanona, da 4-metil-2-pentanona, da 2-metil-3-pentanona e da acetofenona, porém, se adicionando 0,12 mL de cada uma delas ($1,00 \times 10^{-3}$ mol), ou 0,5 mL, no caso da acetofenona (**5**; $4,00 \times 10^{-3}$ mol), separadamente, e 0,15 g de boro-hidreto de sódio (4×10^{-3} mol) ao meio reacional. Já na redução da 2,4 pentanodiona, empregaram-se 0,41 mL da cetona (**18**; $4,00 \times 10^{-3}$ mol) e 0,06 g de boro-hidreto de sódio ($1,6 \times 10^{-3}$ mol), no intuito de reduzir apenas uma das carbonilas.

A alumina foi previamente secada em mufla a 600 °C por 4 horas, sendo então adicionada da quantidade adequada de água, vigorosamente agitada até a obtenção

de um pó que fluísse livremente e imediatamente empregada nas reduções. A reação foi mantida sob agitação constante e em atmosfera inerte (argônio) por períodos de tempo entre 1 e 4,5 h, em temperatura ambiente, a 40 °C ou sob refluxo (69 °C), dependendo da cetona, conforme indicado na Tabela 7.1. Ao final, a mistura reacional foi filtrada sob pressão reduzida, sendo o sólido lavado com porções de éter seco. Os produtos foram analisados por cromatografia a gás com detecção por ionização em chama (CG/DIC), em colunas capilares de sílica, conforme detalhado no item 5.3 deste capítulo. Alíquotas obtidas ao final das reduções também foram analisadas por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG/EM), por impacto eletrônico e ionização química. A técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) foi utilizada para confirmar a identidade dos produtos de redução da 3-metilciclo-hexanona e da 4-metilciclo-hexanona, e a proporção relativa entre os isômeros *cis* e *trans* obtidos na reação, conforme os dados apresentados nas Tabelas 7.2 e 7.3.

Tabela 7.1: Condições reacionais na redução das cetonas-modelo

CETONA	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (h)
Norcânfora	69	4
2-metilciclo-hexanona	69	3
3-metilciclo-hexanona	40	3
4-metilciclo-hexanona	69	1,2
4-metil-2-pentanona	40	3
2-metil-3-pentanona	69	4
2,4-pentanodiona	30	2,5
Acetofenona	69	4,5

Resultados da cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

Espectros de massas (70 eV), m/z (designação, *intensidade relativa* %):

- **3-metilciclo-hexanona (3)** - 102 (M^+ , 0), 45 (M^+ - $C_4H_9^+$, 100,0),
84 (M^+ - H_2O^+ , 6,7)

- **cis-(±)-3-metilciclo-hexanol (8)** - 114 (M^+ , 0,4), 71 (M^+ - $C_3H_7^+$, 100,0), 41 (M^+ - $C_4H_9O^+$, 56,2), 57 (M^+ - $C_4H_9^+$, 50,2), 81 (M^+ - H_2O - CH_3^+ , 72,8), 96 (M^+ - H_2O , 41,1), 113 (M^+ - H^+ , 1,2)
- **trans-(±)-3-metilciclo-hexanol (9)** - 114 (M^+ , 0), 57 (M^+ - $C_4H_9^+$, 100,0), 41 (M^+ - $C_4H_9O^+$, 55,3), 71 (M^+ - $C_3H_7^+$, 30,4), 81 (M^+ - H_2O - CH_3^+ , 50,5), 96 (M^+ - H_2O , 25,6)
- **4-metil-2-pentanol (16)** - 102 (M^+ , 0), 45 (M^+ - $C_4H_9^+$, 100,0), 84 (M^+ - H_2O^+ , 6,7)
- **(±)-4-hidróxi-2-pentanona (X)**:
 ionização eletrônica - 43 (M^+ - $^{\cdot}C_3H_6OH$, 100,0), 59 (M^+ - $^{\cdot}O\equiv CCH_3$, 11,6)
 ionização química (CH_4)- 117 (M^+ + CH_3^+ , 100,00)
- **1-fenil-1-etanol (12)** - 122 (M^+ , 22,7), 77 (M^+ - C_2H_5O , 100,0), 105 (M^+ - OH , XX)

O fragmento mais estável do espectro de massas da 4-hidróxi-2-pentanona (**27**), obtido por impacto eletrônico, é aquele de $m/z = 43$, que também produz o pico base do espectro da 2,4-pentanodiona adquirido nas mesmas condições, e corresponde ao íon $CH_3C\equiv O^+$. Já aquele de $m/z = 59$, que apresenta menor intensidade, se trata do íon $CH_3CHO^+HCH_2$. O pico do íon molecular (esperado em $m/z = 102$) está ausente. O pico base do espectro obtido por ionização química, com metano na câmara de ionização, aparece em $m/z = 117$, provavelmente devido à transferência de CH_3^+ a moléculas de 4-hidróxi-2-pentanona, em meio gasoso.

Tabela 7.2: Dados do espectro de RMN de 1H (500 MHz) para a mistura de isômeros **8** e **9** (3-metilciclo-hexanol).

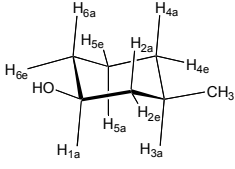
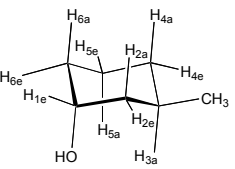
	Haxial	δ (multiplicidade)	Hequatorial	δ (multiplicidade)
 cis-3-metilciclo-hexanol	H ¹	3,56 (ml)	H ¹	4,052 (td)
	H ²	0,885 (td)	H ² , H ⁶	1,95 (dm; dt)
	H ³	1,424 (tq)	H ³	0,925 (d)
 trans-3-metilciclo-hexanol	H ⁴	0,785 (qd)	H ⁴	1,600 (dm)
	H ⁵	1,270 (tq)	H ⁵	1,755 (dq)
	H ⁶	1,105 (qd)	H ⁶ , H ²	1,95 (dm; dt)

Tabela 7.3: Dados de RMN de ^1H para a mistura de isômeros **23** e **24**.

cis-4-metilciclo-hexanol

trans-4-metilciclo-hexanol

<i>cis</i> -4-metilciclo-hexanol					<i>trans</i> -4-metilciclo-hexanol				
Haxial ^a	δ^a	Heq. ^a	δ^a	δ^b	Haxial ^a	δ^a	Heq. ^a	δ^a	δ^b
OH	1,55	H ¹	3,940	3,937 m (0,2)	H ¹	3,539	OH	1,64	3,536 tt (1,00)
H ²	1,56	H ²	1,698		H ²	1,256	H ²	1,940	
H ³	1,344	H ³	1,46		H ³	1,701	H ³	0,972	
H ⁴	1,46	CH ₃	0,916	0,916 d (0,87)	H ⁴	1,33	CH ₃	0,880	0,879 d (3,28)
H ^{5,6}	---	H ^{5,6}	---		H ^{5,6}	---	H ^{5,6}	---	

a. dados de literature, a 400 MGHZ (SDBSWeb : <http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/>) (National Institute of Advanced Industrial science and Technology, 29/09/2008).

b. dados experimentais deste trabalho, a 300 MGHZ; **d**, dubleto; **m**, multipeto; **tt**, triplete de tripletes.

