

**UNIVERSIDADE DE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**

ANA CLAUDIA DA SILVA LIMA

**SÍNTESE DE DERIVADOS DE
 β -AMINOCETÔNICOS VIA REAÇÃO DE
MANNICH UTILIZANDO BIOCATALISADORES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

DOURADOS/MS

MARÇO/2012

ANA CLAUDIA DA SILVA LIMA

**SÍNTESE DE DERIVADOS DE
 β -AMINOCETÔNICOS VIA REAÇÃO DE
MANNICH UTILIZANDO BIOCATALISADORES**

ORIENTADOR: NELSON LUIS DE CAMPOS DOMINGUES

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia na área de concentração Tecnologia

DOURADOS/MS

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD

547 Lima, Ana Claudia da Silva.
L628s Síntese de derivados de β -aminocetônicos via reação de Mannich utilizando biocatalisadores / Ana Claudia da Silva Lima. – Dourados, MS : UFGD, 2012.

82 f.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Luis de Campos Domingues.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.

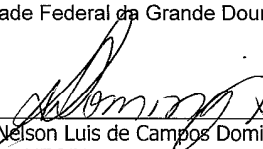
1. Química orgânica – Síntese. 2. Biocatálise. 3. Biocatalisadores. 4. Reações de Mannich. 5. Síntese orgânica. I. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

Termo de Aprovação

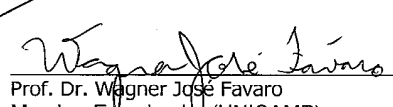
Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **"Síntese de alguns derivados de beta-aminocetônicos via reação de mannich utilizando biocatalisadores"**, de autoria de **Ana Cláudia da Silva Lima**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof. Dr. Nelson Luis de Campos Domingues
(Orientador-UFGD)
Presidente da Banca Examinadora



Prof. Dr. Anderson Wellington Rinaldi
Membro Examinador (UFGD)



Prof. Dr. Wagner José Favaro
Membro Examinador (UNICAMP)

Dourados/MS, 30 de março de 2012.

DEDICATÓRIA

Ao Rei dos Reis, Jesus,
consagro e dedico todo
esse trabalho e tudo o
que sou, pois Ele
batalhou comigo até o
fim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus fonte da minha alegria, força, coragem, enfim fonte de tudo de bom que há em mim.

A minha família pelo apoio e pela compreensão quando por inúmeras vezes estive ausente. Agradeço aos meus irmãos lindos: Ana Carolina, Ana Paula, Thiago e Geovanne sempre tão presentes e engraçados.

A meu orientador a quem tenho um profundo respeito e admiração, acredito que realmente foi um plano de Deus colocá-lo no meu caminho, para mim é uma honra ser a primeira orientada de mestrado, sei que muitos virão e se sentirão tão honrados quanto eu pela orientação, porém eu posso dizer que já tive esse privilégio. Agradeço não só pela orientação, mas pelas lições de vida que me ensinas-te, vou carregar isso comigo o resto da vida.

Agradeço também a mamis máster suprema inavatarável Daniele que é uma mulher realmente virtuosa e o seu valor realmente muito excedem ao das mais finas jóias. Agradeço pelas orações, pelas inúmeras vezes que nos recebeu com um sorriso no rosto e uma mesa farta em sua casa.

Aos professores: Gian Freschi, Andrelson Rinaldi, quanta sabedoria junta eu sou uma privilegiada por ter a oportunidade de passar esses dois anos da minha vida com vocês.

Ao professor Gustavo Graciano Fonseca que gentilmente cedeu as cepas de microrganismos e também cedeu espaço em seu laboratório para que a parte microbiológica fosse realizada.

Agradeço ao professor Adilson Beatriz (UFMS) e ao pesquisador Roberto da Silva Gomes pelas análises de RMN, vocês foram indispensáveis.

Agradeço a todos os amigos do Laboratório de Materias Híbridos (LMH): Mirian, Cleiser (Crac), Genilson (Geniboy), Adalberto (Betinhoooo), Silvia, Persiely (Persy Jackson), Keila (Keilinha), Vicente (loucura), Luís Felipe (Bola gato), Wellington (Bravão) pela ajuda incrível durante toda a parte experimental, pela paciência comigo, pelo apoio incondicional, pelas horas de alegria, risos e também lutas que passamos juntos, agradeço por vocês tornarem o ambiente de trabalho mais agradável.

Agradeço a todos meus irmãos e irmãs da grande família Domingues, Mariana, Paula Vanessa, Rodrigo (Grilo), Danilo, Cristiane, Bruna, Aline, Elvis, Elias, Felipe (Pinduca). Agradeço a todos, pois todos, de alguma forma, contribuíram nesta minha caminhada até aqui, sem vocês essa família não seria a mesma.

Agradeço a minha mais que amiga/irmã Érica, (maninha) como você é especial pra mim como é bom ter conhecido você, como é bom compartilhar minha vida com você. Eu aprendi muito com você e posso dizer que o laboratório não era o mesmo sem você. Obrigada por rir, chorar e dançar ao bom som do Michael (rsrs) comigo. A sua alegria, graça, beleza de espírito contagiaram meu coração e me cativou profundamente, agora você é responsável por mim, pois como diz a bela frase “Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas”. Amo você sempre.

Aos amigos da minha turma de mestrado vocês foram um referencial pra mim, um modelo de ousadia, foram um leme nessa caminhada, obrigada pelos momentos juntos.

Agradeço a todos meus amigos da Igreja Metodista da Cabeceira Alegre: Fabiane, Thalyta, Anderson, João, Simone, Pr. Olímpio, Ediná, Cinthia, Wellinton, e João Bento pelas inconstantes orações.

Ao meu lindo e amado namorado Paulo Gehlen, companheiro de todas as horas que além de namorado é amigo, pois sabe sonhar comigo. Agradeço pelo incentivo, pela confiança, pelas horas que gastou lendo esta dissertação comigo, agradeço por aguentar minha ausência e meu stress em muitos momentos. Enfim agradeço a Deus por ter colocado você no meu caminho, agradeço a você simplesmente por me amar apesar de... Essa dissertação é nossa.

LISTA DE ABREVIATURAS

THF = Tetrahidrofurano

DMSO = Dimetilsulfóxido

DH = Desidrogenase

ADH = Álcool desidrogenase

MAPK = Proteína Mitógeno Quinase Ativada

RMN¹H = Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

GC/MS = Cromatografia Gasosa Acoplada ao detector de Massas

5'-IMP = Inosina-5' -monofosfato; 5'

GMP = Guanosina-5' –monofosfato

AP/Ptase = Fosfatase ácida/fosfotransferase

EPA = Agência de Proteção Ambiental (Environmental Protection Agency)

OPPT = Instituto de Prevenção à Poluição e Tóxicos

NADH = nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

EC = Enzyme Commission

IUB = União Internacional de Bioquímica

PDA = Ágar Potato Dextrose

J = Constante de Acoplamento

Hz = Hertz

MHz = Mega Hertz

KBr = Brometo de potássio

CDCl_3 = Clorofórmio deuterado

TMS = Tetrametilsilano

kPa = Quilo Pascal

Log P = logarítimo do coeficiente de partição (água/1-octanol)

Log Kow = logarítimo do coeficiente de partição (1-octanol/água)

m = multiplete

s = singleto

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Aplicações da biocatálise nas indústrias: farmacêutica, alimentícia e química fina.	21
Tabela 2. Microrganismos isolados da cana-de-açúcar.	40
Tabela 3. Cetonas, aldeídos, catalisadores, rendimentos (%) e solventes utilizados nas reações de Mannich biocatalisadas por quimosina (0,10g).	49
Tabela 4. Reações de Mannich biocatalisadas por quimosina (0,20g e 0,30g) envolvendo ciclohexanona e formaldeído.	52
Tabela 5. Reações de Mannich biocatalisadas por quimosina à 0,50g envolvendo ciclohexanona e anilina.	54
Tabela 6. Reações de Mannich biocatalisadas por quimosina com a utilização de aminas substituídas, ciclohexanona e formaldeído.	57
Tabela 7. Reações de Mannich biocatalisadas por lipase e Lipozyme® com a utilização de ciclohexanona e formaldeído.	61
Tabela 8. Comparação entre os rendimentos apresentados pelas enzimas em diversos solventes.	63
Tabela 9. Reações de Mannich biocatalisadas por leveduras com a utilização de ciclohexanona, formaldeído e anilina.	64
Tabela 10. Reações de Mannich biocatalisadas por bactérias com a utilização de ciclohexanona, formaldeído e anilina.	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Compostos bioativos contendo nitrogênio.	15
Figura 2. Mecanismo geral das reações de Mannich.	16
Figura 3. Utilização da prolina na reação de Mannich.	17
Figura 4. Estrutura química da <i>L</i> -prolina.	17
Figura 5. (A) Estrutura química da elaeocarpina, (B) estrutura química da licopodina, (C) estrutura química de cocaína.	19
Figura 6. Enantiômeros da talidomida. O enantiômero (R) possui efeito sedativo e hipnótico, enquanto o seu isômero (S) é teratogênico.	22
Figura 7. Fonte de biocatalisadores naturais mais utilizados.	28
Figura 8. Resolução enzimática do éster metil-3-(4 metoxifenilglicidato).	36
Figura 9. Descrição geral para as reações de Mannich biocatalisadas.	43
Figura 10. Etapas operacionais para a realização de uma reação biocalizada com microrganismo.	44
Figura 11. Mecanismo reacional para as reações de Mannich utilizando biocatalisadores (enzimas).	51
Figura 12. Efeito da quantidade do biocatalisador frente à quantidade de conversão do produto.	53
Figura 13. Estrutura tridimensional da quimosina bovina.	56
Figura 14. Descrição do pKa referente à anilina, <i>p</i> -toluidina, <i>p</i> -anisidina e <i>p</i> -nitroalínina.	59

RESUMO

A reação de Mannich é uma das reações mais utilizadas em química orgânica, sendo também um dos primeiros exemplos de uma reação multicomponente descrita na literatura. Esta reação resulta em compostos β -aminocarbonilados e estes permitem a geração de diversas estruturas que podem ser utilizadas na síntese de moléculas biologicamente ativas e de produtos naturais, porém poucas são as rotas sintéticas que resultam na formação do composto β aminocarbonilado. Nesse sentido novas metodologias têm sido desenvolvidas envolvendo novos catalisadores ou auxiliares quirais na síntese de compostos β -aminocarbonilados com atividade biológica. Uma dessas metodologias é a biocatálise sendo esta uma técnica que utiliza catalisadores biológicos, sejam enzimas ou microrganismos, para converter um substrato em um número limitado de etapas enzimáticas. O emprego de microrganismos, vegetais ou enzimas isoladas como catalisadores quirais proporcionou um avanço significativo para a química sintética, pois é sabido que os biocatalisadores possuem sítios catalíticos seletivos, os quais favorecem a formação de produtos enantiomericamente puros e isso é de extrema importância, pois sabe-se que as diferenças de quiralidade podem ter efeitos espetaculares ou trágicos nos seres humanos. No tocante à questão ambiental, a biocatálise está inserida no contexto de uma nova filosofia denominada Química Verde. Porém, no Estado de Mato Grosso do Sul as pesquisas que envolvem essa temática de biocatálise ainda é bastante incipiente visto que até o ano de 2010 havia apenas um grupo de pesquisa cadastrado na *Plataforma Lattes* voltado a este tema no Estado. Por conta da necessidade de apoio a pesquisas voltadas a este tema no Estado de Mato Grosso do Sul e para avaliar o potencial biocatalítico de diferentes linhagens de microrganismos e enzimas na síntese de compostos β -aminocetônicos via reação de Mannich foi proposto a utilização de algumas enzimas tais como: lipase, Lipozyme® e quimosina e também de alguns microrganismos: *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de padaria), cepas de *Saccharomyces* isoladas da cana-de-açúcar, *Xanthomonas spp* e *Lactobacillus acidophilus*. As reações foram mantidas sob agitação à temperatura ambiente entre 24 a 48 horas naquelas que utilizaram-se enzimas como catalisador e por 7 dias nas que utilizaram microrganismos. Todas as reações foram monitoradas por cromatografia de camada delgada O bruto de reação foi purificado em coluna de sílica gel (70-230 Mesh) e os compostos obtidos foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho, cromatografia gasosa e por ressonância magnética nuclear. Nas reações biocatalisadas por enzimas todas apresentaram potencial biocatalítico, porém a concentração das mesmas, a basicidade da amina e o meio reacional interferem no rendimento da reação. As três enzimas apresentaram uma maior afinidade por solventes tanto pouco polar (THF) como muito polar (DMSO). Nas reações onde utilizou-se os microrganismos os dados obtidos corroboraram os valores anteriormente obtidos nas reações envolvendo as enzimas, pois nestas os compostos também foram obtidos em meio de THF. Contudo propôs-se à introdução de novos biocatalisadores de baixo custo e ambientalmente seguros nas reações de Mannich.

Palavras-chaves: Mannich, biocatalisadores, biocatálise.

ABSTRACT

The Mannich reaction is one of the most widely used reactions in organic chemistry, and also one of the first examples of a multicomponent reaction already described on the literature. This reaction results in β aminocarbonylated compounds which allow the generation of several structures that can be used in the synthesis of both biologically active molecules, and natural products, however, just a few synthetic routes resulting in the formation of β aminocarbonylated compound are known. In this sense, new methodologies have been developed by involving new catalysts or chiral auxiliaries in the synthesis of β -aminocarbonylated compounds with biological activity. One of these methodologies is the biocatalysis, which is a technique that uses biological catalysts, like enzymes or micro-organisms to convert a substrate in a limited number of enzymatic steps. The use of micro-organisms, plants or isolated enzymes as chiral catalysts has proportioned a significant advance in the synthetic chemistry, because it is known that the biocatalysts have selective catalytic sites that afford the formation of enantiomerically pure products and which is extremely important, because it is known that differences of the chirality may have tragic or spectacular effects in humans. Concerning to the environmental issue, the biocatalysis is placed within the context of a new philosophy called Green Chemistry. However, in the State of Mato Grosso do Sul the researches involving this issue of biocatalysis are still incipient once that by the year of 2010 there was only one research group focused on this theme registered in the Lattes Platform in the State. Because of the need of support to the researches focused on this issue in the State of Mato Grosso do Sul and to evaluate the biocatalytic potential of different lineage of microorganisms and enzymes in the synthesis of compounds β aminoketonic through Mannich reaction it was proposed the use of some enzymes such as: lipase, Lipozyme® and chymosin and some microorganisms: *Saccharomyces cerevisiae* (bakers yeast), *Saccharomyces* isolated strains from sugar cane, *Xanthomonas spp* and *Lactobacillus acidophilus*. The reactions were kept under stirring at room temperature from 24 to 48 hours in those which the enzymes were used like catalysts and for 7 days in that ones where the microorganisms were used as catalysts. All the reactions were monitored by thin layer chromatography. The crude of the reaction was purified on a silica gel column (70-230 mesh) and the obtained compounds were characterized by infrared spectroscopy, gas chromatography and nuclear magnetic resonance. All the reactions biocatalyzed by enzymes showed biocatalytic potential, but their concentration, the basicity of the amine and the reaction medium interfered in the reaction yield. The both three enzymes presented a higher affinity as for the less polar solvents (THF) as for the higher polar solvents (DMSO). In reactions in which the microorganisms were used the obtained data corroborate with the previously obtained values in the reactions involving the enzymes, because in these ones, the compounds were obtained also in THF medium. However it was proposed the introduction of new low cost biocatalysts and environmentally safe on Mannich reactions.

Key words: Mannich, biocatalysts, Biocatalysis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. REAÇÃO DE MANNICH	01
1.1.1 Compostos β -aminocetônicos	04
1.2 BIOCATÁLISE	05
1.2.1 Química Verde	09
1.2.2 Biocatalisadores	12
1.3 MICRORGANISMO EM SÍNTESE ORGÂNICA	15
1.3.1 Leveduras	16
1.4 VEGETAIS EM SÍNTESE ORGÂNICA	17
1.5 ENZIMAS EM SÍNTESE ORGÂNICA	18
1.5.1 Lipases	20
1.5.2 Quimosina	23
1.6 HISTÓRICO NO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL	24
2. OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3. MATERIAIS	27
3.1 ENZIMAS	27
3.2 MICRORGANISMOS	27
3.3 REAGENTES E SOLVENTES	28
3.4 EQUIPAMENTOS	28
4. MÉTODOS	29
4.1 METODOLOGIA UTILIZADA – MICRORGANISMOS	29

4.2 PREPARO DO INÓCULO	29
4.3 PREPARO DO MEIO DE CRESCIMENTO PARA OBTENÇÃO DE MASSA CELULAR	29
4.4 DETERMINAÇÃO DA MASSA CELULAR	30
4.5 SÍNTESE DOS COMPOSTOS β -AMINOCETÔNICOS	30
4.6 BIOSÍNTESE GERAL DOS COMPOSTOS β -AMINOCETÔNICOS	31
4.7 SÍNTESE CLÁSSICA (QUÍMICA) DOS COMPOSTOS β -AMINOCETÔNICOS.....	32
4.8 SÍNTESE DO COMPOSTO 2-[(N-FENILAMINO)METIL]CICLOHEXANONA	32
4.9 SÍNTESE DO COMPOSTO 2-[(FENIL)-(FENILAMINO)-METIL]-CICLOHEXANONA	33
4.10 SÍNTESE DO COMPOSTO 2-[(4'-METIL-FENILAMINO)-METIL]-CICLOHEXANONA	33
4.11 SÍNTESE DO COMPOSTO 2-[(4'-METÓXI-FENILAMINO)-METIL]-CICLOHEXANONA	34
5. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS OBTIDOS	34
5.1 MEDIDAS NO INFRAVERMELHO	35
5.2 MEDIDAS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	35
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6.1 TESTES REACIONAIS ENVOLVENDO A QUIMOSINA	36
6.2 OTIMIZAÇÃO DA QUANTIDADE DE QUIMOSINA NO PROCESSO REACIONAL	39

6.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS COM QUIMOSINA À 50%	40
6.4 REAÇÕES COM LIPASE E LIPOZYME®	48
6.5 REAÇÕES COM FUNGOS	50
6.6 REAÇÕES COM BACTÉRIAS	54
7. CONCLUSÕES	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
9. MEMORIAL DAS ATIVIDADES	69
9.1 TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS	69
9.2 CRÉDITOS EXIGIDOS PELO PROGRAMA	70
9.3 CRÉDITOS CUMPRIDOS	70
10. ANEXOS	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 REAÇÃO DE MANNICH

A reação de Mannich é uma das reações mais utilizadas em química orgânica, sendo também um dos primeiros exemplos de uma reação multicomponente descrita na literatura. Esta reação tem sido utilizada na síntese de moléculas biologicamente ativas e produtos naturais. Em particular a reação de Mannich permite a geração de diversas estruturas, que constitui blocos para a síntese de importantes fármacos utilizados na química medicinal (JUARISTI, 1997; CHENG *et al.*, 2001, ROSENBLUM *et al.*, 1998; AREND *et al.*, 1998). É umas das mais importantes reações para a formação da ligação carbono-carbono e para a síntese de moléculas contendo nitrogênio (TROST; TERRELL, 2003, JHILLU *et al.*, 2008).

A cada dia aumenta a necessidade de medicamentos e produtos naturais contendo nitrogênio visto que os mesmos são de grande interesse para a indústria farmacêutica devido a seu potencial como antibióticos sintéticos e antitumorais (CHOUDHURY; PARVIN, 2011). Exemplos desses compostos estão dispostos na Figura 1 sendo: o tramadol (analgésico), o osnervan (antiparkinson), o moban (neuroléptico), o falicain (anestésico) e o Be-2254 (antihipertensivo).

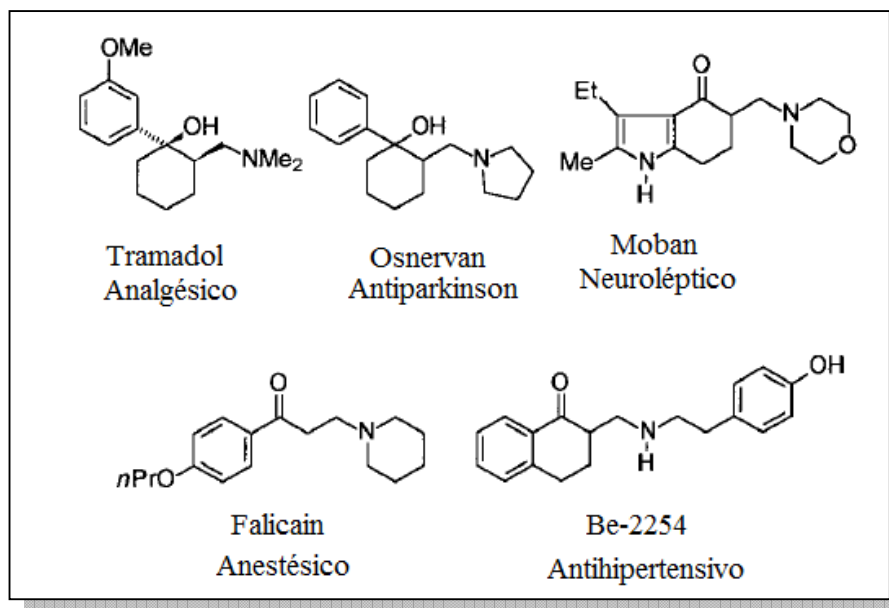


Figura 1. Compostos bioativos contendo nitrogênio (ARENDE *et al.*, 1998).

Nas reações de Mannich há a inserção de um grupo aminometila na posição alfa da cetona ou aldeído resultando, assim, nos compostos denominados Bases de Mannich. Muitas vezes esta reação é executada adicionando simultaneamente três componentes: uma cetona, um aldeído e uma amina, ocorrendo geralmente a condensação concomitante desses três componentes tornando essas reações de Mannich muito atrativas sinteticamente (SILVA, 2007). Este fato é de suma importância, pois possibilita uma maior economia de átomos e torna este procedimento ambientalmente correto.

De maneira geral a reação de Mannich ocorre a partir da enolização da cetona. O enol ataca nucleofílicamente o íon imínio, formado após a condensação da amina com o aldeído para formação do composto β -aminocetônico (Figura 2). No entanto, poucas são as rotas sintéticas que resultam em α aminometilação estereosseletiva.

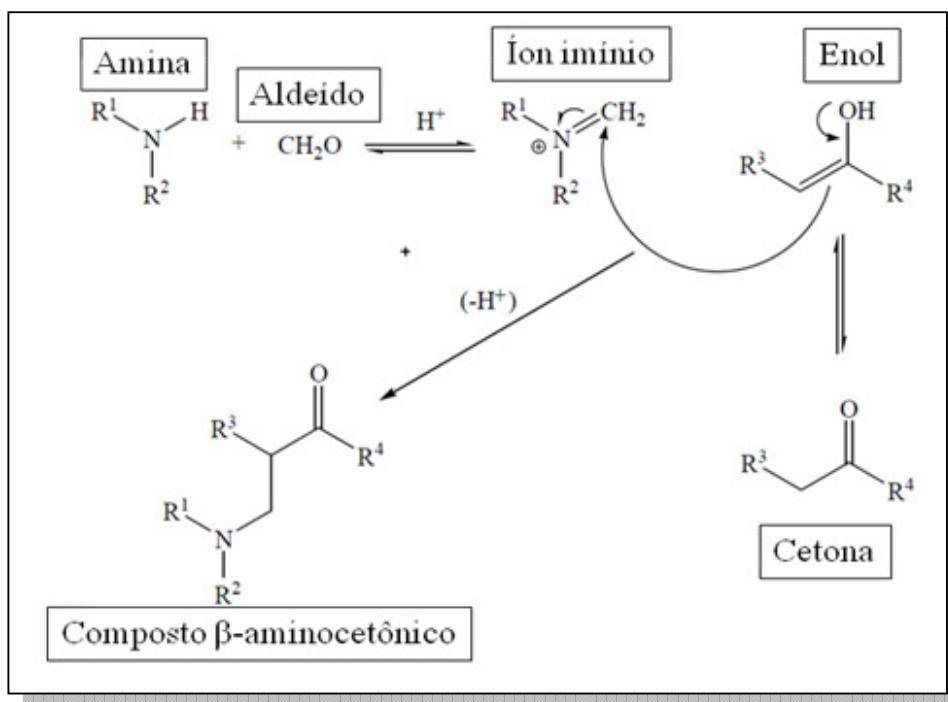


Figura 2. Mecanismo geral das reações de Mannich.

Recentemente, List (2007) empregou para esse fim a prolina e obteve enantiosseletividade acima de 99% (Figura 3).

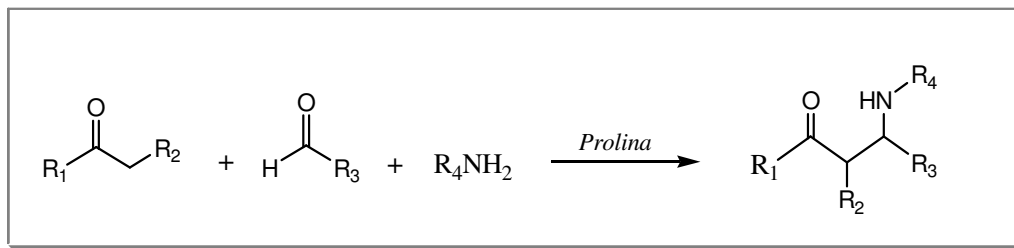


Figura 3. Utilização da prolina na reação de Mannich.

Entre os catalisadores mais utilizados nessas reações destaca-se a *L*-prolina devido sua eficácia e por proporcionar altos rendimentos. A prolina (Figura 4) é um aminoácido natural, comercializada com o centro assimétrico definido (quiralidade). Entretanto, a forma *L* é normalmente utilizada em uma grande variedade de reações que podem ser catalisadas através deste simples aminoácido.

Cabe neste ponto ressaltar que poucos são os tipos de catalisadores orgânicos empregados nas reações de Mannich, sendo a prolina o organocatalisador mais utilizado. Isto porque se trata de uma molécula de baixo peso molecular que catalisa algumas reações orgânicas, sem necessitar da presença de qualquer aditivo (ALEXAKIS, 1974).

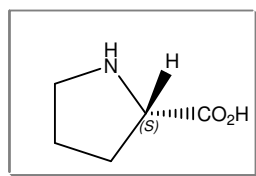


Figura 4. Estrutura química da *L*-prolina.

Os primeiros relatos de uma transformação enantiosseletiva baseada nesse conceito foram descritos nos anos 70, em trabalhos independentes, por Hajos e Parrish (1974). Esses autores descreveram o uso da *L*-prolina como catalisador na reação de anelação de Robinson. Apesar dos bons resultados obtidos, tanto em rendimento quanto em excesso enantiomérico, essa transformação ficou esquecida na literatura por 30 anos.

Esse esquecimento talvez seja devido ao grande interesse despertado, no início dos anos 80, pelas reações catalisadas por metais. No início dos anos 2000 a utilização da *L*-prolina como catalisador foi revisada por List *et al.* (2000) que, baseados em estudos realizados na década de 90 sobre a atuação de aldolases e anticorpos na

biossíntese de carboidratos, relataram os primeiros exemplos de produtos de adição aldólica provenientes de uma reação intermolecular catalisada pela *L*-prolina. A partir deste marco, vários grupos de pesquisa dedicaram mais atenção a essa estratégia de catálise e nos últimos anos, novos catalisadores, que atuam de diversas maneiras e em diferentes reações vem sendo desenvolvidos.

Mas há algumas desvantagens neste tipo de reação, como por exemplo, o tempo de reação. Apesar disso, novas metodologias têm sido desenvolvidas envolvendo novos catalisadores ou auxiliares quirais na síntese de compostos β -aminocarbonilados com atividade biológica.

Muitos complexos metálicos têm sido utilizados como catalisadores atuando como ácidos de Lewis promovendo a reação sob condições anidras.

Alguns ácidos solúveis em água também apresentaram eficiência catalítica neste tipo de reação (RAI, 2010). No entanto, esses catalisadores apresentam algumas desvantagens, como a exigência de uma grande quantidade de ácido (geralmente mais de 10% mol) e o longo tempo de reação (RAI, 2010).

Outras limitações que estão associadas a esse tipo de reação é a formação de produtos indesejáveis, bem como o baixo rendimento e, em alguns casos, a necessidade de condições drásticas de temperatura e pressão, o que faz com que esse tipo de reação seja agressiva ao meio ambiente (VERKADE, 2008).

Em virtude disso, nos últimos anos muitos têm sido os esforços para o emprego dessa reação de forma ambientalmente correta, buscando uma melhor economia atômica e empregando cetonas não modificadas (RAI, 2010). Contudo, as reações de Mannich são importantes porque os produtos apresentam aplicações biológicas, como antibióticos sintéticos, permitindo a geração de diversas estruturas.

1.1.1 Compostos β -aminocetônicos

Os compostos β -aminocetônicos que podem ser sintetizados via reação de Mannich apresentam grande relevância, pois constituem unidades estruturais para uma série de importantes fármacos como drogas do tipo antineoplásicas, analgésicos e antibióticos, diuréticos ou como antidepressivos. Também são utilizadas como precursores de γ aminoalcoóis, α , β insaturados, β -lactamas (WEINHEIM, 1960).

Sistemas β -aminocetônicos são amplamente encontrados na natureza especialmente como alcalóides nas quais as estruturas estão geralmente relacionadas com acentuadas atividades biológicas como: elaeocarpina (Figura 5A), a lycopodina (Figura 5B) e a cocaína (Figura 5C).

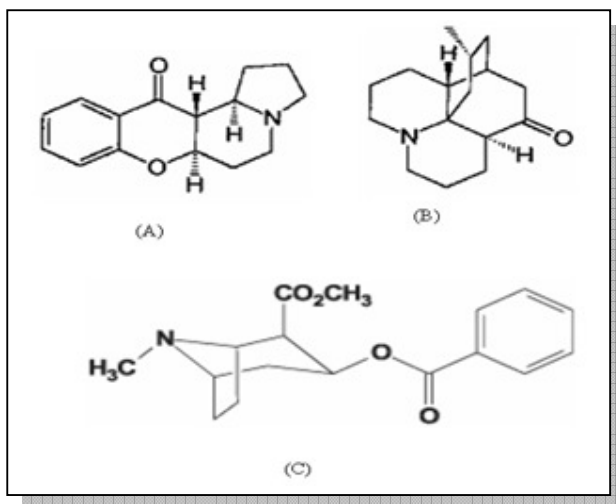


Figura 5. (A) Estrutura química da elaeocarpina, (B) estrutura química da lycopodina, (C) estrutura química de cocaína.

1.2 BIOCATÁLISE

Biocatálise é a técnica que utiliza catalisadores biológicos, sejam enzimas ou microrganismos, para converter um substrato.

Esta técnica vem ganhando atenção decorrente de alguns fatores como:

- Transformações químicas tradicionais empregam solventes e até mesmo alguns reagentes nocivos ao meio ambiente;
- A biocatálise promove produtos com alto grau de quimio-, regio- e estereosseletividade em condições reacionais muito brandas;
- Reações biocatalisadas são aceleradas na ordem de $10^8 - 10^9$ do que as mesmas reações catalisadas quimicamente;
- Os catalisadores empregados em biotransformações são biodegradáveis,
- Auxiliam na redução dos custo de produção,

- Tecnologia importante para a síntese de compostos químicos quirais com alto valor agregado (COMASSETO *et al.*, 2004).

Demain (2000) relata que a biocatálise avançou de forma significativa durante a Primeira Guerra Mundial, o que foi um expressivo salto em termos econômicos, aumentando conseqüentemente a atenção dos pesquisadores à referida área. Na Inglaterra, o químico Chaim Weizmann em 1919, que posteriormente se tornou o primeiro presidente do Estado de Israel, desenvolveu a fermentação acetona-butanol e na Alemanha, a fermentação do glicerol foi formulada por Neuberg em 1941. Ambos, acetona e glicerol foram necessários para a fabricação de munições para apoiar os esforços de guerra das respectivas nações em conflito. Tais eventos foram acompanhados, após a guerra, pelo desenvolvimento da fermentação, bioconversão e processos enzimáticos rendendo muitos produtos úteis com grandes expectativas de mercado. Além disso, promoveu o desenvolvimento de reagentes e processos ambientalmente compatíveis (WITTCOFF, 1996).

Wang e Dai (2010) relatam que os benefícios destes processos incluem:

- Redução da poluição ambiental por produtos e processos industriais;
- Possibilidade de redução da dependência sobre os combustíveis não-renováveis e outros recursos;
- Produção sustentável de produtos existentes e novos.

A biocatálise opera, portanto, em nível molecular, onde as barreiras estabelecidas na formação das espécies desaparecem. Isto porque todos os seres vivos possuem o DNA como molécula fundamental, portadora da informação genética, o qual codifica e determina as proteínas dos animais, das plantas e microrganismos. Esse código simplesmente transforma a seqüência dos nucleotídeos do DNA (adenina, citosina, guanina ou timina) em seqüência de aminoácidos que constituem as proteínas. Cada proteína é derivada, portanto, da transcrição e tradução de um gene.

Atualmente, a biocatálise é utilizada para produzir uma variedade de produtos para a indústria (Tabela 1).

Tabela 1. Aplicações da biocatálise nas indústrias: farmacêutica, alimentícia e química fina.

Item	Produto	Microrganismo	Enzima	Companhia
Farmacêuticos e Intermediários	(S)-2- Ácido cloropropiônico	<i>Pseudomonas sp.</i>	Desalogenase	Avecia
	L-DOPA	<i>Erwinia herbícola</i>	Tirosina fenol liase	Ajinomoto
	Ácido L-pipecólico	<i>Escherichia coli recombinante</i>	Lisina aminotransferase (de <i>Flavobacterium lutescens</i>) Pirrolidina-5-carboxilato redutase (de <i>E.coli</i>)	Mercian
	Hidroxi prolina	<i>Escherichia coli recombinante</i>	Prolina hidroxilase (de <i>Kyowa Hakko Streptomyces sp</i>)	Kyowa Hakko
	Álcoois quirais	<i>Escherichia coli recombinante</i>	Oxidoredutases (de vários microrganismos)	Kaneka
	(S)-piperazina-2-ácido carboxílico	<i>Klebsiella Terrigena</i>	Amidase	Lonza
	Pravastatina de sódio	<i>Streptomyces carbophilus</i>	Citocromo P-450	Sankyo
Vitaminas	Pantotenato	<i>Fusarium oxysporum</i>	Lactonase	Daiichi Fine Chemical
	Nicotinamida	<i>Rhodococcus rhodochrous J1</i>	Nitrila hidratase	Lonza
Aminoácidos	L-aminoácidos	<i>E. coli recombinante</i>	L-hidantoinase e carbamoilase	Degusa
Flavorizantes	5'-GMP	<i>E. coli recombinante</i>	XMP aminase (GMP sintase de <i>E. coli</i>) e AP/Ptase (de <i>E. blattae</i>)	Kyowa Hakko e Ajinomoto
	5'-IMP	<i>E. coli recombinante</i>	Guanosina/inosina quinase (de <i>E. coli</i>) AP/Ptase (de <i>E. blattae</i>)	Kyowa Hakko e Ajinomoto
Insentidas	Ácido 6-hidróxi-nicotínico	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Niacina hidroxilase	Lonza

5'-IMP: inosina-5' -monofosfato; 5'-GMP: guanosina-5' -monofosfato, AP/Ptase: fosfatase ácida/fosfotransferase.

Fonte (a) STRAATHOF, A. J.; PANKE, S.; SCHMID, A. *Curr. Opin. Biotech.* 2002, 13, 548-556, **(b)** CARR, R.; ALEXEEVA, M.; TURNER, N. *J. Org. Biomol. Chem.* 2003, 1, 4133-4137.

É possível notar que a biocatálise tem abrangido diversos setores industriais, porém o setor farmacêutico é o que mais tem utilizado técnicas biocatalíticas na síntese de seus produtos (YAZBECK *et al.*, 2004). Contudo, é sabido que neste setor a obtenção de compostos enantiomericamente puros é de grande interesse (FABER; PATEL, 2000; TEMBA *et al.*, 2003).