7.3. Análises por cromatografia a gás

O cromatógrafo a gás (descrito no item 7.1) foi munido de diferentes colunas capilares, em função dos compostos a serem analisados. As colunas de sílica inicialmente empregadas para separar as cetonas de seus respectivos álcoois foram as seguintes: Shimadzu CBP-20, com revestimento interno de polietilenoglicol (25 m × 0,22 mm × 0,25 μm); ou Hewlett-Packard HP-5, com revestimento interno contendo 5% de fenilmetilsilicone (30 m × 0,32 mm × 0,25 μm); ou Quadrex 007, com revestimento interno de metilsilicone (50 m × 0,25 mm × 0,25 μm). Empregou-se 1,6 mL/min de fluxo de gás de arraste (hélio), para a razão de divisão de 100:1. Recentemente, as análises cromatográficas passaram a ser realizadas na coluna Hewlett-Packard HP-FFAP, com revestimento interno de polietilenoglicol modificado

com ácido nitrotereftálico (50 m × 0,2 mm × 0,33 μm), fluxo de gás de arraste 3,2 mL/min e razão de divisão 50:1.

As cetonas norcânfora, 2-metilciclo-hexanona, 3-metilciclo-hexanona, 4-metilciclo-hexanona, 4-metil-2-pentanona, 2-metil-3-pentanona e acetofenona; e os alcoóis *exo*-norborneol, *trans*-2-metilciclo-hexanol, *cis*-3-metilciclo-hexanol, *trans*-4-metilciclo-hexanol, 4-metil-2-pentanol, 2-metil-3-pentanol e 1-fenil-1-etanol foram empregados na construção de curvas de calibração para quantificar as biotransformações por cromatografia a gás, pelo método do padrão interno.

Com o cromatógrafo a gás munido da coluna Hewlett-Packard HP-FFAP, a temperatura do injetor em 270 °C, e a temperatura do detector em 300 °C, foram desenvolvidas as seguintes programações do gradiente de temperatura (para as cetonas indicadas e os correspondentes alcoóis):

- Norcânfora (**13**): 90 °C por 0 min, 10 °C/min até 140 °C, 140 °C por 9 min.
- 2-metilciclo-hexanona (**14**), 3-metilciclo-hexanona (**3**), e 4-metilciclo-hexanona (**15**): 50 °C por 0 min, 10 °C/min até 100 °C, 100 °C por 19 min.
- 4-metil-2-pentanona (**16**) e 2-metil-3-pentanona (**17**): 40 °C por 0 min, 10 °C/min até 90 °C, 90 °C por 8 min, 20 °C/min até 110 °C, 110 °C por 2 min.
- 2,4-pentanodiona (**18**): 90 °C por 0 min, 10 °C/min até 140 °C, 140 °C por 14 min.
- Acetofenona (**5**): 90 °C por 0 min, 10 °C/min até 180 °C, 180 °C por 7 min.

Já para as determinações de excessos enantioméricos, o cromatógrafo foi munido da coluna Supelco Astec ChiralDEX™ B-PM (com revestimento interno de β-ciclodextrina derivatizada), 50 m, com a temperatura do injetor em 250 °C, e a temperatura do detector em 300 °C. Foram desenvolvidas as seguintes programações do gradiente de temperatura:

- Norcânfora (**13**), *exo*-norborneol (**19**) e *endo*-norborneol (**20**): 80 °C por 0 min, 10 °C/min até 120 °C, 120 °C por 6 min.
- 2-metilciclo-hexanona (**14**), *cis*-2-metilciclo-hexanol (**21**) e *trans*-2-metilciclo-hexanol (**22**): 50 °C por 0 min, 10 °C/min até 90 °C, 90 °C por 9 min.

A identidade dos compostos foi confirmada por comparação entre seus tempos de retenção e os dos padrões comerciais disponíveis e dos produtos de redução por boro-hidreto de sódio, assim como por cromatografia a gás com detecção por espectrometria de massas (CG/EM). Foram produzidas 7 amostras de controle de qualidade para cada um dos substratos, contendo também todos os possíveis produtos de redução, no grupo carbonila. Para aferir com maior precisão o tempo de retenção dos compostos citados, que foram pesquisados nos homogenatos após incubação, essas amostras eram injetadas, manualmente, após a análise de 6 amostras de ensaios de biotransformação de um dado substrato.

7.4. Redução de cetonas por espécies vegetais

7.4.1. Estabelecimento e manutenção de culturas de células em suspensão

7.4.1.1. Estabelecimento de culturas de células de *Rauwolfia sellowii* Muell. Arg.:

Para se obterem culturas de células de *Rauwolfia sellowii* em suspensão foi necessário introduzir os calos previamente obtidos em diferentes meios líquidos. O primeiro meio testado foi o Murashige e Skoog (MS, 1962); em seguida, os tecidos de calo foram introduzidos em meio B5 (GAMBORG, MILLER, OJIMA, 1968), cuja composição encontra-se detalhada na Tabela 7.4. Foram testadas, então, diferentes concentrações de fito-hormônios: ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6-furfurilaminopurina (cinetina), optando-se pelos fito-hormônios e concentrações citadas na tabela. O pH do meio foi acertado entre 5,70 e 5,90, seguindo-se a operação de esterilização em autoclave a 121°C por 20 a 30 minutos.

7.4.1.2. Manutenção de culturas de células de *R. sellowii* Muell. Arg.:

Cerca de 10 g de células de tecido de calo de *R. sellowii* foram introduzidos em 50 mL de meio de cultura (B5), em erlenmeyers, sob fluxo laminar. As culturas em suspensão assim obtidas foram mantidas em agitadores com frequência de cerca de 110 rpm, a 25 °C e sob luz branca de intensidade constante. Os meios de cultura eram decantados e repostos a cada 14 dias, até que se obtivesse biomassa suficiente para a realização dos ensaios de biotransformação.

Tabela 7.4: Composição do Meio B5 empregado para manutenção das culturas de *R. sellowii* em suspensão

Componente		Concentração (mg/L)
Sais Majoritários	KNO ₃	2500
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0150
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0250
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0150
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0150
Sais Minoritários	MnSO ₄ ·H ₂ O	0010
	H ₃ BO ₃	25003,0
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	25002,0
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	25000,25
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	25000,025
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	2500,025
Vitaminas	Ácido nicotínico	2501,00
	Tiamina	0010,00
	Piridoxina	0001,00
	Mio-inositol	0100,00
Outros	FeSO ₄ ·7H ₂ O / Na ₂ EDTA	000027,8/37,3
	Sacarose	30000
	Picloram	0001,0
	Cinetina	0000,04

7.4.1.3. Estabelecimento de culturas de células de *Cestrum amictum* Schlttdl:

As culturas de células foram, inicialmente, inoculadas em meio MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962), semi-sólido, com pH acertado entre 5,50 e 5,70, esterilizado em autoclave, a 121 °C, por 20 minutos. Para tanto, os calos foram induzidos em placas de cultura com o mesmo meio, acrescido de Phytigel™, Sigma-Aldrich, 1,7 g/L (substituto de agar empregado em culturas de tecidos vegetais, composto de ácido glicurônico, ramnose e glicose) e reguladores de crescimento: ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram), 2 ppm; e 6-furfurilaminopurina (cinetina), 200 ppm. Os calos foram, então, introduzidos em meio líquido sob fluxo laminar, sendo as culturas assim obtidas mantidas em agitadores com frequência de cerca de 110 rpm, a 25°C e sob luz branca de intensidade constante. Foram testadas diferentes concentrações de picloram e cinetina, conforme detalhado na Tabela 7.5.