Em 1987 a FDA (Food and Drug Administration) levantou questionamentos acerca dos medicamentos ora liberados destacando a questão dos estereoisômeros (RODRIGUES, 2004). Em 1992 finalmente foi estipulado que a ação de cada produto farmacêutico deveria ser caracterizado individualmente. Este regulamento forçou as grandes empresas do ramo farmacêutico a investir fortemente na pesquisa de novos processos bioquímicos que resultasse em compostos enantiomericamente puros

(RODRIGUES, 2004), pois sabe-se que as diferenças de quiralidade podem ter efeitos distintos nos seres humanos. Um dos exemplos mais emblemáticos da literatura é a talidomida, droga usada inicialmente em 1958 e retirada do comércio em 1965, a qual era utilizada para aliviar a náusea matinal das mulheres grávidas. Em 1965 descobriu-se que a talidomida era a causa de terríveis defeitos congênitos em muitas crianças nascidas após o uso do fármaco por suas mães (CHAMPE *et al.*, 2006).

Mais tarde começaram a aparecer evidências que um dos enantiômeros tinha efeito de causar a náusea matinal, enquanto que o outro, também presente no fármaco comercial (e em quantidades iguais ao da primeira), podia ter relação com os efeitos congênitos. A evidência em relação aos efeitos dos enantiômeros se converte no outro (Figura 6).

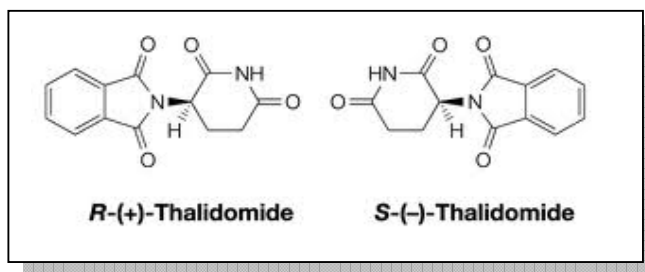


Figura 6. Enantiômeros da talidomida. O enantiômero (R) possui efeito sedativo e hipnótico, enquanto o seu isômero (S) é teratogênico.

Mas, a partir da década de 70 a síntese assimétrica destacou-se como um método de obtenção de compostos enantiomericamente puros, em substituição de racematos (mistura formada por iguais quantidades dos enantiômeros). Tornando-se uma das mais importantes áreas da síntese orgânica contemporânea (TRAMPER, 1996). Metodologias simplificadas para a preparação dessas moléculas em sua forma enantiomericamente pura são de grande interesse, pois a partir delas, moléculas mais complexas e de alto valor comercial podem ser obtidas (FABER, 1997).

Desde então, o preparo de fármacos e moléculas precursoras com alta pureza enantiomérica tem contribuído para o crescente desenvolvimento de novos processos, especialmente aqueles que se utilizam da biocatálise e de metodologias ambientalmente corretas (FABER; PATEL, 2000).

O potencial da biocatálise na síntese de produtos químicos é evidente e exemplos de diversos processos industriais operacionais, por exemplo, na BASF

Ludwigshafen, Alemanha, a DSM (Geleen, Holanda), e Lonza (Visp, Suíça). Essas indústrias utilizam enzimas para a produção de compostos de alto custo que não podem ser produzidos por abordagens químicas (TRAMPER, 1996).

O interesse pela biocatálise deve-se principalmente a algumas vantagens, tais como a baixa toxicidade dos produtos químicos empregados, a simplicidade operacional e o baixo custo da maioria dos catalisadores de origem natural ou sintética. Além disso, os produtos oriundos de reações catalisadas por compostos orgânicos, não apresentam contaminação por metal ou outros aditivos, o que desperta o interesse da indústria farmacêutica, que por sua vez não tolera a contaminação por metais de transição no produto final.

No tocante à questão ambiental, a biocatálise está inserida no contexto de uma nova filosofia denominada Química Verde. Esta pode ser definida como a utilização de técnicas químicas e metodologias que reduzam ou eliminem o uso de solventes, reagentes ou a geração de produtos e subprodutos que são nocivos à saúde humana ou aos ambientes (SHELDON *et al.*, 2007; SHELDON, 1993).

1.2.1 Química verde

Há 21 anos, após a criação da lei de Prevenção à Poluição nos Estados Unidos, a EPA (Agência de Proteção Ambiental, Environmental Protection Agency), através do Instituto de Prevenção à Poluição e Tóxicos (OPPT) lançou o programa de “Rotas Sintéticas Alternativas para Prevenção de Poluição” para financiar projetos que visassem à prevenção de poluição em suas sínteses fabricando produtos através de processos ambientalmente corretos. Em 1993 o programa é renomeado como Química Verde (FARIAS; FÁVARO, 2011).

Desde então o termo Química Verde (Green Chemistry) é usado em todo o mundo para descrever o desenvolvimento ecologicamente correto e sustentável de produtos e processos químicos e tem sido definido como (CLARK, 2002):

“A utilização de um conjunto de princípios que reduz ou elimina o uso ou a geração de resíduos ou substâncias perigosas na concepção, fabricação ou aplicação de produtos químicos” (ANASTAS, 2000).

A partir daí foram criados alguns princípios básicos englobando muitos dos conceitos levantados por movimentos anteriores sendo chamado de 12 Princípios de Química Verde (ANASTAS, 2000):

- 1) Prevenção: A prevenção de resíduos é melhor que o tratamento posterior;
- 2) Eficiência atômica: A síntese química deve maximizar a incorporação de todos os átomos dos reagentes no produto final desejado;
- 3) Síntese com reagentes de menor toxicidade: A síntese química ideal sempre que possível deve utilizar e gerar substâncias que não sejam perigosas para a saúde humana e para o meio ambiente;
- 4) Desenvolvimento de compostos seguros: Os produtos químicos devem ser projetados para preservar a eficácia da sua função e serem atóxicos;
- 5) Catálise: Reagentes catalíticos (tão seletivos quanto possível) são superiores aos reagentes estequiométricos;
- 6) Redução de solvente e auxiliares: A utilização de auxiliares (solventes, agentes de separação etc) deve ser minimizada ou usadas substâncias inócuas no processo;
- 7) Eficiência energética: A demanda de energia deve ser minimizada através de métodos sintéticos que utilizem temperatura e pressão ambiente, diminuindo o impacto econômico e ambiental;
- 8) Uso de matéria-prima renovável: Sempre que possível técnica e economicamente utilizar matérias-primas cada vez mais renováveis;
- 9) Redução no uso de derivados: Derivações devem ser minimizadas, pois processos que utilizam reagentes bloqueados, de proteção ou desproteção, e modificadores temporários requerem reagentes adicionais e, conseqüentemente, podem produzir subprodutos indesejáveis.
- 10) Desenvolvimento de compostos degradáveis: Produtos químicos devem degradar em inócuo produtos tóxicos não permanecendo no meio ambiente;
- 11) Análise em tempo real para prevenção da poluição: Processos químicos exigem um melhor controle por meio do desenvolvimento de

metodologias analíticas, permitindo assim o monitoramento em tempo real, para controle da formação de compostos indesejáveis;

- 12) Química segura para prevenção de acidentes: As substâncias e a forma com que uma substância é usada em um processo químico deve ser escolhido de forma que assegure um potencial mínimo para acidentes incluindo vazamentos, explosões e incêndios.

Sabe-se, porém, que a química, e principalmente a química orgânica é responsável por uma grande parcela da contaminação ambiental atual. Fica, portanto, evidente que o químico deve procurar empregar cada vez mais esta filosofia em seu cotidiano para produzir o composto de seu interesse sem agravar mais o processo de contaminação já existente no planeta.

A Química Verde aborda o impacto ambiental produzidos tanto pelos produtos químicos quanto pelos processos (SHELDON *et al.*, 2007). No contexto moderno, os termos “desenvolvimento sustentável” e “química verde” têm sido questionados. Esta divergência com relação aos termos começou em 1987 na Comissão das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento, (geralmente referidos como Comissão Bruntland) a qual observou que a coesão econômica de desenvolvimento pode levar a uma deterioração, e não a uma melhoria na qualidade de vida das pessoas, o que conduziu a definição atualmente aceita como “Desenvolvimento Sustentável”.

Tal definição diz que este “desenvolvimento deve satisfazer as necessidades do presente sem comprometer a capacidade das futuras gerações satisfazerem suas próprias necessidades” (HANDBOOK, 2002). Todavia ressalta que é naturalmente impossível criar produtos químicos sintéticos sem insumos químicos. Porém, a química verde indica que há muitos caminhos possíveis a partir de materiais alternativos para a síntese de produtos (HANDBOOK, 2002).

Contudo, até o presente momento poucos foram os esforços feitos para limitar o uso de solventes orgânicos e substituí-los por novos meios mais “verdes” ou até mesmo eliminá-los completamente (condições livres de solvente). Novos tratados internacionais como o Protocolo de Montreal estão começando a aumentar a pressão para minimizar o uso de solventes e nesse ínterim as indústrias estão interessadas em alternativas economicamente viáveis (GREEN, 2005).

1.2.2 Biocatalisadores

Catalisadores são substâncias que aumentam a velocidade de uma reação química, reduzindo seus requisitos energéticos. Os catalisadores promovem um caminho com menor energia de ativação, e ainda são recuperados no final do processo (CHAMPE *et al.*, 2006).

O emprego de microrganismos, vegetais ou enzimas isoladas como catalisadores quirais proporcionou um avanço significativo para a química sintética, pois é sabido que os biocatalisadores possuem sítios catalíticos seletivos, os quais favorecem a formação de produtos enantiomericamente puros. Tal processo se dá através da característica que estes possuem *e.g.* a alta especificidade de seus sítios com o substrato trazendo assim uma alta eficiência de reação. Os biocatalisadores permitem a biotransformação de compostos polifuncionalizados e sensíveis (OLIVEIRA; MONTOVANI, 2009).

Ishige e Shimizu (2005) ressaltam que uma das vantagens da utilização de biocatalisadores é que as reações que os envolvem são realizadas em condições reacionais brandas.

Wang e Day (2010) também destacam que a estereosseletividade do biocatalisador faz com que a biotecnologia industrial tenha uma aplicação generalizada no potencial químico sintético. O biocatalisador trabalha em condições ambientais amenas, o que inclui até mesmo soluções aquosas e temperatura ambiente, fazendo com que a biotecnologia industrial seja uma estratégia ambientalmente agradável em relação à indústria química tradicional

Diferentes enzimas e microrganismos são capazes de realizar transformações de vários substratos em produtos dificilmente obtidos por rotas químicas ou ainda atuar em reações nas quais não existem alternativas químicas viáveis (OLIVEIRA; MONTOVANI, 2009).

Atualmente muitos são os sistemas de biocatalisadores disponíveis capazes de catalisar uma ampla variedade de reações orgânicas (DURÁN *et al.*, 2000). Devido à alta régio- e estereosseletividade muitos biocatalisadores vêm sendo utilizados até mesmo para a síntese de compostos que possam atuar com potencial anticancerígeno (FENG *et al.*, 2010).

Labes e Wandhausen (2008) afirmam que diversos fatores devem ser levados em conta na escolha do biocatalisador (enzimas isoladas, células inteiras, organelas etc). Por exemplo, se o produto desejado é convertido através de uma seqüência enzimática e não da atuação de uma única enzima, é conveniente utilizar um microrganismo que possua essa seqüência em seu metabolismo (ex. Produção de etanol via fermentação de glicose por *Saccharomyces cerevisiae*), pois a presença de várias enzimas colocadas para reagir de forma aleatória pode resultar em reações laterais que dificultam a separação do produto desejado.

Nesse sentido, Di Conti *et al.* (2001) afirmam que novas tecnologias de biologia molecular, metodologias de seleção de biocatalisadores e novas abordagens estão sendo desenvolvidas a fim de se obter catalisadores com suas especificidades alteradas bem como a exploração da biodiversidade.

O biocatalisador pode também ser utilizado na forma livre ou usa-se a técnica de imobilização (WENDHAUSEN, 1998, 2005), uma vez que o suporte cria um micro ambiente protetor ao redor das células. Pode-se aumentar a concentração celular aerando o meio de crescimento. Ishikara (2003) também ressalta o as vantagens da utilização de células imobilizadas:

- As células se tornam resistentes a danos como cisalhamento;
- Células imobilizadas podem ser utilizadas várias vezes durante um período de tempo prolongado;
- As concentrações de biomassa são possíveis, possibilitando altas conversões de substrato;
- O método facilita a recuperação da massa celular e produtos;
- Tratamentos químicos seqüenciais são possíveis.

Muitos processos biocatalíticos têm obtido maturidade em nível industrial como, por exemplo, a produção de gama lactonas as quais são usadas como flavorizante de frutas (aroma de pêsego). Este processo tem como reagente de partida o óleo de castor que é um éster do ácido ricinoleico. Cheethan (1995) descobriu uma espécie de levedura (*Candida petrofilium* ATCC202226) capaz de hidrolisar o óleo de castor a ácido graxo.

O emprego de catalisadores biológicos em sínteses químicas é evidente devido ao grande número de catalisadores biológicos e pela variedade de processos industriais que utilizam os mesmos. Tais processos vão desde a fabricação de produtos químicos

como acrilamida, frutose, ácidos málico e aspártico até a síntese de medicamentos aplicando-se comercialmente em grande escala na indústria farmacêutica para a produção de compostos de alto custo (ZAKS, 2001).

Essa expansão pode ser atribuída aos recentes progressos na área de biologia molecular. De fato, a evolução *in vitro* ou evolução dirigida e as tecnologias de engenharia metabólica levaram a produção de muitos biocatalisadores (ZAKS, 2001). A importância do uso de biocatalisadores para produção industrial de moléculas biologicamente ativas deve-se fundamentalmente a sua quiralidade intrínseca (ABARZÚA *et al.*, 2008). O aproveitamento desta vantagem inigualável depende, todavia, de condições que viabilizem o uso do biocatalisador com custos moderados e melhores rendimentos (ABARZÚA *et al.*, 2008).

As técnicas utilizadas para se alcançar melhores resultados de rendimentos variam de acordo com a reação catalisada (ABARZÚA *et al.*, 2008). Como resultado do desenvolvimento dessas técnicas, o campo da biocatálise industrial tem avançado e os bioprocessos estão sendo transferidos do ambiente de laboratório para a fabricação (ZAKS, 2001).

A síntese de produtos químicos biocatalisados aparece como uma metodologia promissora para reduzir o impacto ambiental da indústria de processos (FABER e PATEL, 2000), considerando que a mesma oferece uma forma ecologicamente correta de realizar processos químicos sob condições reacionais brandas e com um alto grau de seletividade (Figura 7).

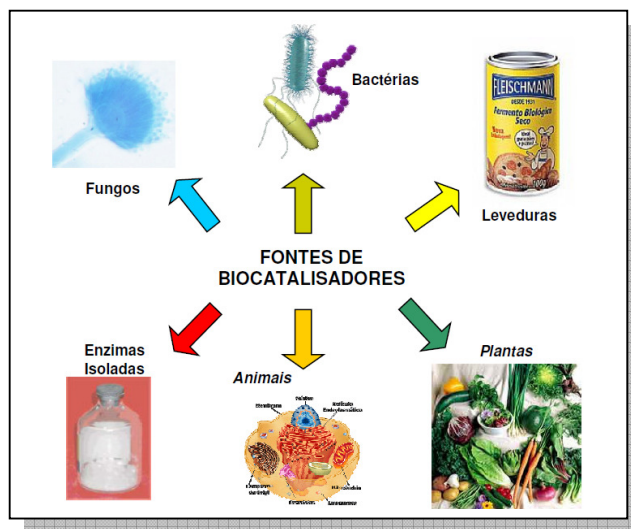


Figura 7. Fonte de biocatalisadores naturais mais utilizados.

1.3 MICRORGANISMO EM SÍNTESE ORGÂNICA

Desde estes primórdios, muitas transformações químicas realizadas com a utilização de microrganismos foram tema de estudos e muitas destas são exploradas economicamente tanto em escala laboratorial quanto em escala industrial.

Os microrganismos são responsáveis por uma série de transformações químicas com as quais o ser humano tem tomado contato desde sua primitiva existência, mesmo sem ter qualquer consciência disto. A preparação de vinhos, queijos, massas de pães e outros produtos empregados no cotidiano do ser humano são exemplos de transformações químicas realizadas por microrganismos. Uma das primeiras transformações químicas conscientes que empregou microrganismos foi a produção da penicilina pelo fungo *Penicillium notatum* composto este empregado como um potente bactericida em 1928 por Alexander Fleming (CORRÊA e ZUÍM, 2009).

De acordo com Demain (2000) há muitos anos os microrganismos têm sido utilizados para nos fornecer produtos tais como pão, cerveja, vinho, aguardente, vinagre, queijo, picles dentre outros materiais fermentados. No princípio tais processos eram desenvolvidos para a preservação de frutas, legumes e leite. Contudo, foram desenvolvidos produtos sofisticados que satisfazem o paladar e a psique do ser humano e Louis Pasteur em 1862 foi um quem estabeleceu a base científica destas antigas aplicações através da oxidação do álcool a ácido acético usando uma cultura pura de *Bacterium xylinum*.

Demain (2000) justifica que a principal razão para o uso de microrganismos, sejam estes isolados de plantas ou de animais, na produção de compostos é a facilidade de aumento da produção pela manipulação genética ou ambiental.

Porém, o uso de microrganismos incluem outras vantagens, tais como a grande variedade de reações que os mesmos são capazes de realizar, a capacidade de adaptação a uma grande variedade de ambientes, o que permite que uma cultura seja transportada de sua natureza para o balão de laboratório ou para o fermentador de uma fábrica, onde ele é capaz de crescer devido às fontes de carbono e nitrogênio.

Ramos *et al.* (2009) e Piovan *et al.* (2008) ressaltam que o uso de células microbianas inteiras é um processo vantajoso porque as mesmas contêm os cofatores necessários (NADH e NADPH) e as vias metabólicas para a sua regeneração, visto que o uso de enzimas purificadas, no entanto, implica no alto custo do cofator que está na

faixa de US\$ 500 por mL de NAD a US\$ 200.000 por mL de NADPH (WONG; WHITESIDES, 1994). Os cofatores não estão ligados permanentemente à molécula da enzima, mas na ausência deles, a enzima é inativada. A fração protéica de uma enzima, na ausência do seu cofator, é chamada de apoenzima. A enzima associada ao seu cofator é chamada haloenzima. Este cofator pode ser regenerado (BRENELLI,1994), mas este processo é igualmente caro e de difícil controle.

Vieira *et. al* (2010) corrobora o uso de novas linhagens de microrganismos como biocatalisadores pois os mesmos podem oferecer uma oportunidade alternativa para investigar os recursos locais para a realização eficaz das principais transformações sintéticas com importância econômica e implicações ecológicas.

Atualmente muitos são os processos que envolvem o uso de microrganismos. Cerca de 1,6 milhões de libras de glutamato monossódico, um potente realçador de sabor são feitas a partir da fermentação usando várias espécies dos gêneros *Corynebacterium* e *Brevibacterium* (por exemplo *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* e *Brevibacterium lactofermentum*) Hoje, esses produtores de glutamato são classificados como subespécies de *C. glutamicum* (por exemplo *C. glutamicum ssp. flavum* e *C. glutamicum ssp. lactofermentum*). O glutamato monossódico é vendido por cerca de US \$ 0,95 por libra (WILKE, 1999).

1.3.1 Leveduras

As leveduras tornaram-se uma valiosa ferramenta para a preparação de importantes compostos para a indústria farmacêutica.

Estas, na qualidade de organismos vivos, são taxonomicamente classificadas em reinos, grupos, famílias e subfamílias segundo diversas características que vão de morfológicas a genéticas.

O biocatalisador mais empregado é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente utilizada na produção de bebidas alcoólicas. Esta levedura é taxonomicamente definida como pertencente ao Reino Fungi, domínio Eucariotal, gênero *Ascoporogenous*, subfamília *Saccharomycodeael* (juntamente com mais 22 gêneros) e família *Saccharo-cetaceae* (KREGER-VAN, 1980). A morfologia celular varia entre os gêneros existentes, podendo ser ovais, circulares, cilíndricas etc. (KREGER-VAN, 1980), reproduzindo-se por brotamento formando células desiguais.

Algumas espécies de *Saccharomyces* são capazes de crescimento anaeróbio facultativo, o que lhes confere a possibilidade de sobrevivência em diversos ambientes. Se houver oxigênio, essas leveduras respiram aerobicamente para metabolizar hidratos de carbono formando dióxido de carbono e água; na ausência de oxigênio, elas fermentam os hidratos de carbono e produzem etanol e dióxido de carbono. Essa fermentação é utilizada na produção de cerveja, vinho e nos processos de panificação (TORTORA *et al.*, 2005).

Esta levedura tem sido reportada há muito tempo como catalisador de transformações que geram produtos quirais e pode ser considerada como um biocatalisador ideal pelo fato de estar amplamente disponível e ser de fácil manuseio (FABER, 1997). De acordo com Baraldi e Corrêa (2004) esta levedura pode ser empregada para muitos tipos de reações tais como redução de carbonilas de cetonas e aldeídos, nitrilas, α e β -cetoésteres, análogos e duplas ligações C=C.

1.4 VEGETAIS EM SÍNTESE ORGÂNICA

Outra forma de se utilizar técnicas biocatalíticas é o emprego de biocatalisadores vegetais, dentre os quais se destaca a cenoura (*Daucus carota*) principalmente na redução de carbonilas (CORRÊA; ZUÍM, 2009). A biocatálise empregando vegetais vem ganhando espaço nas pesquisas voltadas a obtenção de compostos com alto grau de pureza enantiomérica porque estas metodologias biocatalíticas dão origem a produtos com alto valor agregado, empregando metodologias simples, baratas e eficientes (CORRÊA; ZUÍM, 2009).

No tocante a comparação entre a biocatálise empregando microrganismo e empregando vegetais, esta apresenta vantagens sobre aquela no que tange a simplicidade operacional, larga disponibilidade dos biocatalisadores, pouca exigência quanto a cuidados de assepsia e/ou esterilização, aos altos rendimentos e estereosseletividade e reprodutibilidade (CORRÊA; ZUÍM, 2009).

Quanto à desvantagem em se utilizar plantas íntegras como biocatalisadores ao invés de microrganismos ou enzimas isoladas é que o isolamento do composto de interesse pode ser um pouco mais complexo decorrente de processos enzimáticos competitivos realizados como sub-rotas no meio reacional.

1.5 ENZIMAS EM SÍNTESE ORGÂNICA

Enzimas são catalisadores biológicos produzidos por organismos vivos. O reagente em uma reação catalisada por enzimas é chamada de substrato ou precursor. As enzimas são proteínas com alto peso molecular, (CHAMPE *et al.*, 2006) constituídas basicamente de *L*-aminoácidos ligados covalentemente numa sequência definida (LABES; WENDHAUSEN 2008). As enzimas possuem uma região específica denominada sítio ativo, formado de poucos aminoácidos, sendo responsável pela ação catalítica (CHAMPE *et al.*, 2006). A forma espacial como o substrato se liga à enzima determina a formação de um estereoisômero como único produto (LABES; WENDHAUSEN, 2008).

Em 1961 a Comissão para enzimas (Enzyme Commission – EC) da União Internacional de Bioquímica (IUB), estabeleceu uma classificação para as enzimas e dividiu-as em seis classes, de acordo com a reação catalisada (CABRAL, 2003).

São elas:

- 1° Oxidorredutases: São enzimas que catalisam reações de transferência de elétrons, ou seja, reações de oxi-redução. As mais conhecidas são as Desidrogenases e as Oxidases.
- 2° Transferases: São enzimas que intervêm em reações de transferência de diversos grupos funcionais, como aldeído, cetona, acila, amina, carboxila, etc.
- 3° Hidrolases: São enzimas que catalisam reações de hidrólise. A extensão de grupos hidrolisáveis é ampla, e incluem ésteres, amidas, peptídeos e outras funções que contem grupos C-N, anidridos e muitos outros.
- 4° Liases: Catalisam as reações de remoção ou fixação de grupos químicos, envolvendo ligações C=C, C=N e C=O de forma não hidrolítica. São bons exemplos as Dehidratases e as Descarboxilases.
- 5° Isomerasas: Catalisam diversos tipos de isomerização, incluindo a racemização.
- 6° Ligases: São enzimas que catalisam reações de formação e novas moléculas a partir de duas já existentes. Nesta classe são denominadas frequentemente sintetases, que produzem a formação C-O, C-S e C-N.

As oxidorreduções e as hidrolases são as mais empregadas em síntese na área de catálise enzimática.

A capacidade de atuação em temperaturas brandas, condições neutras e aquosas, além do elevado número de ciclos catalíticos, torna vantajoso o uso de enzimas em síntese química (OLIVEIRA; MONTOVANI, 2009).

De maneira geral a síntese utilizando enzimas está associada a três características principais (WONG, 1994):

- a) Quimiosseletividade: uma vez que o propósito da enzima é atuar em um único grupo funcional, outras funcionalizações sensíveis que deveriam reagir normalmente com certo grau sob catálise química, são preservadas.
- b) Regiosseletividade: devido a sua complexa estrutura tridimensional, enzimas podem distinguir entre grupos funcionais que estão quimicamente situados em regiões diferentes do mesmo substrato.
- c) Enantiosseletividade: todas as enzimas são formadas de *L*-aminoácidos e, assim, são catalisadores quirais, acarretando o reconhecimento da quiralidade presente no substrato. Desse modo um substrato pró-quiral/racêmico pode ser transformado em um produto opticamente ativo, e ambos os enantiômeros de um substrato podem reagir com diferentes velocidades dispondo-se de uma resolução cinética.

A combinação entre biocatálise e síntese utilizando diferentes enzimas tem despontado no setor industrial principalmente no setor farmacêutico devido à crescente demanda por compostos enantiomericamente puros. Com o passar dos anos, processos interessantes vem sendo utilizados na indústria catalítica utilizando hidrolases, liases, oxirreduções dentre outros biocatalisadores, despontando como uma nova metodologia para síntese de intermediários na indústria farmacêutica (FABER; PATEL, 2000).

1.5.1 Lipases

As lipases são enzimas pertencentes à classe das hidrolases e desempenham um papel fundamental na digestão de gorduras pela clivagem de triglicerídeos de cadeia longa. Devido à polaridade oposta entre a enzima (hidrofílica) e seus substratos (lipofílico), as reações que envolvem a lipase ocorrem na interface entre as fases aquosas e oleosas (PAIVA *et al.*, 2000). Por este motivo, as interfaces são os pontos-chave para a biocatálise e um local apropriado para lipólise. O conhecimento sobre os efeitos da composição interfacial em catálise onde se utilizam a lipase ainda é limitado e o que se observa na literatura são apenas termos como “a qualidade interfacial”.

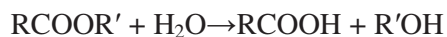
Porém, estudos com base em uma abordagem biofísica permitiram, pela primeira vez, mostrar os efeitos do microambiente em catálise interfacial das lipases. Estes estudos demonstraram que a atividade da lipase em relação a sua composição interfacial está mais atribuída a inacessibilidade do substrato do que a desnaturação da enzima ou até mesmo sua inativação, como o que se era proposto. As análises de interface revelaram que a reação de lipólise é auto-regulada (REIS, 2009).

Esta enzima extracelular foi descrita pela primeira vez em 1973 (REETZ, 2002). As lipases são encontradas em microrganismos, em animais e em vegetais, porém, industrialmente os microrganismos são a principal fonte para a produção, uma vez que tem alta velocidade de síntese, alto rendimento de conversão de substrato em produto, grande versatilidade e mais simplicidade na manipulação ambiental e genética de sua capacidade produtiva (ILLANES, 1994).

As lipases microbianas pertencem à família de enzimas α / β hidrolases e catalisam, a princípio, a hidrólise de triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos (REETZ, 2006). Além disso, as mesmas são frequentemente utilizadas como biocatalisadores em síntese orgânica, devido à sua disponibilidade, baixo custo de produção, não necessidade de cofatores, ampla especificidade de substrato, alta enantioseletividade, bem como alta estabilidade em meios não aquosos, como fluídos supercríticos e solventes orgânicos (JAEGER *et al.*, 1999, BREM *et al.*, 2011).

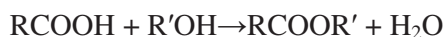
As duas principais categorias em que as reações catalisadas pela lipase podem ser classificadas são:

1) Hidrólise:

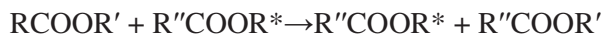


2) Síntese: reações desta categoria podem ser classificadas em

a) Esterificação



b) Interesterificação



Contudo, essas enzimas realizam inúmeras outras reações tais como: hidrólise ou síntese de ésteres, alcoólises, aminólises, peroxidações, epoxidações e interesterificações. Isto se deve a uma característica denominada na literatura de promiscuidade da enzima, que as tornam aplicáveis em diversas áreas como a de produtos farmacêuticos, produção de biodiesel e modificação de alimentos.

Esta versão recente, em relação à atividade enzimática, é chamada também de ajuste induzido o qual sugere que o sítio ativo não é rígido, como no modelo chave-fechadura proposto por Emil Fischer em 1894. Ou seja, decorrente da interação entre o sítio ativo da enzima e o substrato, há uma alteração conformacional do complexo enzima-substrato.

Porém para o uso de qualquer tipo de enzima na indústria é preciso considerar seu mecanismo de ação peculiar (RODRIGUES, 2010). O mecanismo de ação das lipases envolve inúmeros fatores relacionados com a ativação da atividade catalítica.

Um dos fatores que pode afetar as propriedades catalíticas dessas enzimas é a estabilidade em solventes orgânicos. As conformações abertas e cataliticamente competentes de várias lipases têm como característica comum o fato de que a área em torno do sítio catalítico possuir caráter hidrofóbico (FOJAN *et al.*, 2000). Esta é a face da superfície das lipases que é direcionada à camada lipídica.

Por outro lado, devido à extrema flexibilidade dos centros ativos das lipases, as suas propriedades catalíticas podem ser facilmente alteradas sem inativar a enzima. Assim, as propriedades das lipases podem ser moldadas por pequenas mudanças nas condições de reação, principalmente dos solventes, o que pode originar novos produtos opticamente ativos e ampliar consideravelmente as possibilidades de aplicações comerciais destas enzimas (PALOMO *et al.*, 2005; CHAUBEY *et al.*, 2006; CHAUBEY *et al.*, 2009).

Por isso, as lipases são excelentes alternativas para as sínteses químicas clássicas, com aplicação na indústria de alimentos, detergentes, óleoquímica,

farmacêutica, de química fina, de cosméticos e fragrâncias, de polpas e papel, de couro, de biossensores e no tratamento de efluentes ricos em óleos e graxas (PANDEY *et al.*, 1999; HASAN *et al.*, 2006).

Um processo já tradicional realizado pela empresa holandesa DSM é a obtenção de um precursor do Diltiazem, um dos dez fármacos mais vendidos no mundo. O Diltiazem é um derivado benzodiazepínico utilizado no tratamento de hipertensão arterial, com ação vaso dilatadora devido a seu antagonismo ao canal de cálcio (SCHIMID *et al.*, 2002, MATSUMAE *et al.*, 1993). Em uma das etapas realiza-se a resolução do éster metil-3-(4-metoxifenilglicidato) racêmico empregando-se uma lipase de *Serratia marcescens* (GAO *et al.*, 2004) (Figura 8).

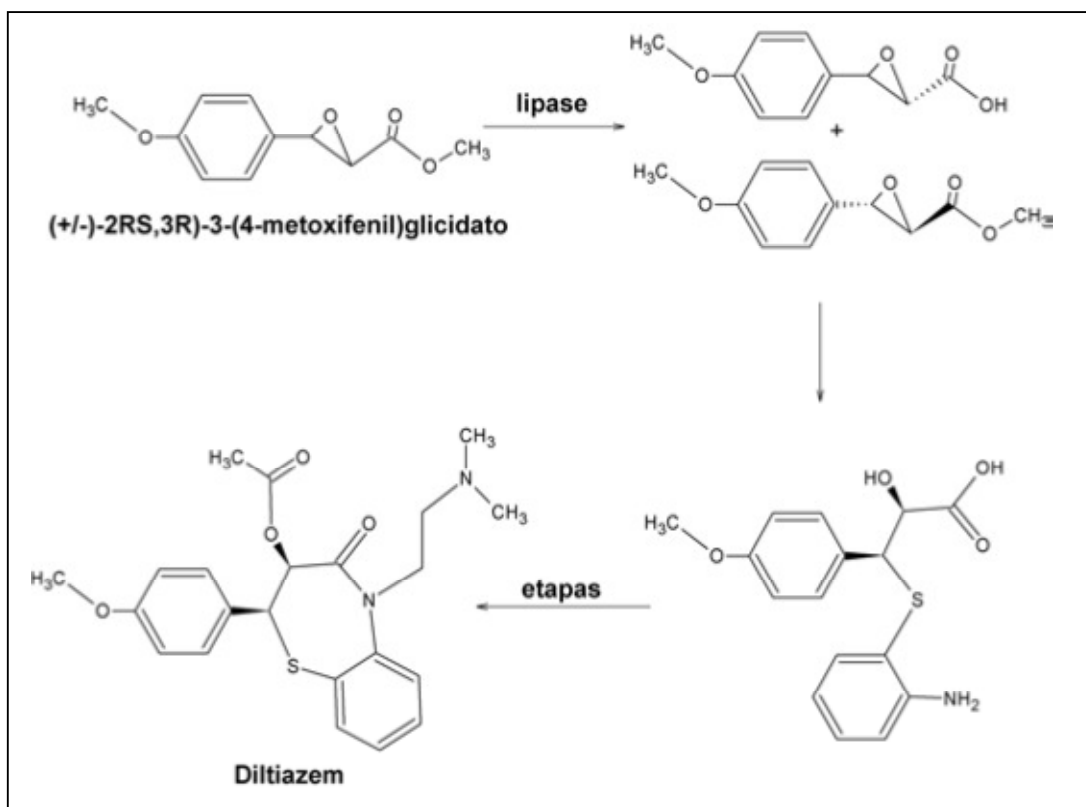


Figura 8. Resolução enzimática do éster metil-3-(4 metoxifenilglicidato).

Atualmente, as pesquisas buscam sua caracterização estrutural, elucidação do mecanismo de ação, exploração e aprimoramento das propriedades enantiosseletivas das lipases, assim como, a clonagem e a expressão de genes de lipases com características

interessantes em organismos de fácil cultivo, em larga escala (REETZ, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2006).

1.5.2 Quimosina

A quimosina, também conhecida como renina, é uma aspartil protease que catalisa a quebra das ligações peptídicas em outras proteínas sendo encontrada no abomaso (quarto estômago dos ruminantes) de bezeros lactentes e de outros ruminantes jovens (CHITPINITYOL e CRABBE, 1998).

Foi a primeira enzima recombinante derivada de fonte geneticamente modificada a receber aprovação para uso alimentar na Suíça, em 1988, e nos Estados Unidos, em 1990. São uma classe de enzimas com inúmeras aplicações tanto no campo fisiológico quanto no comercial (GUPTA *et al.*, 2002). No entanto, poucos são os trabalhos de síntese orgânica que reportam o uso dessas enzimas.

Bioquimicamente é uma proteína com cadeia polipeptídica única de 323 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 35600 Da (GILLILAND *et al.*, 1990; NEWMAN *et al.*, 1991). Diferente das outras proteínas gástricas aspárticas que processam todas as proteínas no lúmen gástrico, a quimosina é específica para uma das proteínas do leite: a caseína k, apresentando baixa atividade proteolítica sobre as outras proteínas e devido a isto, esta enzima tornou-se atraente para a indústria de queijo (FOLTMANN, 1993).

Existem duas formas alélicas de quimosina naturalmente produzidas de bezeros: quimosinas A e B que diferem em apenas um resíduo de aminoácido na posição 244: um aspartato na quimosina A e uma glicina na quimosina B. A presença desses aminoácidos garante uma maior afinidade da quimosina A pela caseína k devido a uma estabilização adicional eletrostática adicional do complexo caseína-k-quimosina, e uma maior estabilidade da quimosina B em pH abaixo de 5 (CHITPINITYOL e CRABBE, 1998).