Tabela 7.5: Distribuição das diferentes concentrações de hormônios para manutenção das culturas de *C. amictum* em suspensão.

Picloram (mg/L)	Cinetina (mg/L)		
	0,04	0,20	0,40
0,1	Experimento1	Experimento4	Experimento7
0,5	Experimento2	Experimento5	Experimento8
1,0	Experimento3	Experimento6	Experimento9

7.4.1.4. Manutenção de calos de *Cereus peruvianus*:

As culturas de células de *Cereus peruvianus* gentilmente cedidas pela prof^a Regina Gonçalves (UEM) foram mantidas em meio MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962), semi-sólido, modificado pela utilização de vitaminas nas concentrações do meio B5, e acrescido de Phytigel™ e dos reguladores de crescimento 6-furfurilaminopurina (cinetina) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ambos na concentração 2,2 mg/L, cuja composição se encontra detalhada na Tabela 7.6. O pH foi ajustado entre 5,70 e 5,90, seguindo-se a operação de esterilização em autoclave a 121°C por 20 a 30 minutos. Cerca de 1 g de células foram introduzidas em 40 mL de meio de cultura geleificado em placa de Petri, sob fluxo laminar. Então, foram mantidas sob luz branca em fotoperíodo de 14 horas de luz/dia.

Tabela 7.6: Composição do meio para manutenção de calos de *Cereus peruvianus*.

Componentes		Concentração na Solução Estoque (g/L)	Concentração Final Requerida (mg/L)
Sais Majoritários (20x)	KNO ₃	38,00	1900
	NH ₄ NO ₃	33,00	1650
	MgSO ₄ •7H ₂ O	7,40	370
	CaCl ₂ •2H ₂ O	8,80	440
	KH ₂ PO ₄	3,40	170
Sais Minoritários (200x)	MnSO ₄ •H ₂ O	3,40	17,0
	KI	0,166	0,830
	H ₃ BO ₃	1,24	6,20
	ZnSO ₄ •7H ₂ O	1,72	8,60
	CuSO ₄ •5H ₂ O	0,005	0,025
	Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0,050	0,25
	CoCl ₂ •6H ₂ O	0,005	0,025
Fonte de Ferro	FeSO ₄ •7H ₂ O/ Na ₂ EDTA	5,57/7,45	27,8/37,3
Vitaminas (1000x)	Ácido nicotínico	1,00	1,00
	Tiamina	10,00	10,00
	Piridoxina	1,00	1,00
	Mio-inositol	100,00	100,00
Fonte de carbono	Sacarose	-	30000
Citocinina	Cinetina	0,44	2,2
Auxina	2,4-D	0,44	2,2
Agar	Phytigel®	-	1700

Os valores entre parênteses, abaixo das classes de componentes, se referem à concentração destes na solução estoque com relação à concentração final requerida.

7.4.2. Biotransformações por culturas de células de *Rauwolfia sellowii* em suspensão:

As culturas empregadas nas reações eram filtradas sob pressão reduzida, quando o inóculo era pesado e transferido para o meio B5 na proporção de cerca de 10,00 g de células de *R. sellowii* (massa fresca) para 50 mL de meio, em erlenmeyers de 250 mL. As culturas foram mantidas por 10 dias sob agitação (120 rpm) e iluminação constante (1500 lux), quando foram, então, novamente filtradas sob pressão reduzida. Transferiram-se 20,00 g de células (massa fresca) para erlenmeyers contendo 50 mL de meio B5 modificado pela retirada das fontes de fósforo e nitrogênio e adição de

100 g/L de sacarose, *vide* a Tabela 7.7, e que foi adotado como meio de indução. A quantidade de células adicionada variou de 4,0 a 4,5 g de células (massa fresca) a cada 10 mL de meio de cultura para indução. Nas amostras que não foram submetidas a um período de estresse prévio aos experimentos de biotransformação propriamente ditos, as células não foram transferidas para o meio B5 modificado.

Tabela 7.7: Composição do Meio B5 modificado usado para induzir estresse celular em culturas de *R. sellowii* em suspensão

Componente		Concentração (mg/L)
Sais Majoritários	MgSO ₄ ·7H ₂ O	250
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	150
Sais Minoritários	MnSO ₄ ·H ₂ O	10
	H ₃ BO ₃	3,0
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,0
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
Outros	FeSO ₄ ·7H ₂ O / Na ₂ EDTA	27,8/37,3
	Sacarose	100000

No decorrer do trabalho, variou-se o período de indução em que as células permaneciam previamente aos ensaios de biotransformação: foram testados períodos de 0, 1, 2, 3 ou 5 dias. Adicionaram-se, então, os substratos a serem reduzidos em diferentes concentrações. O procedimento descrito foi seguido na biotransformação da ciclo-hexanona (**1**), 2-ciclo-hexenona (**2**), da 3-metilciclo-hexanona (**3**), (±)-cânfora (**4**) e da acetofenona (**5**). Após a adição do substrato, as células foram incubadas por 8, 12, 24, 48, 96, 120 ou 168 horas, sob agitação (120 rpm) e luz constantes. O substrato 3-metilciclo-hexanona (**3**) foi adicionado na concentração de 16,3 mmol/L e estas culturas foram incubadas, nas mesmas condições, por períodos entre 8 e 120 horas. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Passado o período de incubação com substrato, as culturas foram filtradas sob pressão reduzida e o produto foi pesquisado no meio de cultura e nas células (no meio intracelular ou adsorvido às mesmas). Para a extração a partir das células, as mesmas foram congeladas, posteriormente, trituradas em almofariz com areia e 3 porções de

20,0 mL de clorofórmio e filtradas sob pressão reduzida. O filtrado foi saturado com cloreto de sódio e 3 porções de 20,0 mL de acetato de etila (no caso da biotransformação dos compostos **1**, **2** e **3**), *n*-hexano (para o composto **4**) ou diclorometano (para o composto **5**) foram utilizadas para a extração dos produtos.

As fases orgânicas foram secadas com sulfato de magnésio anidro e filtradas. As soluções foram rotoevaporadas a cerca de 55 °C e 200 mmHg. Às soluções concentradas obtidas adicionou-se o padrão interno adequado (propilenoglicol, *n*-tetradecano ou ciclo-hexanona, dependendo da coluna e das substâncias analisadas) para quantificação no cromatógrafo a gás com detecção por ionização em chama.

7.4.3. Biotransformações por culturas de células de *Cereus peruvianus* em suspensão:

Os calos foram inoculados em meio líquido (MS modificado), sob fluxo laminar, sendo as culturas assim obtidas mantidas sob agitação (110 rpm), a 25°C, e luz branca de intensidade constante. Transferiram-se entre 3,9 e 4,9 g de células (massa fresca) para erlenmeyers de 50 mL contendo 10 mL de meio de cultura. Após 4 dias da inoculação em meio líquido, foram acrescentados os substratos norcânfora (**13**, $1,8 \times 10^{-3}$ mol/L), 2-metilciclo-hexanona (**14**, $1,8 \times 10^{-3}$ mol/L), 3-metilciclo-hexanona (**3**, $1,9 \times 10^{-3}$ mol/L), 4-metilciclo-hexanona (**15**, $1,8 \times 10^{-3}$ mol/L) e 4-metil-2-pentanona (**16**, $2,1 \times 10^{-3}$ mol/L), e incubados por um período de 96 horas. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Passado o período de incubação com substrato, as culturas foram filtradas sob pressão reduzida. O filtrado foi saturado com cloreto de sódio, sendo utilizadas 3 porções de 5 mL de acetato de etila para a extração dos produtos. As fases orgânicas foram secadas com sulfato de magnésio anidro e filtradas. Às soluções obtidas se adicionou o padrão interno ciclo-hexanona para quantificação dos produtos no cromatógrafo a gás com detecção por ionização em chama.