Devido a problemas de escassez e de flutuação no custo de coalho de bezerro, bem como sua qualidade insatisfatória, os cientistas começaram a investigar a possibilidade de atribuir a microrganismos a produção de quimosina idêntica à produzida pelas células do estômago do bezerro. Para isso foi introduzido o gene do bezerro responsável pela produção de quimosina num microrganismo hospedeiro, a

Escherichia coli, que é um microrganismo conhecido, facilmente cultivável em grandes quantidades, porém outros microrganismos foram identificados como produtores de quimosinas como *Mucor pusillus*, *Mucor meihei*, *Aspergillus oryzae* (MARTIN *et al.*, 1980, CHRISTENSEN *et al.*, 1988), estas são denominadas quimosinas recombinantes. Atualmente apenas três empresas internacionais (Pfizer, Chr-Hansen e Girst Brocades) produzem e comercializam quimosinas recombinantes (MOHANTY *et al.*, 2003).

As quimosinas recombinantes passam por rigorosos testes bioquímicos, toxicológicos e microbiológicos para garantir a sua pureza. A FDA (Food and Drug Administration) concluiu que as enzimas recombinantes são idênticas e mais puras que os extratos enzimáticos extraídos do bezerro, o que conferiu o status GRAS (Generally Regarded as Safe) para estas preparações (JOHNSON e LUCEY, 2006).

A quimosina recombinante representa cerca de 60% das vendas de todas as enzimas industriais do mundo devido às suas aplicações em diversos setores industriais como nos detergentes, alimentos, produtos farmacêuticos, produtos químicos, couro, papel e celulose e indústrias de seda (GUPTA *et al.*, 2002), já que estas apresentam custos reduzidos e podem ser produzidas em quantidades satisfatórias em fermentações industriais.

1.6 HISTÓRICO NO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL

Segundo Beatriz, Lima e Marques (2005) em Mato Grosso do Sul, a linha de pesquisa em biotransformações começou com Lima (2005) no início deste século, quando o mesmo retornou da Inglaterra, onde fez seu pós-doutorado na área, justamente para promover um re-direcionamento de suas pesquisas em síntese orgânica. Nessa mesma época, Marques (2005), com o seu conhecimento em Bioquímica e Microbiologia, deu um caráter interdisciplinar para a recém implantada linha de pesquisa na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Com isso, as disciplinas de Bioquímica, Microbiologia e Química Orgânica se uniram para pesquisar temas que estão nas interfaces dessas três importantes áreas da ciência.

Beatriz, Lima e Marques (2005) ainda ressaltam que uma das dificuldades encontradas para solidificar essa linha de pesquisa no estado de Mato Grosso do Sul era a falta de equipamentos específicos para análises dos compostos sintetizados. Contudo, em 2002 formou-se primeira mestre nessa área em Mato Grosso do Sul, tendo como

tema de dissertação “Transformações Microbiológicas de Norbornan-7-onas e de Substâncias Liquênicas” (ARRUDA, 2002). Neste trabalho, estudou-se a biorredução seletiva de duas cetonas monoterpênicas sintéticas por *Beauveria densa* e *Curvularia lunata*. Esses microrganismos foram capazes de reduzir as cetonas nos respectivos alcoóis (E) e (Z). Uma seletividade π -facial nas biorreduções foi observada (ARRUDA *et al.*, 2005).

Observando o panorama do Estado de Mato Grosso do Sul frente a pesquisas que envolvam a temática de biotransformação e, conseqüentemente, a de Química Verde, fica mais evidente a necessidade de apoio a pesquisas voltadas a este tema, pois no referido Estado, até o ano de 2010, havia apenas um grupo de pesquisa cadastrado na *Plataforma Lattes* voltado a este tema, apesar de o Estado ser possuidor de um dos biomas mais ricos em biodiversidade: o pantanal. Hoje o tema já é abordado com maior frequência, contudo ainda está aquém do ideal para um Estado que busca o avanço técnico/científico como é o caso do Mato Grosso do Sul.

2.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial biocatalítico de diferentes linhagens de microrganismos e de enzimas na síntese de compostos β -aminocetônicos via reação de Mannich.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a atividade catalítica de células íntegras de fermento biológico de padaria bem como de outras linhagens de *Saccharomyces spp* isoladas da cana-de-açúcar;
- Comparar a atividade catalítica das bactérias *Xanthomonas spp* e *Lactobacillus acidophilus*.
- Comparar a atividade catalítica das enzimas quimosina, lipase e Lipozyme® na síntese de α -aminocetonas;

3. MATERIAIS

3.1 ENZIMAS

As enzimas utilizadas foram lipase tipo II em estado bruto obtida de pâncreas suíno (Sigma-Aldrich), Lipozyme® (lipase imobilizada em resina de troca iônica macroporosa) obtida de *Mucor miehei* da Sigma Chemical Company (St. Louis. USA) e quimosina obtida de *Aspergillus niger var. awamori* cedida pela empresa internacional Chr-Hansen.

3.2 MICRORGANISMOS

Os microrganismos utilizados para as sínteses foram *Saccharomyces cerevisiae* sp (fermento biológico de padaria) da marca Fleishman, *Xanthomonas spp*, *Lactobacillus acidophilus* (9061 OLA IDN, 19.10#2) e diferentes linhagens de microrganismos do gênero *Saccharomyces* isolados da cana-de-açúcar gentilmente cedidas pelo Prof^o Dr. Gustavo Graciano Fonseca (Tabela2).

Tabela 2. Microrganismos isolados da cana-de-açúcar.

Microrganismos Utilizados	
Bactérias	Fungos
<i>Xanthomonas spp</i> (Isolada da cana-de-açúcar)	<i>Saccharomyces cerevisiae meyen</i> (Fermento Biológico Seco)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Isolado 23*
	Isolado 05*
	Isolado 08*
	Isolado 23*
	Isolado 24*
	Isolado 99*
	Isolado 91*
* Diferentes linhagens de microrganismos do gênero <i>Saccharomyces</i> isolados da cana-de-açúcar.	

3.3 REAGENTES E SOLVENTES

Os reagentes empregados neste estudo foram: acetofenona (Vetec), ciclohexanona (Dinâmica), ciclopentanona (Sigma-Aldrich), cicloheptanona (Sigma-Aldrich), formaldeído (Vetec), benzaldeído (Dinâmica), anilina (Synth), tetrahidrofurano (Vetec), dimetilsulfóxido (Vetec), hexano (Dinâmica), etanol Proquímios) e acetato de etila (Vetec) todos com grau de pureza PA. Como secante nas reações foi utilizado o sulfato de sódio (Proquímios) grau de pureza PA. Para purificação e separação dos compostos de interesse foi utilizado cromatografia em coluna com fase estacionário sílica gel 70-230 Mesh (Vetec).

3.4 EQUIPAMENTOS

- Cromatógrafo gasoso 431-GC (Varian) acoplado ao detector de massas 210-MS (Varian).
- Espectrofotômetro de infravermelho, FTIR modelo 4000 (Jasco).
- Agitador magnético (Marconi).
- Balança analítica digital (Marte).
- Rotaevaporador (Fisatom).
- Estufa a vácuo (Marconi).
- Shaker (incubadora com agitação orbital) TE-420 (Tecnal).
- Autoclave vertical CS (Primatec).
- BOD (incubadora) BT 62 (Biothec)
- Centrífuga 206 BL (Fanem).
- Câmara de fluxo laminar (Marconi).
- Ressonância Magnética Nuclear (Bruker).

4. MÉTODOS

4.1 METODOLOGIA UTILIZADA - MICRORGANISMOS

Os meios nutrientes e de manutenção dos microrganismos foram preparados com extrato de malte (2g/L), água destilada e agar potato dextrose (PDA). Os meios preparados foram autoclavados por 20 minutos a 121°C, colocados em placas de Petri e tubos de ensaios. Em seqüência os microrganismos foram semeados com o auxílio de uma alça de platina sobre o meio de manutenção. Alguns cuidados foram tomados nesse processo, como a flambagem da alça de platina antes e depois de ser usada para não haver contaminação, não tocar na rolha com a mão e nem pousar sobre a bancada. Após a retirada do material com a alça, flambou-se a boca do erlenmeyer e colocou-se o tampão novamente. As placas de Petri foram abertas próximo ao bico de bunsen para evitar contaminação do ar, incubadas a 30°C por 24 horas e depois guardadas na geladeira para o procedimento do trabalho.

4.2 PREPARO DO INÓCULO

Para cada microrganismo utilizado, foram preparados 50 mL do meio líquido (extrato de malte) os quais foram previamente esterilizados na autoclave por 20 minutos a 120°C. O mesmo foi resfriado a temperatura ambiente e em seguida com o auxílio de uma alça de platina uma pequena quantidade de células foi retirada de uma placa de petri ou tubo de ensaio e semeada em meio líquido recém preparado. Na seqüência, os frascos foram mantidos no Shaker por 7 dias (130 rpm, 30° C). Esse procedimento ocorreu em meio estéril.

4.3 PREPARO DO MEIO DE CRESCIMENTO PARA OBTENÇÃO DE MASSA CELULAR

Foram preparados 200 mL do meio líquido (extrato de malte), autoclavados e resfriados a temperatura ambiente. Para este meio foram transferidos 5 mL do inóculo mantidos por 7 dias, 30°C no Shaker. Este procedimento ocorreu em meio não aerado.

Para a linhagem de *Xanthomonas spp* os meios foram centrifugados e das suspensões obtidas foram retiradas alíquotas para calcular a massa celular microbiana.

4.4 DETERMINAÇÃO DA MASSA CELULAR

A massa de células hidratadas foi determinada a partir da massa seca levando-se em consideração que 70% do conteúdo celular é formado por água (WENDHAUSEN, 1998).

Para esta determinação de massa seca, as células necessitam estar separadas do seu meio de cultura, por isso devem ser filtradas ou centrifugadas. O conteúdo filtrado foi colocado em um recipiente previamente pesado.

4.5 SÍNTESE DOS COMPOSTOS β -AMINOCETÔNICOS

A síntese dos compostos β -aminocetônicos foi realizada a partir da variação de diferentes cetonas, aldeídos, enzimas e sistemas solventes conforme a Figura 9.

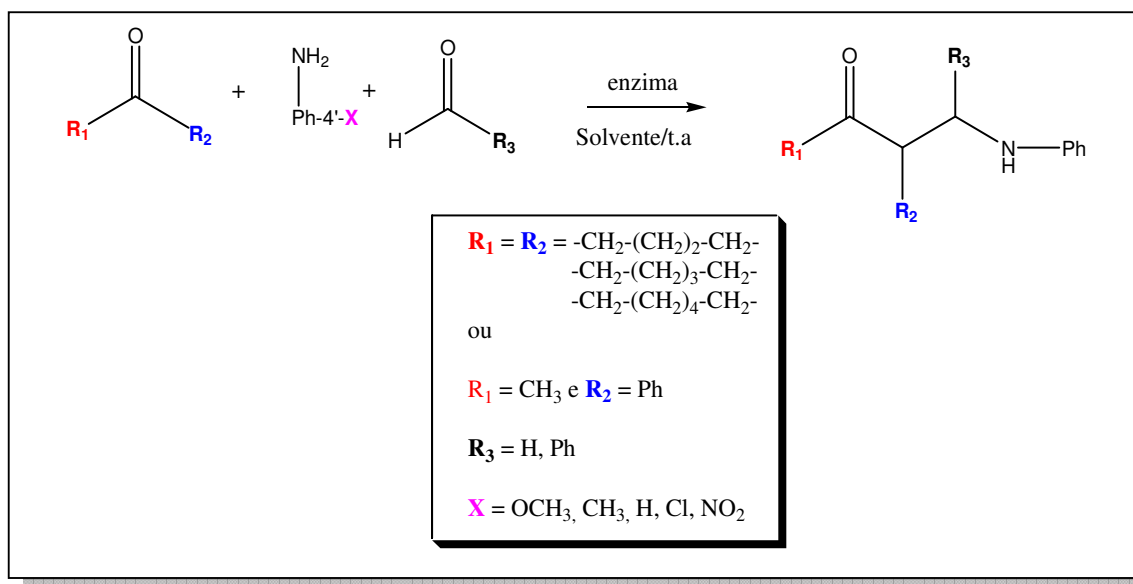


Figura 9. Descrição geral para as reações de Mannich biocatalisadas.

As reações foram mantidas sob agitação à temperatura ambiente entre 24 a 48 horas naquelas que utilizaram-se enzimas como catalisador e por 7 dias nas que utilizaram microrganismos. Todas as reações foram monitoradas por cromatografia de camada delgada (CCD).

Observada a ausência da mancha referente à cetona, as reações foram extraídas com acetato de etila e água, secas com sulfato de sódio e rotaevaporadas. O bruto de

reação foi purificado em coluna de sílica gel (70-230 Mesh) utilizando hexano e acetato de etila na concentração 9:1.

4.6 BIOSSÍNTESE GERAL DOS COMPOSTOS β -AMINOCETÔNICOS

Em um balão de 50 mL, adicionou-se 1,0 equivalente do composto cetônico, 1,0 equivalente do aldeído, 1,0 equivalente da amina, em 17,0 mL de solvente. A reação processou-se com agitação por 1 ou 2 dias nas reações realizadas com enzimas e por 7 dias nas reações realizadas por microrganismos, porém, todos à temperatura ambiente. Após esse tempo filtrou-se a reação e a fase orgânica foi extraída com acetato de etila e água. Rotaevaporou-se a fase orgânica final obtendo-se o bruto de reação o qual foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel. Este composto foi analisado por cromatografia gasosa, espectroscopia de infravermelho e por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (Figura 10).

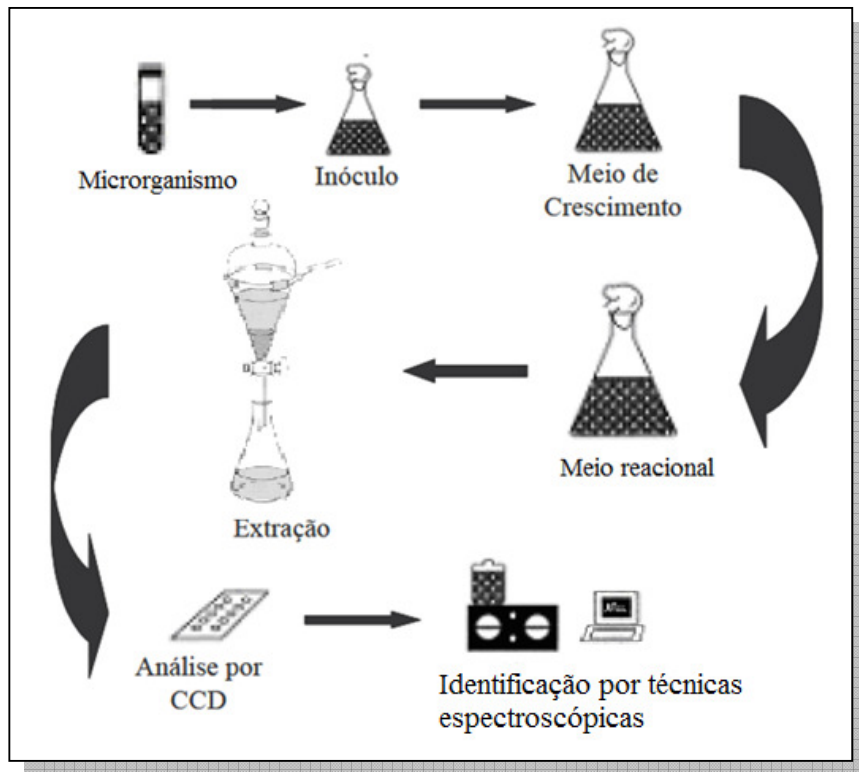
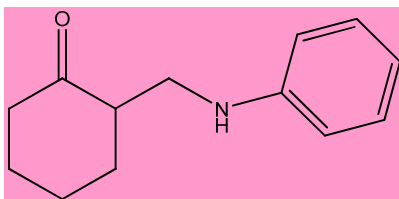


Figura 10. Etapas operacionais para a realização de uma reação biocatalizada com microrganismo. Adaptado de CHARTRAIN, M; Asymmetric bioreductions: application to the synthesis of pharmaceuticals, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11 (2001) p.504.

4.7 SÍNTESE CLÁSSICA (QUÍMICA) DOS COMPOSTOS β -AMINOCETÔNICOS

Em um balão de 50 mL, adicionou-se 1,0 equivalente composto cetônico, 1,0 equivalente do aldeído, 1,0 equivalente da amina e o catalisador L-prolina (10% mol) em 30 mL de THF. A reação processou-se com agitação por dois dias. Rotaevaporou-se a mistura até que não se retirasse mais solvente orgânico. A fase orgânica foi extraída com acetato de etila e água. Rotaevaporou-se a fase orgânica final obtendo-se o bruto de reação, o qual foi purificado por coluna cromatografia de sílica. Este composto foi utilizado como padrão nas análises cromatográficas, de infravermelho e de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

4.8 SÍNTESE DO COMPOSTO 2-[(N-FENILAMINO)METIL]CICLOHEXANONA

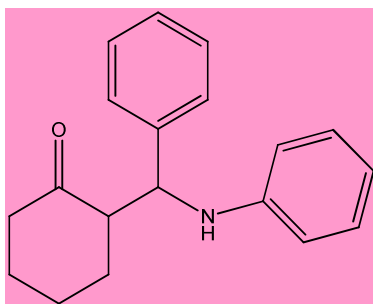


Adicionou-se 0,57 g de ciclohexanona (4,92 mmol), 0,39 g de formaldeído (4,92mmol), 0,45 g de anilina (4,92mmol) , 0,50g de enzima ou 2,0g de microrganismo em 17 mL do respectivo solvente.

CG/MS [M(%)] 204 (37) $M^+ + H$, 203 (44) M^+ , 106 (100) M^+ -ciclohexanona;
IV/cm⁻¹ (KBr) 1602 (C=C); 1698 (C=O); 3361 (N-H).

RMN ¹H d (CDCl₃/TMS): 1,6 (m, 3H); 1,87 (m, 1H); 2,11 (m, 2H); 2,38 (m, 2H); 2,63 (m, 1H); 3,1 (dd J=13,5 e 7,5 Hz); 3,42 (dd J=13,5 e 7,5 Hz); 4,16 (s, 1H); 6,58 (m, 3H); 7,16 (m, 2H).