7.4.4. Obtenção dos homogenatos de células vegetais.

7.4.4.1. Estabelecimento do procedimento de obtenção dos homogenatos e de biotransformação de cetonas com os homogenatos obtidos

Inicialmente, o procedimento descrito a seguir foi adotado nos ensaios com folhas de: *Plectranthus barbatus*, *Bauhinia variegata*, *Persea americana*, *Psidium guajava*, *Laurus* spp., *Eriobotrya japonica*, *Eugenia uniflora*, *Mangifera* spp., *Camellia* spp., *Artocarpus heterophyllus* e *Morus nigra*.

As folhas do biocatalisador, em quantidades variando de 13 a 90 g por ensaio, foram lavadas com água corrente, descontaminadas com etanol 70% (v/v) por 3 minutos e maceradas com nitrogênio líquido e sílica gel 70-230 mesh, 0,5 g/g de tecido. Adicionou-se, imediatamente, um gel de 0,05 a 1,5 g de polivilpolipirrolidona (PVPP)/g de folhas, pré-hidratada em tampão fosfato 50 mmol·L⁻¹ pH 6,5 (2 a 11 mL/g de folhas, dependendo da quantidade de PVPP adicionada) contendo ascorbato de sódio 50 mmol·L⁻¹, a 0 °C. Adicionalmente, alguns tampões receberam ditioneitol (DTT) 3 mmol·L⁻¹ e/ou ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mmol·L⁻¹ ou Mg²⁺ 1 mmol·L⁻¹ em sua composição. Esse extrato foi filtrado através de um tecido de algodão limpo, sendo que esta etapa foi substituída posteriormente por uma etapa de centrifugação, para restringir o estudo à enzimas solúveis. Os extratos assim obtidos foram centrifugados a 3500 RPM por 20 minutos. Uma parcela dos homogenatos resultantes teve o pH alterado para 4,5 ou 8,5 (determinação feita com papel indicador), pela adição de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. Algumas amostras receberam a adição prévia de nicotinamida-adenina dinucleotídeo na forma reduzida (β-NADH). As preparações enzimáticas assim obtidas foram incubadas a 30 °C com os substratos de escolha, a saber: 3-metilciclo-hexanona (**3**), acetofenona (**5**), 4-metil-2-pentanona (**16**), 2-ciclo-hexenona (**2**), ciclo-hexanona (**1**), 2-metil-3-pentanona (**17**), (±)-cânfora (**4**) e (±)-canforquinona (**28**), em concentração final aproximada de 40 mmol·L⁻¹, por períodos entre 8 e 120 horas. Decorrido o tempo de incubação, a mistura reacional foi filtrada a vácuo e extraída com acetato de etila (10 mL, 3 vezes). As fases orgânicas foram secadas sobre sulfato de magnésio anidro e filtradas. Os produtos de redução foram pesquisados no extrato por cromatografia a gás com detecção por ionização de chama.

7.4.4.2. Biotransformações com homogenatos de células vegetais em diferentes períodos de incubação com o substrato e pH dos meios reacionais

Nesta etapa do trabalho, o procedimento foi alterado e as seguintes espécies vegetais foram empregadas: *Laurus* spp., *Eriobotrya japonica*, *Eugenia uniflora*, *Psidium guajava*, *Mangifera* spp., *Camellia* spp., *Artocarpus heterophyllus*, *Bauhinia variegata* e *Morus nigra*. Alguns ensaios foram repetidos e/ou modificados em função dos resultados.

As folhas do biocatalisador (40 g por ensaio) foram lavadas com água corrente, descontaminadas com etanol 70% (v/v) por 1 minuto e maceradas com nitrogênio líquido e sílica gel 70-230 mesh, 0,5 g/g de tecido. Adicionou-se, imediatamente à obtenção de um pó, um gel de 50 g de polivilpolipirrolidona (PVPP; 1,25 g/g de folhas), pré-hidratada em 280 mL de tampão fosfato 50 mmol·L⁻¹ pH 6,5 contendo ascorbato de sódio 50 mmol·L⁻¹ e ditioneitol (DTT) 3 mmol·L⁻¹, a 0 °C. Adicionalmente, alguns tampões receberam ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mmol·L⁻¹ ou MgSO₄ 1 mmol·L⁻¹ em sua composição. Esse extrato foi filtrado através de um tecido de algodão limpo. Ao material restante no tecido adicionaram-se mais 50 mL de tampão, para novamente se espessar o líquido através do tecido. Os extratos assim obtidos foram centrifugados a 3500 ou 9000 RPM por 20 minutos. O sobrenadante foi fracionado em alíquotas de 5 mL, que tiveram o pH mantido ou alterado para 4,5 ou 8,5 (determinação feita com papel indicador) pela adição de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. Procedeu-se, então, à adição de β-nicotinamida-adenina dinucleotídeo (β-NADH, até a concentração final entre 0,07 e 0,31 mmol·L⁻¹) ou β-nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato (β-NADPH, até 0,03-0,05 mmol·L⁻¹), ambos na forma reduzida, com tudo mantido em banho de gelo durante a distribuição. As preparações enzimáticas assim obtidas foram incubadas, a 30 °C, com os substratos de escolha, a saber: (±)-norcânfora (**13**), 4-metil-2-pentanona (**16**), ciclohexanona (**1**), acetofenona (**5**) e 2,4-pentanodiona (**18**), em concentrações entre 26 e 33 mmol·L⁻¹, por períodos entre 8 e 120 horas. Decorrido o tempo de incubação, as misturas reacionais foram acidificadas até pH 1, acrescidas de cerca de 5 mL acetona a 0 °C, filtradas a vácuo e armazenadas a 10 °C por, no mínimo, 18 horas. Os produtos de redução foram pesquisados por cromatografia a gás com detecção por ionização de chama, no sobrenadante, após neutralização.

7.4.4.3. Biotransformações com homogenatos de células de *Eriobotrya japonica* em diferentes concentrações de NADPH adicionado

As folhas do biocatalisador (3 g) foram lavadas com água corrente, descontaminadas com etanol 70% (v/v) por 1 minuto e maceradas com nitrogênio líquido e sílica gel 70-230 mesh, 0,5 g/g de tecido. Adicionou-se, imediatamente à obtenção de um pó de folhas, uma pasta fluida de 3,75 g de polivilpolipirrolidona (PVPP; 1,25 g/g de folhas), pré-hidratada em 25 mL de tampão fosfato 50 mmol·L⁻¹ pH 6,8 contendo ascorbato de sódio 25 mmol·L⁻¹, ditioneitol (DTT) 1 mmol·L⁻¹ e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mmol·L⁻¹, a 0 °C.