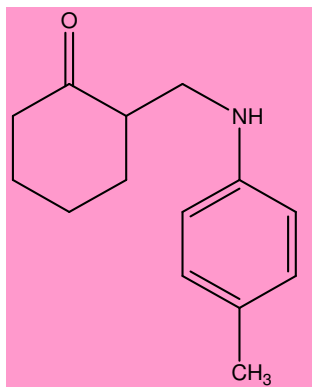
4.9 SÍNTESE DO COMPOSTO 2-[(FENIL)-(FENILAMINO)-METIL]-CICLOHEXANONA



Adicionou-se 0,33 g de ciclohexanona (3,36 mmol), 0,36 g de benzaldeído (3,36 mmol), 0,31 g de anilina (3,36 mmol), 0,50 g de enzima em 17 mL do respectivo solvente.

CG/MS [M(%)] 180 (100) M⁺ - [ciclohexanona - 2H], 181 (63) M⁺ - [ciclohexanona-H]; 182 (24) M⁺ -ciclohexanona.

4.10 SÍNTESE DO COMPOSTO 2-[(4'-METIL-FENILAMINO)-METIL]-CICLOHEXANONA

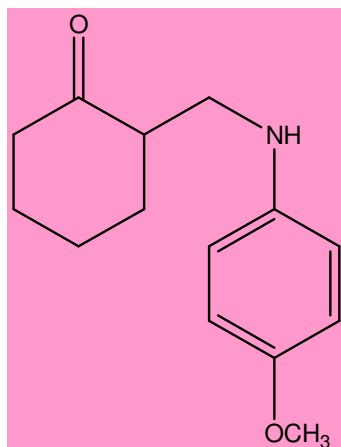


Adicionou-se 0,45 g de ciclohexanona (3,36 mmol), 0,46 g de formaldeído (3,36 mmol), 0,49 g de para-toluidina (3,36 mmol), 0,50 g de quimosina em 17 mL do respectivo solvente.

CG/MS [M(%)] 217 (28) M⁺, 120 (100) [M⁺ - ciclohexanona], 106 (58); 91 (33).

RMN ^1H d (CDCl_3/TMS): 1,63 (m, 3H); 1,82 (m, 1H); 2,07 (m, 2H); 2,23 (m, 3H); 2,46 (m, 1H); 2,64 (m, 1H); 3,06 (dd, $J=13,5$ e $4,6$ Hz); 3,23 (dd, $J=13,5$ e $4,6$ Hz); 6,60 (m, 2H); 6,96 (m, 2H).

4.11 SÍNTESE DO COMPOSTO 2-[(4'-METÓXI-FENILAMINO)-METIL]-CICLOHEXANONA



Adicionou-se 0,42 g de ciclohexanona (3,36 mmol), 0,42 g de formaldeído (3,36 mmol), 0,52 g de *p*-anisidina (3,36 mmol), 0,50 g de quimosina em 17 mL do respectivo solvente.

CG/MS [M(%)] 233 (83) M^+ , 136 (100) [M^+ - ciclohexanona], 123 (44); 108 (51).

RMN ^1H d (CDCl_3/TMS): 1,60 (m, 3H); 1,89 (m, 1H); 2,10 (m, 2H); 2,37 (m, 2H); 2,62 (m, 1H); 3,05 (dd $J= 13,3$ e $4,7$ Hz, 1H); 3,38 (dd $J= 13,3$ e $4,7$ Hz, 1H); 3,74 (m, 3H); 6,75 (m, 4H).

5. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS OBTIDOS

Os compostos obtidos foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho, cromatografia gasosa e por ressonância magnética nuclear. Para as análises realizadas no cromatógrafo gasoso utilizou-se as seguintes condições de operação:

- Temperatura do injetor: 280°C.
- Temperatura do detector: 280°C.

- Fluxo do gás de arraste: (He) 80 kPa de pressão.
- Razão de split: splitless 1/25.
- Fluxo na coluna: 1 mL/min.
- Temperatura do forno: 250°C.

5.1 MEDIDAS NO INFRAVERMELHO

Os espectros de infravermelho foram registrado no espectrômetro da Jasco.

Os espectros de infravermelho foram realizadas utilizando uma cela de KBr. As regiões de interesse analisadas nos espectros foram as regiões correspondentes à transição fundamental da vibração de estiramento da carbonila ($1750 - 1600 \text{ cm}^{-1}$) e a região referente à vibração de estiramento da ligação N-H que compreende a região de 3500 a 3100 cm^{-1} . Para este procedimento utilizou-se cela de KBr $0,5 \text{ mm}$ de caminho óptico. Os espectros foram registrados à temperatura ambiente. As condições gerais nas quais as bandas foram registradas, sendo as mesmas para todos os compostos, são:

- Número de scans (varreduras) por amostra: 180
- Número de background (brancos) por amostra: 180
- Resolução: $1,0 \text{ cm}^{-1}$
- Número de onda: 400 a 4000 cm^{-1} .
- Modo: Transmitância.

5.2 MEDIDAS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H foram registrados no espectrômetro (Bruker).

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram determinados em soluções de concentração ca. $5 \times 10^{-1} \text{ M}$ em CDCl_3 como referência interna.

Utilizou-se um campo magnético de $11,74 \text{ Tesla}$ e radiofrequência de 500 MHz para ^1H . os valores de deslocamento químico foram atribuídos em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamentos (J) em Hertz (Hz). As áreas dos picos dos espectros de RMN de ^1H foram obtidas por integração eletrônica e as multiplicidades descritas do seguinte modo: s: singlete; dd: duplo dubleto e m: multiplete.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 TESTES REACIONAIS ENVOLVENDO A QUIMOSINA

Os dados dispostos na Tabela 3 foram obtidos através da variação das cetonas, dos aldeídos e os solventes mantendo-se sempre a mesma amina (anilina) e baseado no trabalho descrito por He e colaboradores (2010), o qual utilizou 10% (m/m) do biocatalisador.

Tabela 3. Cetonas, aldeídos, catalisadores, rendimentos (%) e solventes utilizados nas reações de Mannich biocatalisadas por quimosina (0,10g)*.

Experimento	Cetona	Aldeído	Solvente	Rend (%) ^a
1	Ciclopentanona	Formaldeído	THF ^c	b
2	Ciclopentanona	Formaldeído	Etanol	b
3	Ciclohexanona	Formaldeído	THF ^c	b
4	Ciclohexanona	Formaldeído	Etanol	b
5	Cicloheptanona	Formaldeído	THF ^c	b
6	Cicloheptanona	Formaldeído	Etanol	b
7	Acetofenona	Benzaldeído	THF ^c	b
8	Acetofenona	Benzaldeído	Etanol	b

*Condições reacionais: 1eq/mol de cetona, 1eq/mol de aldeído, 1 eq/mol de anilina, 0,10g de enzima em 17 mL do respectivo solvente, t.a/ 2 dias.

- a) Rendimento obtido após a purificação via coluna cromatográfica.
- b) Neste experimento foi obtida apenas a imina e a cetona de partida.
- c) Refere-se ao tetrahidrofurano.

Para as reações seguindo essa metodologia, não foi obtido o composto desejado e foram obtidas, conforme apresentado na Tabela 3, apenas as iminas e a cetona de partida.

De posse destes dados (Tabela 3), foi necessária a avaliação do processo reacional como um todo e, portanto, os passos de reação foram descritos e analisados em conformidade com os dados experimentais (Figura 11).

Como se pode averiguar pela Figura 11 o primeiro passo da reação é dependente da atividade catalítica da enzima. Isso porque esse passo propicia a formação da enamina (Passo 2) que será responsável pelo ataque à imina (Passo 3). Esta imina é resultado da condensação entre o aldeído e a amina (Passo 3). É possível investigar a ação catalítica da enzima tendo em vista que a imina sempre foi obtida na

reação independentemente da atividade do catalisador (Tabela 3), por que a mesma procede de passos reacionais que não dependem do catalisador. Já a obtenção do composto de interesse reflete a atividade enzimática, isto porque o passo determinante da reação é a formação da enamina, sem a qual não ocorre tanto a adição desta à imina quanto a formação do produto de interesse (Passos 4 e 5).

Inicialmente foram utilizadas as reações envolvendo a ciclopentanona, o formaldeído e a quimosina (10%) como apresentado na Tabela 3, experimentos 1 e 2.

Nestas reações variaram-se apenas os solventes entre tetrahidrofurano e etanol para padronizar o grau de polaridade ideal para reação. Isto porque é sabido que solventes altamente polares são capazes de absorver água avidamente e retirar a camada de hidratação da enzima, provocando perda das atividades catalíticas por inativação ou desnaturação. Cabe salientar que o etanol é um solvente polar prótico (constante dielétrica 24,3 e momento de dipolo 1,69) e, portanto, esperava-se que sua utilização facilitasse o processo reacional tendo em vista que diversos passos reacionais são dependentes de prótons (Passo 1, 3, 4 e 5). Como observado nestes experimentos, mesmo variando o solvente pouco polar aprótico, THF (THF: constante dielétrica 7,52 e momento de dipolo 1,63D), a um polar prótico, etanol, apenas a imina e a cetona de partida foram obtidas ao término das mesmas. Com estes resultados foi proposto que o tamanho da cetona, juntamente com a reatividade da mesma pudesse interferir no processo reacional.

Portanto, realizou-se o “*screening*” de cetonas avaliando entre a ciclohexanona (Tabela 3 entradas 3 e 4) à acetofenona (Tabela 3 experimentos 7 e 8).

Apesar da mudança na estrutura da cetona (Tabela 3 experimentos 3-6) as quais envolveu a ciclohexanona e a cicloheptanona o resultado obtido foi o mesmo das reações que envolveram o uso da ciclopentanona, ou seja, a imina e a cetona de partida. Posteriormente uma tentativa para se avaliar tanto o volume do composto cetônico quanto a reatividade do grupamento carbonila foi utilizado a acetofenona (Tabela 3 experimentos 7 e 8). Estes experimentos foram executados conforme descrito na literatura (KIDWAY *et al.*, 2011) para obtenção dos adutos de Mannich utilizando organocatalisadores. Porém, também nesses experimentos o composto idealizado não foi obtido.

Outro fator contido na Tabela 3 refere-se a alteração do aldeído. Esta alteração é importante, pois o formaldeído e o benzaldeído apresentam reatividades diferentes

frente à condensação com a anilina. Porém, nas reações executadas e descritas na Tabela 3 a imina foi sempre obtida. É de suma importância proceder a análise estrutural destas iminas, pois as mesmas são produtos provenientes da condensação entre a anilina e o benzaldeído e a anilina e formaldeído, a N-benzilidenoanilina e N-metilinoanilina respectivamente, e estas alterações estruturais proporcionam reatividades distintas. Portanto, se o fator *sine qua non* compreendesse a adição à imina quanto à sua reatividade, o produto da reação envolvendo principalmente o formaldeído deveria ser obtido tendo em vista este composto ser mais reativo em decorrência de seus fatores eletrônico e estéreo.

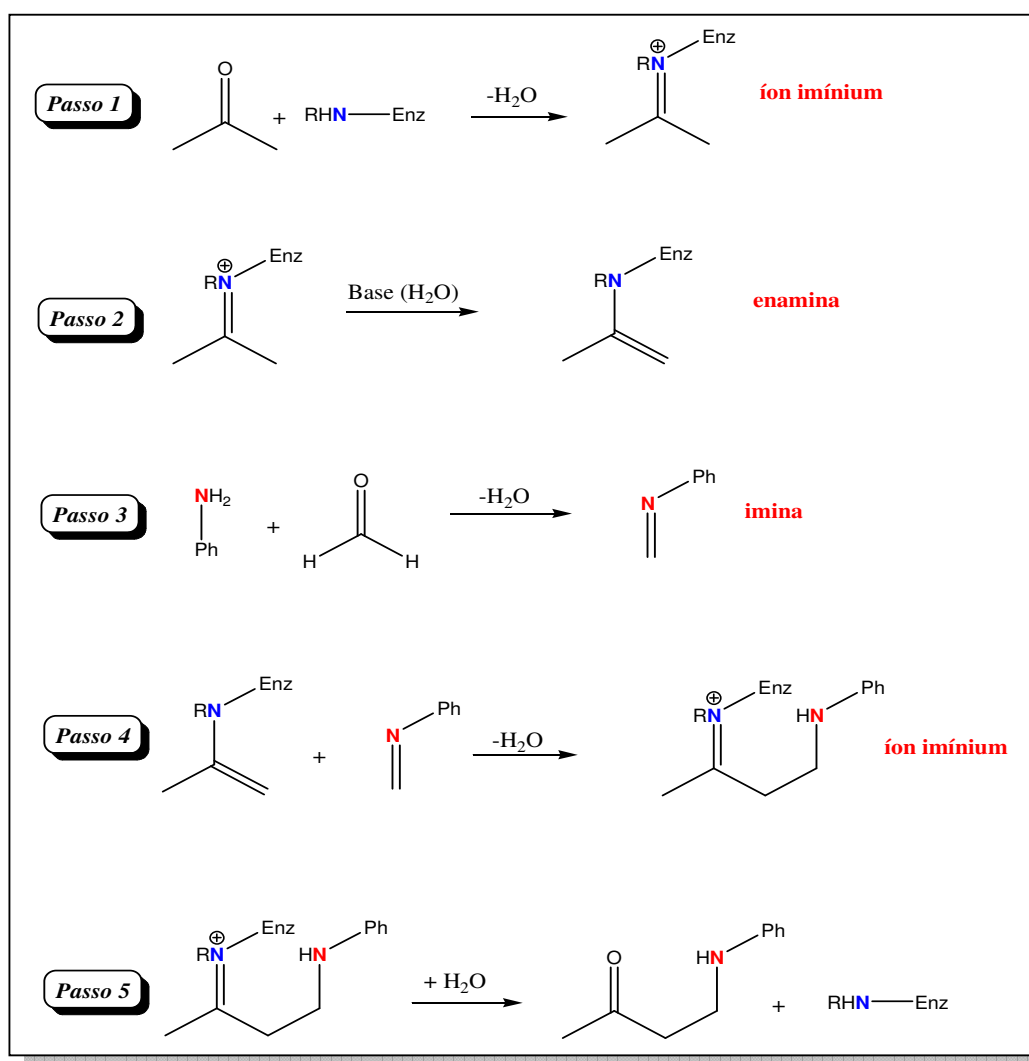


Figura 11. Mecanismo reacional para as reações de Mannich utilizando biocatalisadores (enzimas).

Logo, há no processo reacional algum fator intrínseco à reação que a impede de gerar o composto de interesse.

Decorrente das análises anteriores, apenas o fator que ainda não havia sido avaliado era a quantidade enzimática presente na reação. Portanto, passou-se a averiguar a quantidade ideal de biocatalisador nas reações de Mannich.

6.2 OTIMIZAÇÃO DA QUANTIDADE DE QUIMOSINA NO PROCESSO REACIONAL

Para se averiguar se o fator primordial para que a reação ocorresse advinha da quantidade enzimática no processo, foi proposta a realização da reação entre a ciclohexanona, formaldeído e anilina variando-se a quantidade enzimática de 0,10g a 0,50g em THF e etanol (Tabela 4 e Figura 12).

Tabela 4. Reações de Mannich biocatalisadas por quimosina (0,20g e 0,30g) envolvendo ciclohexanona, formaldeído e anilina*.

Entrada	Solvente	Catalisador (g)	Conversão (%) ^b
1	THF ^a	Quimosina (0,20g)	1,95
2	Etanol	Quimosina (0,20g)	2,15
3	THF ^a	Quimosina (0,30g)	1,80
4	Etanol	Quimosina (0,30g)	1,52
5	THF ^a	Quimosina (0,50g)	58,81
6	Etanol	Quimosina (0,50g)	13,02

*Condições reacionais: 0,57g de ciclohexanona (4,92 mmol), 0,39g de formaldeído (4,92mmol), 0,45g de anilina (4,92mmol) , 17 mL do respectivo solvente, t.a/1 dia.

- a) Refere-se ao tetrahidrofurano.
b) Refere-se aos dados da análise obtida do GC/MS

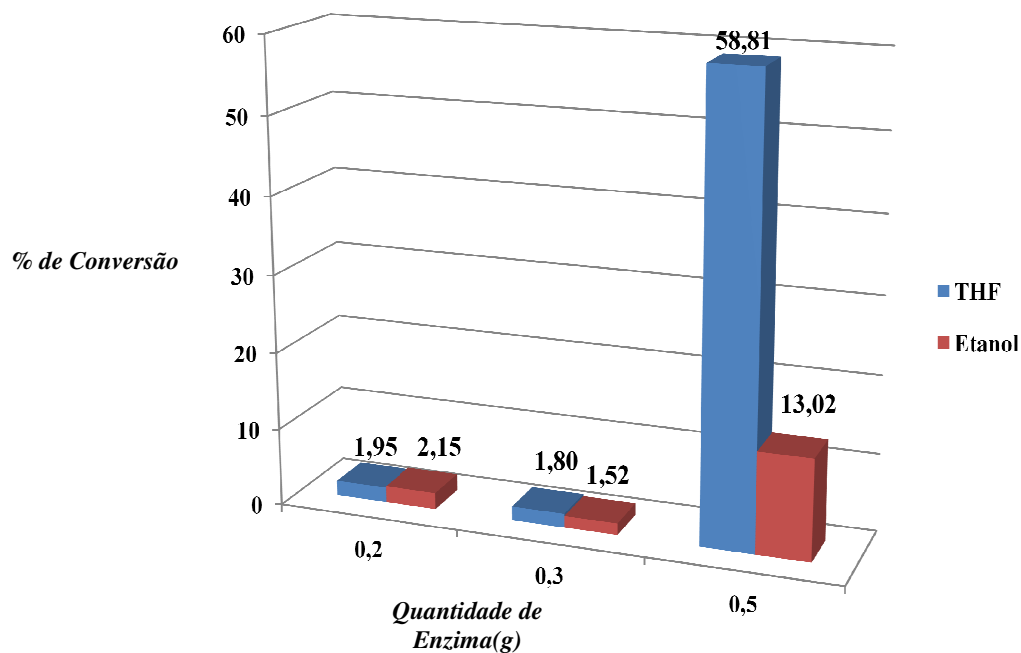


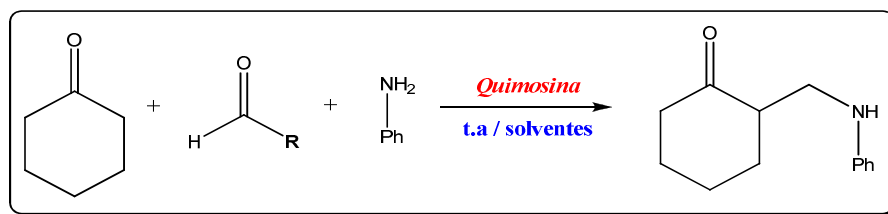
Figura 12. Efeito da quantidade do biocatalisador frente à quantidade de conversão do produto.