Após o descongelamento, a pasta foi suavemente misturada durante 20 minutos. Esse extrato foi centrifugado a 10000 RPM por 2 minutos. O sobrenadante assim obtido foi centrifugado a 10000 RPM por 20 minutos. O novo sobrenadante foi fracionado em alíquotas de 100 µL, às quais adicionou-se β-nicotinamida-adenina dinucleotídeo (β-NADH) ou β-nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato (β-NADPH), ambos na forma reduzida, até 1,6, 3,0, 6,6 e 14,8 mmol·L⁻¹. Amostras sem co-fator foram reservadas para a subsequente determinação de proteínas e armazenadas a -20 °C.

As preparações enzimáticas assim obtidas, em duplicata, foram incubadas, a 30 °C, com o substrato (±)-norcânfora (**13**, 16,6 mmol·L⁻¹), por 24 horas. Uma amostra sem co-fator foi incluída no ensaio. Decorrido o tempo de incubação, a mistura reacional foi acrescida de 100 µL de solução de ciclo-hexanona 0,021 mol·L⁻¹ (padrão interno) em acetona, a 0 °C e armazenada a -20 °C por 18 horas. As 18 amostras foram, então, centrifugadas a 10000 RPM por 15 minutos, em microcentrífuga, transferindo-se, em seguida, o sobrenadante a *vials* para a posterior pesquisa dos produtos de redução por cromatografia a gás com detecção por ionização de chama. As amostras foram mantidas congeladas a aproximadamente -20 °C até o descongelamento para a análise.

7.4.4.4. Biotransformações com homogenatos de células de *Artocarpus heterophyllus* e inibidores de protease

Foram conduzidas segundo a metodologia descrita no item 7.4.4.3, com alterações na centrifugação para a obtenção do homogenato de células. A pasta fluida foi centrifugada a 10000 RPM por 7 minutos e o sobrenadante obtido, a 17000 RPM por 20 minutos, a 4 °C. O novo sobrenadante foi fracionado em alíquotas de 100 µL, às quais se adicionou β-nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida (β-NADPH, 7,7 mmol·L⁻¹).

As preparações enzimáticas assim obtidas foram incubadas, a 30 °C, com os substratos (±)-norcânfora (**13**, 15,4 mmol·L⁻¹), 2-metilciclo-hexanona (**14**, 14,7 mmol·L⁻¹), 3-metilciclo-hexanona (**3**, 18,2 mmol·L⁻¹), 4-metilciclo-hexanona (**15**, 14,4 mmol·L⁻¹), 4-metil-2-pentanona (**16**, 14,8 mmol·L⁻¹), 2-metil-3-pentanona (**17**, 15,1 mmol·L⁻¹), 2,4-pentanodiona (**18**, 16,0 mmol·L⁻¹) e acetofenona (**5**, 14,9 mmol·L⁻¹), por 7 dias.

O experimento foi realizado em duplicata, sendo adicionado 1 µL de PMSF 100 mmol·L⁻¹ (fluoreto de fenilmetilsulfonila, concentração final 0,8 mmol·L⁻¹) a parte dos microtubos eppendorf®; e 10 µL de PMSF 100 mmol·L⁻¹ e leupeptina 0,23 mmol·L⁻¹ à outra parte.

Alíquotas dos lisados celulares foram empregadas como controles, sem substrato (branco) ou sem inibidor de protease (acrescentando-se 10 µL de PMSF 100 mmol·L⁻¹ e leupeptina 0,23 mmol·L⁻¹, ou 10 µL de cada um dos substratos em separado), respectivamente, totalizando 50 *via*ls a serem analisados por cromatografia a gás, com duração média de 25 minutos por análise.

7.4.5. **Triagem por biocatalisadores com homogenatos de células vegetais**

7.4.5.1. Biotransformações com homogenatos obtidos de folhas

As folhas do biocatalisador de escolha (6 g por ensaio) são lavadas com água corrente, descontaminadas com etanol 70% (v/v) por 1 minuto e maceradas com nitrogênio líquido e sílica gel 70-230 mesh, 0,5 g/g de tecido. Adiciona-se, imediatamente à obtenção de um pó de folha, uma pasta fluida de 7,5 g de

polivilpolipirrolidona (PVPP; 1,25 g/g de folhas), pré-hidratada em 50 mL de tampão fosfato 50 mmol·L⁻¹ pH 6,5 ou 6,8, contendo ascorbato de sódio 25 mmol·L⁻¹ e ditiotreitól (DTT) 1 mmol·L⁻¹, a 0 °C. Adicionalmente, os tampões recebem ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mmol·L⁻¹ ou MgSO₄ 1,3 mmol·L⁻¹ em sua composição. Após o descongelamento a 0 °C, a pasta fluida é suavemente misturada durante 20 minutos, sendo, a seguir, centrifugada a 10000 RPM por 3 minutos.

O sobrenadante assim obtido é, então, centrifugado a 17000 RPM por 20 minutos, a 4 °C. O novo sobrenadante é fracionado em alíquotas de 100 µL, às quais adiciona-se β-nicotinamida-adenina dinucleotídeo (β-NADH) ou β-nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato (β-NADPH), ambos na forma reduzida, até a concentração final 8,0 mmol·L⁻¹ (recomenda-se o emprego na concentração 0,8 mmol/L, *vide* o item 5.3).

Amostras sem co-fator são reservadas para a subsequente determinação de proteínas e armazenadas a -20 °C. As preparações enzimáticas obtidas, em duplicata, foram incubadas, a 30 °C, com os substratos de escolha, a saber: (±)-norcânfora (**13**), 2-metilciclo-hexanona (**14**), 3-metilciclo-hexanona (**3**), 4-metilciclo-hexanona (**15**), 4-metil-2-pentanona (**16**), 2-metil-3-pentanona (**17**) e acetofenona (**5**), em concentrações entre 15 e 19 mmol·L⁻¹, por períodos de 6 ou 24 horas e 96 horas. Uma amostra, por substrato, é incubada sem co-fator por 96 horas, enquanto amostras-branco com apenas o homogenato e os co-fatores foram incubadas por 96 horas (não é necessário adicionar co-fatores à amostra branco, após a verificação de que estes não contribuem com interferentes no tempo de retenção dos analitos). Decorrido o tempo de incubação, as misturas reacionais foram acrescidas de 100 µL de solução de ciclo-hexanona 0,028 mol·L⁻¹ (padrão interno) em acetona, a 0 °C e armazenadas a -20 °C por 18 horas.

As 72 amostras assim obtidas são centrifugadas a 10000 RPM por 15 minutos, em microcentrifuga, transferindo-se, em seguida, o sobrenadante a *vials* para a posterior pesquisa dos produtos de redução por cromatografia a gás com detecção por ionização de chama. As amostras devem ser preferencialmente armazenadas a, no máximo, -20 °C até as análises. O emprego de uma pré-coluna é recomendável, ou temperaturas mais elevadas na câmara de injeção (mínimo 250 °C), que deve, se possível, ser monitorada e removida para limpeza quando necessário, para garantir a vida útil das colunas capilares e do detector.