A partir da análise dos dados da Tabela 4 e Figura 12 pôde-se concluir que valores de quantidade de enzimas inferiores a 0,50g não produziam o composto de interesse. Portanto, foi proposta como quantidade padrão de enzima 0,50g .

6.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS COM QUIMOSINA À 0,50g

Obtidos os melhores resultados reacionais em relação à conversão, passou-se a realizar reações com esse quantitativo enzimático conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Reações de Mannich biocatalisadas por quimosina à 0,50g envolvendo ciclohexanona e anilina*.



Entrada	R	Solvente	Rend (%) ^a
1	H	DMSO ^d	60 ^a
2	H	THF ^c	80 ^a
3	H	DMSO/H ₂ O	b
4	Ph	THF ^c	34 ^e
5	Ph	Hexano	20 ^e
6	Ph	DMSO ^d	30 ^e

*Condições reacionais: 1eq/mol de ciclohexanona, 1eq/mol de aldeído, 1 eq/mol de anilina, 0,50g de enzima em 17 mL do respectivo solvente, t.a/ 2 dias.

- a) Rendimento obtido após a purificação via coluna cromatográfica.
- b) Neste experimento foi obtida apenas a imina e a cetona de partida.
- c) Refere-se ao tetrahidrofurano.
- d) Refere-se ao dimetilsulfóxido.
- e) Refere-se à conversão.

Decorrente da análise dos resultados das reações envolvendo formaldeído (Tabela 5 experimentos 1-3) pôde-se observar que a quimosina desempenhou o papel catalítico a contento tanto em solvente pouco polar (THF) quanto em um solvente polar (DMSO). Este dado é de suma importância decorrente do alto espectro de solventes que podem ser utilizados neste tipo de reação. Tendo em vista esta possibilidade, realizou-se a mesma reação em um meio que envolvesse água. Para tanto se escolheu o DMSO, que proporciona soluções com adição de água e efetuou-se a tal reação em meio de DMSO/H₂O 50%.

Surpreendentemente a adição desta quantidade de água no meio reacional diminui drasticamente o rendimento da reação (Tabela 5 experimento 3).

Este dado pode ser explicado em decorrência de fatores que envolvem tanto a amina utilizada quanto à enzima- a quimosina.

No que se refere à amina, a anilina, é importante salientar que a mesma não é solúvel em meio aquoso e, portanto com a diminuição da solubilidade ocorre a

diminuição do rendimento da reação. Outro fator importante que envolve a amina é que a reação de condensação entre esta e o fomaldeído libera uma molécula de água e a quantidade de água presente no meio reacional desloca a reação para os reagentes pelo princípio de Le Chatelier diminuindo, assim, o rendimento reacional como observado. A diminuição da quantidade de imina está intimamente ligada a quantidade de rendimento do produto.

No tocante á enzima, é sabido que as quimosinas são caracterizadas por empregarem uma molécula de água, ligada a dois resíduos de aspartato, agindo como nucleófilo. Esse ataque nucleofílico, na referida reação é realizado no passo dependente de prótons com eliminação de água (Figura 11 passos 1 e 2). Desse modo o efeito do solvente pode aumentar a solubilidade do substrato, possibilitando assim maior ataque enzimático tanto quando se refere à sua ação como catalisador ou pela sua ação na transferência de prótons (BARROS, 2002). Este também é um fator importantíssimo no processo reacional, pois, como dito anteriormente, a transferência de prótons acelera o processo reacional.

Logo a concomitância destes eventos indica que a reação descrita no experimento 3 da Tabela 5 não levaria a rendimentos consideráveis.

Outro indício importante que está incluso na Tabela 5 experimentos 4-6 é que o aumento do tamanho do aldeído e, conseqüentemente da imina formada, interfere no rendimento reacional. Esse efeito é descrito analisando-se os experimentos 1 e 4 da Tabela 5. Analisando-se as reações executadas em DMSO pode-se verificar uma diminuição de 50% do rendimento quando se altera o aldeído de formaldeído para benzaldeído. A mesma análise realizada para as reações em meio de THF indicam uma diminuição de 46% quando se executa a mesma variação. Esse dado pode ser explicado envolvendo-se a reatividade da imina precursora ou pelo volume (efeito estéreo) inerente à imina.

Quando se leva em consideração a reatividade da imina formada, sabe-se que a N-benzilidenoanilina é menos reativa que a N-metilinoanilina em decorrência do fator eletrônico que envolve a eletrofilicidade do carbono imínico e o efeito estéreo que o grupamento fenila impõe à imina, impedindo a adição do enol (Passo 4 Figura 11). Levando-se em conta esse mesmo fator estéreo, pode-se inferir que este aumento do volume molecular, passando-se de N-metilinoanilina para N-benzilidenoanilina, dificulta o contato com o sítio ativo, pois o mesmo encontra-se num profundo sulco

presente na estrutura terciária da enzima e esta estrutura apresenta uma forma bilobular (Figura 13).

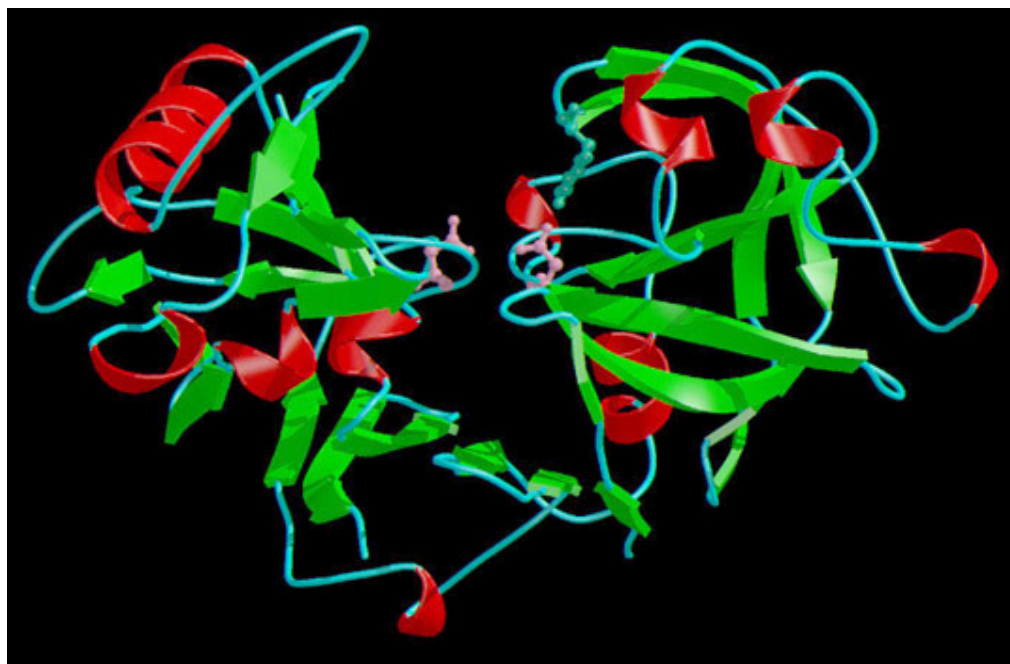


Figura 13. Estrutura tridimensional da quimosina bovina. Em vermelho, as α -hélices, em verde, folhas β pregueadas e em rosa, os resíduos de ácido aspártico catalíticos. Figura extraída do site MEROPS (<http://www.merops.sanger.ac.uk/>).

Cabe salientar, através dos dados descritos na Tabela 5 é que a polaridade dos solventes orgânicos também altera a capacidade catalítica da quimosina como se pode observar nos experimentos 1 e 2, e 4, 5 e 6, por exemplo. Nas reações que envolveram o formaldeído (Tabela 5 experimentos 1 e 2) o aumento da polaridade, ou seja, a troca de THF por DMSO implica em um decréscimo de 25% do rendimento reacional. Com a inserção de 50% de água, a diminuição é de 100% do rendimento.

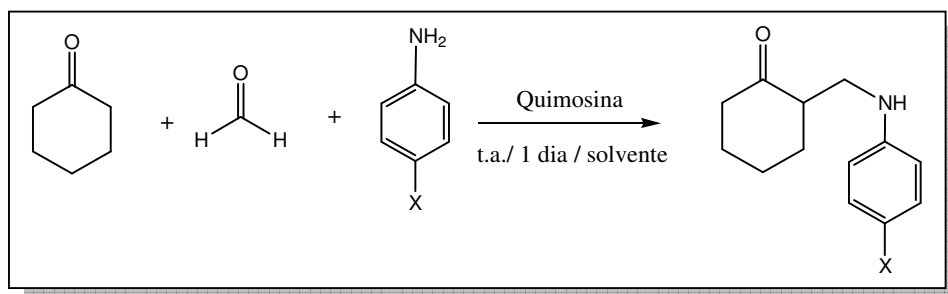
Já para as reações que envolveram o benzaldeído (Tabela 5 experimentos 4 e 6), o aumento da polaridade afeta muito pouco o percentual de conversão (13%). Já a diminuição da polaridade do solvente, alterando-se o meio reacional de THF para hexano diminui consideravelmente o rendimento da reação em 41%. Logo, conclui-se para as reações envolvendo a ciclohexanona, anilina e quimosina (0,5g), independentemente do aldeído utilizado, o meio que mais possibilita a reação é o THF.

Para o processo catalítico de obtenção das Bases de Mannich, propõe-se um mecanismo para a ação catalítica da quimosina na qual a mesma participa de processos

de transferência de prótons no meio reacional ativando grupos orgânicos essenciais para que a reação aconteça e como catalisador através da formação de uma imina proveniente da condensação entre o grupamento cetônico e grupos aminos presentes na enzima conforme Figura 11 passo 1.

Obtidos os compostos de interesse envolvendo a anilina, propôs-se a troca da amina aromática por seus derivados contendo grupos doadores de elétrons (OCH₃ e CH₃) e retiradores de elétrons (NO₂ e Cl) (Tabela 6).

Tabela 6. Reações de Mannich biocatalisadas por quimosina com a utilização de aminas substituídas, ciclohexanona e formaldeído*.



Experimento	Amina	Solvente	Rend ^a (%)
1	<i>p</i> -anisidina	DMSO ^b /H ₂ O (50/50)	50
2	<i>p</i> -anisidina	THF	^d
3	<i>p</i> -anisidina	DMSO	50
4	<i>p</i> -toluidina	DMSO ^b /H ₂ O (50/50)	60
5	<i>p</i> -toluidina	THF ^c	^d
6	<i>p</i> -toluidina	DMSO ^b	50
7	<i>p</i> -cloroanilina	DMSO ^b /H ₂ O (50/50)	^d
8	<i>p</i> -cloroanilina	THF ^c	^d
9	<i>p</i> -cloroanilina	DMSO ^b	^d
10	<i>p</i> -nitroanilina	DMSO ^b /H ₂ O (50/50)	^d
11	<i>p</i> -nitroanilina	THF ^b	^d
12	<i>p</i> -nitroanilina	DMSO ^c	^d

*Condições reacionais: 1eq/mol de ciclohexanona, 1eq/mol de formaldeído, 1 eq/mol de amina, 0,50 g de enzima em 17 mL do respectivo solvente, t.a/ 1 dia.

- a) Rendimento obtido após a purificação via coluna cromatográfica.
- b) Refere-se ao dimetilsulfóxido
- c) Refere-se ao tetrahydrofurano.
- d) Ao término da reação foram obtidas as aminas de partida e as respectivas iminas.

As reações envolvendo a *p*-anisidina (4-metóxi-anilina) (Tabela 6 experimentos 1-3) indicaram diferentemente da reação que envolveu a anilina, que a quimosina realizou seu papel catalítico apenas em solventes de alta polaridade (DMSO e

DMSO/H₂O). A mesma tendência foi observada para as reações envolvendo a p-toluidina (4-metilnilina) (Tabela 6 experimentos 4-6).

Essa preferência a solventes de alta polaridade apresentada pelas reações envolvendo a p-anisidina e a p-toluidina frente à anilina é referente à solubilidade destas em solvente muito polares. De acordo com a literatura a p-anisidina apresenta log P* de 0,95 (HANSCH *et al.*, 1995) o que confere à mesma uma alta solubilidade em água de 2,10x10⁴ mg/L a 20°C (VERSCHUEREN, 2001), a p-toluidina apresenta um log Kow[†] de 1,39 (HANSCH, *et al.*, 1995) o que resulta numa solubilidade em água de 6,50 g/L (6,50x10³ mg/L) à 15°C (YALKOWSKY e YAN, 2003).

Nas reações utilizando a p-cloroanilina e p-nitroanilina (Tabela 6 experimentos entrada 7-12) não foi observado a síntese do composto de interesse, tendo-se somente a precipitação da imina, produto da condensação entre o aldeído e a amina.

Para as reações onde se testaram como amina a p-toluidina e a p-anisidina os produtos desejados foram alcançados com rendimentos moderados. (Tabela 6 experimento 1, 3, 4, 6). Contudo, analisou-se uma queda de rendimento frente à anilina que provavelmente pode ser devido a razões estéricas, levando em consideração que a substituição eletrofilica final não ocorreu de forma satisfatória. Isso pode ser observado em se comparando os valores de rendimento nas reações onde utilizou-se a anilina (Tabela 5 experimentos 1 e 2) a p-anisidina e a p-toluidina.

Nas reações com a utilização da anilina, o solvente que garantiu melhores rendimentos fora o DMSO e o THF. Já para as reações onde se utilizou a p-anisidina e a p-toluidina o melhor solvente fora o DMSO e o DMSO e água na proporção de 50% cada um (Tabela 6 experimentos 1, 3, 4, 6). Nas reações onde o THF fora o solvente não houve formação do composto de interesse.

Esta diferenciação é decorrente de dois principais fatores, a solubilidade das iminas e sua basicidade.

Já o fator basicidade está extremamente relacionado não apenas com a amina utilizada, mas também com o intermediário formado, a imina. No tocante à amina utilizada era de se esperar que a p-anisidina e a p-toluidina apresentassem os maiores rendimentos em decorrência de serem as aminas mais básicas e nucleofílicas da série

* Log P é definido como o logaritmo do coeficiente de partição de uma substância em um sistema padrão de duas fases água/1-octanol

† Log Kow é definido como o logaritmo do coeficiente de partição de uma substância em um sistema padrão de duas fases 1-octanol/água

utilizada. Tais aminas apresentam grupos doadores de elétrons (OCH_3 e CH_3) que quer seja por ressonância (OCH_3) quer seja por efeito indutivo $+\text{I}$ (CH_3), tornariam o par de elétrons mais disponível para que a reação ocorra, ou seja, maior pK_a da correspondente amina frente à anilina (Figura 14). Porém, no que tange à imina formada esses efeitos operam de forma contrária no que se refere à eletrofilicidade do carbono imínico, tornando-o menos eletrofílico e, portanto, menos reativo. Logo, o rendimento reacional é afetado como visto nos dados apresentados Tabela 6.

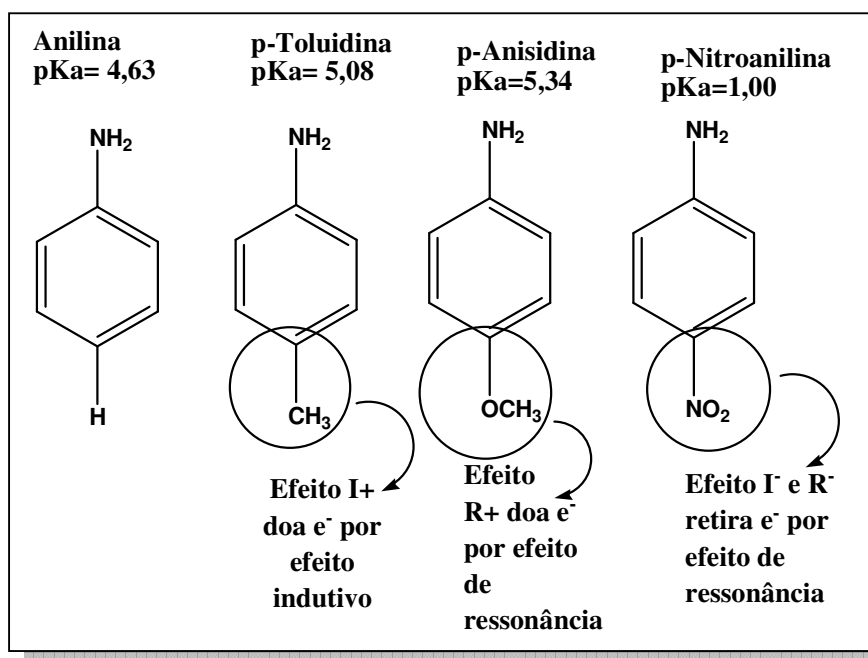


Figura 14. Descrição do pK_a referente à anilina, p-toluidina, anisidina e p-nitroalilina.

A diminuição da basicidade das aminas *p*-cloroanilina e principalmente a *p*-nitroanilina, confirmou os dados reacionais nos quais o produto final é a imina e principalmente a amina de partida. A diminuição da basicidade, diminui a adição da amina ao aldeído e a presença da imina é condição essencial para que a reação possa se processar Figura 11 (passo 3).