7.4.5.2. Biotransformações com homogenatos obtidos de culturas de células de *Cereus peruvianus*

A massa de tecido de calo da cultura de *Cereus peruvianus* (5,76 g) foi macerada com nitrogênio líquido e sílica gel 70-230 mesh, 0,5 g/g de tecido. Adicionou-se, imediatamente à obtenção de um pó, uma pasta fluida a 0 °C de 7,2 g de polivilpolipirrolidona (PVPP; 1,25 g/g de tecido), pré-hidratada em 50 mL de tampão fosfato 50 mmol·L⁻¹ pH 6,5, contendo ascorbato de sódio 25 mmol·L⁻¹, ditioneitol (DTT) 1 mmol·L⁻¹ e EDTA 1 mmol·L⁻¹. Em seguida, após o descongelamento lento a 0 °C, adotou-se o mesmo procedimento descrito no item 7.4.5.1.

7.4.6. Determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford (1976).

O reagente de Bradford foi preparado pela diluição de 20 mg do corante “Coomassie Brilliant Blue” G-250 em 10 mL de etanol, adicionando-se 20 mL de ácido fosfórico 85% (m/v) e completando-se o volume para 1 L com água deionizada, estéril. A solução é armazenada a 4 °C.

Para a determinação de proteínas, adicionaram-se 5 µL do homogenato de células preparado conforme descrito no item 7.4.5.1 e reservado, a 190 µL do reagente de Bradford. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 595nm. A comparação dos resultados com a curva de calibração permitiu a determinação da concentração das proteínas totais no meio em estudo.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ANDRADE, L. H.; OMORI, A. T.; PORTO, A. L. M.; COMASSETO, J. V. Asymmetric synthesis of arylselenoalcohols by means of the reduction of organoseleno acetophenones by whole fungal cells. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, v. 29, p. 47-54, 2004.

ANDRADE, L. H.; UTSUNOMIYA, R. S.; OMORI, A. T.; PORTO, A. L. M.; COMASSETO, J. V. Edible catalysts for clean chemical reactions: Bioreduction of aromatic ketones and biooxidation of secondary alcohols using plants. *J Mol Catal B: Enzym*, v. 38, n. 2, p. 84-90, 2006.

ANTUNES, O. A. C. Interfaces com a indústria. *Quim. Nova*, v. 28, Suplemento, p. 64-75, 2005.

AVIV D.; KROCHMAL, E.; DANTES A.; GALUN E. Biotransformation of monoterpene by mentha cell lines: conversion of menthone to neomenthol. *Planta Medica*, v. 42, p. 236-243, 1981.

BALDASSARE, F.; BERTONI, G.; CHIAPPE, C.; MARIONI, F. Preparative synthesis of quiral alcohols by enantioselective reduction with *Daucus carota* root as biocatalyst. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 11, p. 55-58, 2000.

BELTER, P. A.; CUSSLER, E. L.; HU, W-S. Centrifugation. *In: Bioseparations: downstream processing for biotechnology*, p. 47-75. Nova Iorque: Wiley-Interscience, 19XX.

BELTER, P. A.; CUSSLER, E. L.; HU, W-S. Precipitation. *In: Bioseparations: downstream processing for biotechnology*, p. 221-236. Nova Iorque: Wiley-Interscience, 19XX.

BOMMARIUS, A. S.; SCHWARM, M.; DRAUZ, K. Biocatalysis to amino acid-based chiral pharmaceuticals – examples and perspectives. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, v. 5, p. 1-11, 1998.

BOMMARUS, A. S.; POLIZZI K. M. Novel biocatalysts: recent developments. *Chemical Engineering Science*, v. 61, p. 1004-1016, 2006.

- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRENNA, E.; FUGANTI, C.; SERRA, S. Enantioselective perception of chiral odorants. *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 14, p. 1-42, 2003.
- BRUNI, R.; FANTIN, G.; MEDICI, A.; PEDRINI, P.; SACCHETTI, G. Plants in organic synthesis: an alternative to baker's yeast. *Tetrahedron Lett.*, v. 43, p.3377-3379, 2002.
- BUQUE-TABOADA, E. M.; STRAATHOF, A. J. J.; HEIJNEN, J. J.; VAN DER WIELEN, L. A. M. Substrate inhibition and product degradation during the reduction of 4-oxoisophorone by *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Tech.*, v. 37, p. 625-633, 2005.
- CAHN, R. S.; INGOLD, C. K.; PRELOG, V. Specification of Molecular Chirality. *Angew. Chem. Int. Edit.*, v. 5, p. 385-415, 1966.
- CARBALLEIRA, J. D.; ÁLVAREZ, E.; SINISTERRA, J. V. Biotransformation of cyclohexanone using immobilized *Geotrichum candidum* NCYC49. Factors affecting the selectivity of the process. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, v. 28, p. 25-32, 2004.
- CARVALHO, C. C. C. R.; FONSECA, M. M. R. Biotransformation of terpenes. *Biotechnol. Adv.*, v. 24, p. 134-142, 2006.
- CHAI, W.; SAKAMAKI, H.; KITANAKA, S.; HORIUCHI, C. A. Biotransformation of cicloalkanediones by *Caragana chamlagu*. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, v. 76, p. 177-182, 2003.
- COMASSETO, J. V.; ASSIS, L. F.; ANDRADE, L. H.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; PORTO, A. L. M. Biotransformations of ortho-, meta- and para-aromatic nitrocompounds by strains of *Aspergillus terreus*: Reduction of ketones and deracemization of alcohols. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 39, p. 24-30, 2006.
- COMASSETO, J. V.; OMORI, A. T. ; PORTO, A. L. M. ; ANDRADE, L. H. Preparation of chiral organochalcogeno-alpha-methylbenzyl alcohols via biocatalysis. The role of *Daucus carota* root. *Tetrahedron Lett*, v. 45, n. 3, p. 473-476, 2004.

CROTEAU, R.; FELTON M. Substrate-specificity of monoterpene dehydrogenases from *foeniculum-vulgare* and *tanacetum-vulgare*. *Phytochemistry*, v. 19, p. 1343, 1980.

CROTEAU, R.; WINTERS, J. N. Demonstration of the intercellular compartmentation of *l*-menthone metabolism in peppermint (*Mentha piperita*) leaves. *Plant Physiol.*, v. 69, p. 975-977, 1982.

EVANS, W. C. Cell differentiation and ergastic cell contents. *In: Pharmacognosy*, 15^a ed., p. 526-537, Londres: W. B. Saunders, 2002.

EVANS, W. C. Plant growth regulators. *In: Pharmacognosy*, 15^a ed., p. 67-71, Londres: W. B. Saunders, 2002.

FERRAZ, H. M. C.; BIANCO, G. G.; BOMBONATO, F. I.; Andrade, L. H.; PORTO, A. L. M. Bioreduction of substituted α -tetralones promoted by *Daucus carota* root. *QUIM NOVA*, v. 31, p. 813-817, 2008.

FISCHBACH, R. F.; STAUDT, M.; ZIMMER, I.; RAMBAL, S.; SCHNITZLER, J-P. Seasonal pattern of monoterpene synthase activities in leaves of the evergreen tree *Quercus ilex*. *Physiologia Plantarum*, v. 114, p. 354-360, 2002.

FISCHBACH, R. J.; ZIMMER I.; STEINBRECHER, R.; PFICHNER, A.; SCHNITZLER J-P. Monoterpene synthase activities in leaves of *Picea abies* (L.) Karst. and *Quercus ilex* L. *Phytochemistry*, v. 54, p. 257-265, 2000.

FRANKISH, N.; MENEZES, F. S.; MILLS, C.; SHERIDAN, H. Enhancement of insulin release from the β -cell line INS-1 by an ethanolic extract of *Bauhinia variegata* and its major constituent roseoside. *Planta Med.*, v. 76, p. 995–997, 2010.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, v. 50, n. 1, p. 151-158, 1968.

GOLDBERG, K.; SCHROER, K.; LÜTZ, S.; LIESE, A. Biocatalytic ketone reduction - a powerful tool for the production of chiral alcohols - part II: whole-cell reductions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 76, p. 249–255, 2007.

GONÇALVES, R. A. C.; PORTO, A. L. M.; PINHEIRO, L.; CAGNON, J. R.; MANFIO, G. P.; MARSAIOLI, A. J. . Multibioreaction methodology for Baeyer-Villiger monooxygenase monitoring . *Food Technol Biotech*, v. 42, p. 355-361, 2004.

HAMADA, H.; NAKAMURA, N.; ITO, S.; KAWABE, S.; FUNAMOTO, T. Enantioselectivity in the reduction of α -dicarvelone by cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*, v. 27, n. 12, p. 3807-3808, 1988.

HUISMAN, G. W.; LIANG, J.; KREBBER, A. Practical chiral alcohol manufacture using ketoreductases. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 14, p. 122–129, 2010.

ISHIHARA, K.; HAMADA, H.; HIRATA, T.; NAKAJIMA, N. Biotransformation using plant cultured cells. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 23, p. 145-170, 2003.

ITOSAWA, T.; KISE, H. Immobilization of HDLADH on polymer materials for reduction of ciclohexanone with NADH regeneration under two-phase conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 80, n. 1, p. 30-34, 1995.

KALUZNA, I. A.; ROZZELL, J. D.; KAMBOURAKIS, S. Ketoreductases: stereoselective catalysts for the facile synthesis of chiral alcohols. *Tetrahedron-Asymmetr.*, v. 16, p. 3682-3689, 2005.

KIERAN, P. M.; MACLOUGHLIN, P. F.; MALONE, D. M. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*, v. 59, p. 39-52, 1997.

KNOBLOCH, K. H.; BERLIN, J. Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Z. Naturforsch*, v. 35 c, p. 551-556, 1980.

KROUTIL, W.; MANG, H.; EDEGGER, K.; FABER, K. Recent advances in the biocatalytic reduction of ketones and oxidation of *sec*-alcohols. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, v. 8, p. 120-126, 2004.

LAPPIN, G. J.; STRIDE, J. D.; TAMPION, J. Biotransformation of monoterpenoids by suspension cultures of *Lavandula angustifolia*. *Phytochemistry*, v. 26, n. 4, p. 995-997, 1987.

LOOMIS, W.D.; BATTAILE, J. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochem.*, v. 5, p. 423-438, 1966.

LORENZI, H.; SARTORI, S. F.; BACHER, L. B.; LACERDA, M. T. C. *Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)*. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006.

LOU, W. Y.; ZONG, M. H.; FAN, X. D.; LU, J. Q.; DU, W. Asymmetric microbial reduction of organosilyl ketone with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells in water/organic solvent biphasic system. *Prog. Biochem. Biophys.*, v. 29, n. 2, p. 297-301, 2002.

LUTTERBACH, R.; STÖCKIGT, J. High yield formation of arbutin from hydroquinone by cell-suspension cultures of *Rauwolfia serpentina*. *Helv. Chim. Acta*, v. 75, p. 2009-2011, 1992.

MACHADO, L. L.; SOUZA, J. S. N.; MATTOS, M. C.; SAKATA, S. K.; CORDELL, G. A.; LEMOS, T. L. G. Bioreduction of aldehydes and ketones using *Manihot* species. *Phytochemistry*, v. 67, p. 1637-1643, 2006.

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

MOONMANGMEE, D.; FUJII, Y.; TOYAMA, H.; THEERAGOOL, G.; LOTONG, N.; MATSUSHITA, K.; ADACHI, O. Purification and characterization of membrane-bound quinoprotein cyclic alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter frateurii* CHM 9. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 65, n. 12, p. 2763-2772, 2001.

MORENO, P. R. H. Influence of stress factors on the secondary metabolism in suspension cultured *Catharanthus roseus* cells. Leiden, 1994. 155p. Tese de Doutorado – XXX. Universidade de Leiden (Holanda).

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v. 15, p. 473-497, 1962.

NOVÁK, J.; ZAREVÚCKA, M.; WIMMER, Z.; TYKVA, R. A comparison of the enantioselective reduction potential of five strains of *Saccharomyces cerevisiae* towards a selected ketone. *Biotechnol. Lett.*, v. 23, n. 18, p. 1517-1522, 2001.

OBERSCHALL, A.; DEÁK, M.; TÖRÖK, K.; SASS, L.; VASS, I.; KOVÁCS, I.; FEHÉR, A. A novel aldose/aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid

peroxidation under chemical and drought stresses. *The Plant Journal*, v. 24, n. 4, p. 437-446, 2000.

OBITZ, P.; ENDREB, S.; STÖCKIGT, J. Enzymatic biosynthesis of raumacline. *Phytochemistry*, v. 40, n° 5, p. 1407-1417, 1995.

OKUMURA T.; OOKA H.; HASHIGUCHI S.; IKARIYA, T; NOYORI R. Practical enantioselective hydrogenation of aromatic ketones. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 117, n. 9, p. 2675-2676, 1995.

ORDEN, A. A.; BISOGNO, F. R.; CIFUENTE, D. A.; GIORDANO, O. S.; SANZ, M. K. Asymmetric bioreduction of natural xenobiotic diketones by *Brassica napus* hairy roots. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 42, p. 71–77, 2006.

OWEN, R. O.; MCCREATH, G. E.; CHASE, H. A. A new approach to continuous counter-current protein chromatography: direct purification of malate dehydrogenase from a *Saccharomyces cerevisiae* homogenate as a model system. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 53, n. 4, p. 427-441, 1997.

PACHECO, A. O.; KAGOHARA, E.; ANDRADE, L. H.; COMASSETO, J. V.; CRUSIUS, I. H. S.; PAULA, C. R.; PORTO, A. L. M. Biotransformations of nitro-aromatic compounds to amines and acetamides by tuberous roots of *Arracacia xanthorrhiza* and *Beta vulgaris* and associated microorganism (*Candida guilhiermondii*). *Enzyme Microb Tech*, v. 42, p. 65-69, 2007.

PANKE, S.; WUBBOLTS, M. Advances in biocatalytic synthesis of pharmaceutical intermediates. 2005). *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 9, p. 188-194, 2005.

Patil, C. D.; PATIL, S. V.; SALUNKE, B. K.; SALUNKHE, R. B. Bioefficacy of *Plumbago zeylanica* (Plumbaginaceae) and *Cestrum nocturnum* (Solanaceae) plant extracts against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and nontarget fish *Poecilia reticulata*. *Parasitol. Res.*, v. 108, p. 1253–1263, 2011.

PFRUENDER, H.; AMIDJOJO, M.; KRAGL, U.; WEUSTER-BOTZ, D. Efficient whole-cell biotransformation in a biphasic ionic liquid/water system. *Angew. Chem., Int. Ed.*, v. 43, p. 4529-4531, 2004.

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

- ROCHA, L. K.; OLIVEIRA, A. J. B.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. F. P. S. Effect of different culture medium components on production of alkaloids in callus tissues of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Acta Scientiarum: Biological Sciences*, v. 27, p. 37-41, 2005.
- Salvanoa, M. S.; Canterob, J. J.; Vázquezc, A. M.; Formicad, S. M.; Aimard, M. L. Searching for local biocatalysts: Bioreduction of aldehydes using plant roots of the Province of Córdoba (Argentina). *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 71, p. 16–21, 2011.
- SCRAGG, A. H.; ASHTON, S.; YORK, A.; STEPAN-SARKISSIAN, G.; GREY, D. Growth of *Catharanthus roseus* suspension for maximum biomass and alkaloids accumulation. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 12, p. 292-298, 1990.
- SERRA, S.; FUGANTI, C.; BRENNNA, E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends in Biotechnology*, v. 23, n. 4, p. 193-198, 2005.
- SEZGINTÜRK, M. K.; DINÇKAYA, E. Direct determination of sulfite in food samples by a biosensor based on plant tissue homogenate. *Talanta*, v. 65, p. 998-1002, 2005.
- SHIGEMATSU, H.; MATSUMOTO, T.; KAWAUCHI, G.; HIROSE, Y.; NAEMURA, K. Horse liver alcohol dehydrogenase-catalysed enantioselective reduction of cyclic ketones: the effect of the hydrophobic side chain of the substrate on the stereoselectivity of the reaction. *Tetrahedron-Asymmetr.*, v. 6, n. 12, p. 3001-3008, 1995.
- SHIMIZU, K.; KONDO, R.; SAKAI, K.; BUABARN, S.; DILOKKUNANANT, U. 5^a-reductase inhibitory component from leaves of *Artocarpus altilis*. *J. Wood Sci.*, v. 46, p. 385-389, 2000.
- STRYER, L. In: *Bioquímica*, 3 ed., p 264. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1992.
- SUCKLING, C. J. (Ed.). *Enzyme chemistry: impact and applications*. 2 ed. Londres: Chapman and Hall, 1990.
- SUZUKI, Y.; KANENO D.; TOMODA, S. Theoretical study on the mechanism and diastereoselectivity of NaBH₄ reduction. *J. Phys. Chem. A*, v. 113, 2578–2583, 2009.

TAKEMURA, T.; EMOTO, G.; SATOH, J.; KOBAYASHI, Y.; YAGINUMA, C.; TAKAHASHI, Y.; UTSUKIHARA, T.; HORIUCHI, C. A. Optical resolution of hexamethylbiphenol by cholesterol esterase and porcine pancreas lipase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 55, p. 104–109, 2008.

THOMAS, J. M.; RAJA, R. Designing Catalysts for Clean Technology, Green Chemistry, and Sustainable Development. *Annu. Rev. Mater. Res.*, v. 35, p. 315-350, 2005.

THOMAS, S. M.; DICOSIMO, R.; NAGARAJAN, V. Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry. *Trends in Biotechnology*, v. 20, n. 6, p. 238-242, 2002.

VAN BEKKUM, H.; GALLEZOT, P. (Eds.). *Catalytic conversion of renewables*, v. 27. Editora, 2004.

VAN DER DONK, W. A.; ZHAO, H. Recent developments in pyridine nucleotide regeneration. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 14, p. 421-426, 2003.

VILLA, R.; MOLINARI, F.; LEVATI, M.; ARAGOZZINI, F. Stereoselective reduction of ketones by plant cell cultures. *Biotechnol. Lett.*, v. 20, n. 12, p. 1105-1108, 1998.

WALLNER, S. R.; LAVANDERA, I.; MAYER, S. F.; ÖHRLEIN, R.; HAFNER, A.; EDEGGER, K.; FABER, K.; KROUTIL, W. Stereoselective anti-Prelog reduction of ketones by whole cells of *Comamonas testosteroni* in a substrate-coupled approach. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, v. 55, p. 126-129, 2008.

YADAV, J. S.; NANDA, S.; THIRUPATHI REDDY, P.; BHASKAR RAO, A. Efficient enantioselective reduction of ketones with *Daucus carota* root. *J. Org. Chem.*, v. 67, p. 3900-3903, 2002.

YADAV, J. S.; REDDY, G. S. K. K.; SABITHA, G.; KRISHNA, A. D.; PRASAD, A. R.; HAFEEZ-U-R-RAHAMAN; RAO, K. V.; RAO, A. B. *Daucus carota* and baker's yeast mediated bio-reduction of prochiral ketones. *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 18, p. 717–723, 2007.

YADAV, J. S.; THIRUPATHI REDDY, P.; NANDA, S.; BHASKAR RAO, A. Stereoselective synthesis of (R)-(-)-denopamine, (R)-(-)-tembamide and (R)-(-)-

aegeline via asymmetric reduction of azido ketones by *Daucus carota* in aqueous medium. *Tetrahedron: Asymmetry.*, v. 67, p. 3900-3903, 2002.

YAKABE, S.; HIRANO, M.; MORIMOTO, T. Alumina-assisted reduction of carbonyl compounds with sodium borohydride in hexane. *Can. J. Chem.*, v. 76, p. 1916-1921, 1998.

OUTRAS ATIVIDADES

Em paralelo às atividades de laboratório, cursei e obtive aprovação nas disciplinas abaixo relacionadas, como parte do programa do curso de Pós-Graduação Integrada em Química (doutorado direto), área Química Orgânica, pela Universidade de São Paulo. Fui aprovada no Exame de Qualificação, que se deu no dia 07/08/2007.

1. Mecanismos das Reações Orgânicas (120 horas/ 8 créditos);
 2. Conceitos em Química Orgânica Avançada (120 horas/ 8 créditos);
 3. Conceitos Básicos de Espectroscopia (120 horas/ 8 créditos);
 4. Introdução à Biocatálise (90 horas/ 6 créditos);
 5. Determinação de Enantiômeros: Modos e Mecanismos de Separação (60 horas/ 4 créditos);
 6. Biossíntese de Metabólitos Secundários Vegetais (60 horas/ 4 créditos);
 7. Prática de Ensino de Química e Bioquímica (45 horas/ 3 créditos);
 8. Seminários Gerais do Departamento de Química Fundamental I (2 créditos);
 9. Seminários Gerais do Departamento de Química Fundamental II (3 créditos).
 10. Seminários Gerais do Departamento de Química Fundamental III (2 créditos).
 11. Seminários Gerais de Química Orgânica.IV, com a apresentação do trabalho “Reconhecimento Visual de Moléculas Quirais” (3 créditos).
-
1. Participação no 11^o BMOS (Brazilian Meeting on Organic Synthesis), Canela (RS); agosto/setembro de 2005, com o trabalho “Biotransformation of ketones by plant cell cultures” (2 créditos).
 2. Participação no III Workshop de Biocatálise e II Encuentro Regional de Biocatálisis e Biotransformaciones, São Paulo (SP); janeiro de 2006.
 3. Participação no IV Workshop de Biocatálise e Biotransformação, Instituto de Química de São Carlos, Campus II, São Carlos (SP); julho de 2008.

Redução de cetonas por redutor convencional

1. Monitoria da disciplina Química Geral (QFL-0605, 2^o semestre/2005) para alunos de graduação da Física – período noturno, incluída como atividade do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE, 5 créditos).
2. Monitoria da disciplina Química Geral (QFL-0137, 1^o semestre/2007) para alunos de graduação da Farmácia – período diurno, incluída como atividade do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

São Paulo, 30 de setembro de 2011