Além dos dados referentes às iminas, outro dado que é de suma importância, é referente a alteração de pH do meio reacional e o reflexo dessa alteração frente a alteração conformacional da enzima, mais especificamente no seu sítio ativo. A quimosina torna-se ativa em pHs ácido passando de sua forma inativa (pró-quimosina)

para sua ativa (quimosina). Em pH neutro a quimosina fica estável na sua forma pró-quimosina (inativa) já, em pH abaixo de 5 os resíduos ácidos na porção ativa da enzima são protonados promovendo mudanças conformacionais na estrutura tridimensional da enzima (Figura 13). Esse dado confirma a diminuição da atividade enzimática quando aplica-se a p-nitroanilina, pois a mesma apresenta um $pK_a = 1$.

Dentre os diversos parâmetros utilizados para correlacionar a atividade catalítica de uma enzima, tais como constante dielétrica (ϵ), momento dipolar (μ), parâmetro de solubilidade de Hildebrand (δ) o Log P é afirmado por alguns autores como Ilaane *et al.* (1998) como o melhor parâmetro de comparação para a atividade enzimática. Desta maneira o Log P, denominado logaritmo do coeficiente de partição em um sistema bifásico padrão octonal/água foi introduzido como uma medida quantitativa da polaridade do solvente. O tetrahidrofurano apresenta um Log P de 0,49, o hexano 3,50, dimetilsulfóxido de -1,30, o etanol de -0,24.

Na maioria das vezes a atividade catalítica enzimática é baixa em solventes hidrofílicos, que apresentam Log P inferior a 2, moderada em solventes que apresentam Log P entre 2 e 4 e é alta em solventes apolares, onde o Log P é superior a 4.

Outro fator é a solubilidade dos reagentes no meio reacional, pois reagentes polares tendem a permanecer na camada de água da enzima e isso causará inativação da mesma ou até reações secundárias.

Porém, neste estudo o solvente que mais contribuiu para que a enzima realizasse seu papel catalítico fora o THF, onde o Log P é de 0,49 fato que comprova que não existe um parâmetro quantitativo confiável para ilustrar as interações entre enzima-solvente orgânico.

6.4 REAÇÕES COM LIPASE E LIPOZYME®

Otimizadas as reações envolvendo a ciclohexanona, a anilina e o formaldeído para a quimosina realizou-se a mesma reação envolvendo outras enzimas como a Lipase tipo II e a Lipozyme® para a comparação dos dados de atividade catalítica das diferentes enzimas.

Tabela 7. Reações de Mannich biocatalisadas por lipase e Lipozyme® com a utilização de ciclohexanona, formaldeído e anilina*.

Experimento	Solvente	Catalisador (0,50g)	Rendimento (%) ^a
1	DMSO ^d	Lipase	75 ^a
2	THF ^c	Lipase	70 ^a
3	DMSO ^d /H ₂ O (50/50)	Lipase	B
4	DMSO ^d	Lipozyme®	60 ^a
5	THF ^c	Lipozyme®	80 ^a
6	DMSO ^d /H ₂ O (50/50)	Lipozyme®	b

*Condições reacionais: 0,57g de ciclohexanona (4,92 mmol), 0,39g de formaldeído (4,92mmol), 0,45g de anilina (4,92mmol) , 0,50g de enzima, 17 mL do respectivo solvente, t.a/2 dias.

- a) Rendimento obtido após a purificação via coluna cromatográfica
- b) Neste experimento foi obtida apenas a imina e a cetona de partida.
- c) Refere-se ao tetrahidrofurano.
- d) Refere-se ao dimetilsulfóxido.

Nas reações que envolvem a lipase como biocatalisador (Tabela 7) pode-se verificar que tanto em solvente pouco polar (THF) como em solvente muito polar (DMSO) as reações se processam com rendimentos apreciáveis (Tabela 7 experimentos 1 e 2). Porém, a adição de água, da mesma forma que para as reações envolvendo a quimosina, nesta reação, proporciona uma diminuição drástica no rendimento reacional (Tabela 7 experimento 3). Uma explicação para tal é que a apesar da adição de água possibilitar uma melhor solvatação sob a estrutura da enzima, e assim, ativar seu sítio reacional, esta adição diminui drasticamente a solubilidade dos compostos orgânicos no meio reacional impossibilitando a obtenção dos intermediários reacionais.

Uma plausível explicação para a obtenção dos compostos de interesse em meio orgânico (THF e DMSO) provém da adequação da estrutura enzimática das lipases em meio orgânico. Estas enzimas quando imersas em meios orgânicos dirigem seus sítios

catalíticos para a fase orgânica e possibilitam assim a inserção dos compostos orgânicos em seu sítio catalítico (COSTA, 1999).

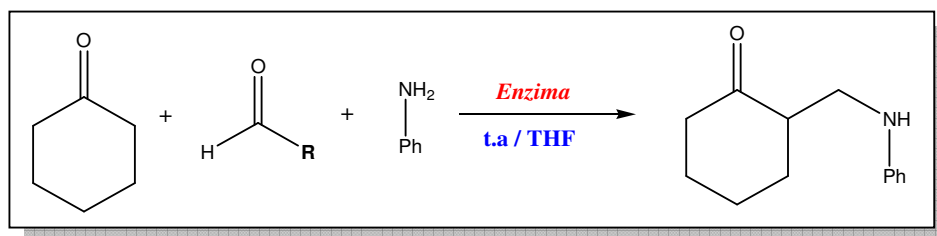
Com a finalidade de se verificar se a utilização de enzimas imobilizadas confere maiores rendimentos para as reações foi testada, como catalisador biológico, a Lipozyme®, uma lipase imobilizada sobre resina de troca iônica macroporosa. A Lipozyme®, de acordo com a literatura apresentaria algumas vantagens em relação a enzima livre, neste caso a lipase, as quais são: a) aproveitamento a atividade catalítica por maior período de tempo, uma vez que a enzima não deve ser desnaturada ao final do processo em batelada; b) operação de forma contínua o que possibilita maior controle das variáveis do processo; c) facilidade de separação do catalisador e do produto da reação, por estar na forma insolúvel ao meio reacional sem contaminação com o biocatalisador; d) prevenção da ocorrência de reações indesejáveis e a contaminação do meio reacional; por alterar, em alguns casos, as propriedades catalíticas da enzima em relação à sua forma livre, como, por exemplo, conferir maior estabilidade ao pH e à temperatura, reduzir os efeitos de inibição pelo substrato e produto, e facilitar a interrupção do processo reacional, quando se atinge determinado grau de conversão, pela remoção do biocatalisador, se a operação está sendo realizada em batelada (CASTRO; ANDERSON, 1995).

No entanto através dos dados da Tabela 7 (experimentos 4-6), pode-se observar que mesmo com a utilização da enzima imobilizada (Lipozyme®) os rendimentos em meios orgânicos (THF e DMSO) dos produtos não sofreram alterações consideráveis em relação à enzima livre (quimosina). Porém, quando se adiciona água ao meio reacional de DMSO observa-se o decréscimo no rendimento. Novamente atribuí-se esse decréscimo de rendimento a insolubilidade dos materiais de partida utilizados na reação como descrita anteriormente.

Geralmente a biocatálise é mais favorável em meio aquoso, entretanto, estudos mostram que esses biocatalisadores podem executar seu papel em diversas reações em uma ampla variedade de solventes orgânicos. (ILAANES, 1994) Há alguns anos, pesquisadores têm incluído meios orgânicos nas biocatálises convencionais. Em escala industrial a aplicação destes meios orgânicos alternativos ainda é baixa, isto por que há uma visão imprecisa que tais meios desnaturam as enzimas. Esta teoria vem sendo elucidada e desmistificada através de estudos empregando solventes orgânicos em biocatálise.

Com a finalidade de se analisar conjuntamente os dados obtidos para os três biocatalisadores nos meios orgânicos que propiciaram os maiores rendimentos foi transcrita a Tabela 8.

Tabela 8. Comparação entre os rendimentos apresentados pelas enzimas em diversos solventes.



Enzima	Rend _{THF} (%)	Δr^*	Rend _{DMSO} (%)	Δr^*
Quimosina	80	-	60	-
Lipase	70	-12,5	75	+25
Lipozyme®	80	0	60	0

$$* \Delta r = \frac{\text{Rend.Quimosina} - \text{Rend. de outra enzima}}{\text{Rend.Quimosina}}$$

A Tabela 8 demonstra novamente através da comparação entre os rendimentos obtidos para as três enzimas nos solventes THF e DMSO mostra que a quimosina assemelha-se muito à Lipozyme®, enzima imobilizada, e que a alteração do solvente pode afetar o rendimento da reação. Os dados da Tabela 8 indicam que a quimosina e a Lipozyme® apresentam uma preferência por solventes polares apróticos.

É importante salientar que não há na literatura nenhuma descrição sintética para a utilização da quimosina sendo que a mesma atuou a contento como biocatalisador nas reações descritas neste trabalho.

6.5 REAÇÕES COM FUNGOS

As reações foram realizadas a temperatura e pressão ambiente e os biocatalisadores utilizados foram a *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de pão industrial) e as cepas de *Saccharomyces spp* isoladas da cana-de-açúcar na concentração

de 50% m/m em relação ao produto conforme adequação realizada para a quimosina. Em algumas reações foi utilizada a glicose como aditivo, pois segundo Labes e Wendhausen (2008) a literatura as leveduras utilizam glicose ou sacarose como fonte de carbono. Para se obter o composto de interesse as reações processaram-se em sete dias e os dados estão dispostos na Tabela 9.

Tabela 9. Reações de Mannich biocatalisadas por leveduras (2g) com a utilização de ciclohexanona, formaldeído e anilina*.

Experimento	Catalisador	Solvente	Rend. (%) ^b
1	<i>Saccharomyces spp</i> (Isolado 23da cana-de-açúcar)	THF ^a	40 ^c
2	<i>Saccharomyces cerevisiae meyen</i> (Fermento Biológico Seco)	THF ^a	80 ^b
3	<i>Saccharomyces spp</i> (Isolado 23 da cana-de-açúcar)	Água	d
4	<i>Saccharomyces cerevisiae meyen</i> (Fermento Biológico Seco)	Água	d
5	<i>Saccharomyces spp</i> (Isolado 91 da cana-de-açúcar)	Água	d
6	<i>Saccharomyces spp</i> (Isolado 08 da cana-de-açúcar)	Água	d
7	<i>Saccharomyces spp</i> (Isolado 99 da cana-de-açúcar)	Água	d
8	<i>Saccharomyces cerevisiae meyen</i> (Florax) + Glicose	Água	d
9	<i>Saccharomyces spp</i> (Isolado 05 da cana-de-açúcar + Glicose)	Água	d
10	<i>Saccharomyces spp</i> (Isolado 24 da cana-de-açúcar + Glicose)	Água	d
11	<i>Saccharomyces spp</i> (Isolado 24 da cana-de-açúcar)	Água	d

*Condições reacionais: 0,57g de ciclohexanona (4,92 mmol), 0,39g de formaldeído (4,92mmol), 0,45g de anilina (4,92mmol) , 2g de levedura, 17 mL do respectivo solvente, t.a/7 dias.

- a) Refere-se ao tetrahidrofurano.
- b) Refere-se a rendimento obtido via coluna cromatográfica.
- c) Refere-se a conversão.
- d) Neste experimento foi obtida apenas a imina e a cetona de partida.

Optou-se pelo fermento de pão porque segundo a literatura o mesmo pode ser empregado na redução de carbonilas de cetonas e aldeídos, nitrilas, α - e β -cetoésteres, análogos e duplas ligações C=C (BARALDI e CORRÊA, 2004). Com o objetivo de propor uma nova aplicação deste microrganismo em reações de Mannich preconizou-se tal reação. Porém, alguns autores apontam algumas desvantagens na utilização do fermento de pão tais como:

- Pouca solubilidade em água do substrato orgânico o que dá a possibilidade do uso de etanol ou de outros co-solventes (BARALDI *et al.*, 2002);
- Existência de diversas cepas podendo interferir na reprodutibilidade do experimento (BARALDI *et al.*, 2002).
- Presença de um sistema multienzimático intra e extracelular o que pode aumentar a seletividade pela modificação no substrato ou alterações no meio reacional e/ou adição de inibidores (HÖGBERG *et al.*, 1994);

De acordo com Wong (1995) este sistema multienzimático presente no meio celular da levedura são de enzimas da classe das oxidoredutases, que podem ser subdivididas em oxidases, oxigenases e desidrogenases (DHs).

Segundo Baralti e Corrêa (2004) para que as DHs atuem é necessária a presença de cofatores e neste caso o cofator utilizado são do tipo nicotinamidas NAD(P)H sendo este um aspecto mecanístico importante. A autora ainda ressalta que a relação entre substrato e sítio ativo das enzimas presentes na levedura é outro ponto a ser considerado em se falando de mecanismo de reação.

Porém existem diversas vantagens na utilização de células íntegras de levedura tais como:

- Estar amplamente disponível (FABER, 1997).
- Ser de fácil manuseio (FABER, 1997).
- Possuir os cofatores necessários (NADH e NADPH) e as vias metabólicas para a sua regeneração (RAMOS *et al.*, 2009, PIOVAN *et al.*, 2008).
- Facilidade de aumento da produção pela manipulação genética (DEMAIN 2000).
- Redução do impacto ambiental, pois os mesmo não oferecem risco ao meio ambiente (FABER, 2000).

Do que fora apresentado referente as enzimas, projetou-se a utilização de microrganismos que pudessem realizar a mesma reação contendo a ciclohexanona, formaldeído e anilina alterando-se os solventes entre tetrahidrofurano e água. O meio aquoso tem sido o mais frequentemente utilizado nas reações mediadas por *S. cerevisiae*, pois nesse meio as condições ambientais ideais para a sobrevivência do microrganismo são mantidas. Entretanto, a solubilização dos reagentes no meio

reacional e a posterior extração do produto formado tornam-se fatores limitantes ao processo, e podem ser superados com o uso de um meio orgânico (THF).

Para estas reações estudadas obteve-se o composto de interesse com maior rendimento com tetrahidrofurano. Os dados referentes ao meio de THF corroboram com os valores anteriormente obtidos nas reações envolvendo as enzimas (Tabela 5 experimentos 2).

Frequentemente, como dito anteriormente, é aceito que solventes orgânicos são tóxicos para células microbianas, porém a análise dos dados deste estudo empregando células íntegras de levedura apresentou melhores rendimentos com o uso do solvente tetrahidrofurano.

WENDHAUSEN *et al.* (2005) estudou a toxicidade do solvente para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e analisou que em um sistema misto a toxicidade da fase orgânica aumenta em relação a toxicidade do solvente em um sistema único. A partir daí o autor sugeriu que a essa toxicidade pode ser causada pelo contato direto da célula com o solvente e pela extração de nutrientes através da fase aquosa, causando uma disponibilidade limitada de nutrientes como resultado da aderência das células para a interface aquosa ou aprisionamento dos mesmos em uma emulsão. Essa toxicidade molecular poderia resultar na inibição da enzima, na desnaturação de proteínas e na modificação da membrana.

Porém, contrariamente ao exposto acima as reações envolvendo leveduras forneceram o composto de interesse em meio de THF. Uma explicação plausível para a obtenção do composto refere-se à morfologia do microrganismo utilizado como biocatalisador. As leveduras são seres eucarionte e sendo assim reagem a estímulos externos garantindo sua própria sobrevivência. Nesse sentido quase todos os processos de sinalização envolvidos empregam proteínas quinases específicas. Nestes organismos a sinalização envolve um grau elevado de complexidade. Em fermento de pão *Saccharomyces cerevisiae* algumas proteínas atuam como mediadores na resposta a diferentes estímulos tais como ambiente, feromônios, privação de nitrogênio, alta, média ou baixa osmolaridade, a condições adversas levando a esporulação de células diplóides, ou aos sinais que regem o crescimento vegetativo. Uma das proteínas que exercem esse papel são denominadas MAPK (proteína mitógeno quinase ativada) e atuam em cascata, no mínimo seis cascatas de MAPK. Em leveduras a proteína quinase está envolvida em muitos processos de sinalização. Dessa forma levantamos a hipótese

de que o tetrahidrofurano promova ativação dessas proteínas quinase o que faz com que a reação aconteça.

6.6 REAÇÕES COM BACTÉRIAS

Valendo-nos da mesma proposição para os fungos, empregou-se nas reações de Mannich com algumas cepas de bactérias para verificar-se suas atividades biocatalíticas. Foram empregados bactérias do gênero *Xanthomonas spp* , e *Lactobacillus acidophilus* (9061 OLA IDN, 19.10#2).

O gênero *Xanthomonas* representa uma das bactérias de maior importância epidemiológica nas zonas tropicais. Nesse gênero, a espécie *campestris* tem causado grandes prejuízos econômicos porque a mesma ataca cultivares de plantas comestíveis e ornamentais (ZAPATA; GAUD, 2001). A classificação dessa espécie *campestris* tem sido motivo de muitos estudos taxonômicos decorrente disso foi proposto a mudança da espécie *campestris* a *axonopodi*. Por fim muitos cultivares serão classificados neste último grupo (*axonopodi*) por existir evidências significativas que sustente a mudança na classificação (ZAPATA; GAUD, 2001).

A família *Xanthomonadaceae* apresenta formato de bastonetes retos ou curvos, são gram-negativos, flageladas e crescem aerobicamente sem formação de esporos. Não obtêm energia por fermentação (HOLT *et al.*, 1994) Essa bactéria é caracterizada pela variedade de substratos que podem usar. Estão presentes no solo, água, ar e esgoto. Cresce em meio de cultura simples como o PDA. Algumas *Xanthomonas* são patógenos de plantas com pigmentação amarelada. Outras como a *Xanthomonas campestris* secretam polissacarídeos resistentes à ação enzimática.

Devido a grande facilidade de cultivo e a ampla disponibilidade na natureza desta bactéria optou-se por realizar testes reacionais com a finalidade de agregar valor a mesma (Tabela 10).

Tabela 10. Reações de Mannich biocatalisadas por bactérias com a utilização de ciclohexanona, formaldeído e anilina.

Entrada	Catalisador	Solvente	Rend. (%)
1	<i>Xanthomonas spp</i> (Isolada da cana-de-açúcar)	THF ^a	50 ^b
2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	THF ^a	65 ^b
3	<i>Xanthomonas spp</i> (Isolada da cana-de-açúcar)	Água	c

*Condições reacionais: 0,57g de ciclohexanona (4,92 mmol), 0,39g de formaldeído (4,92mmol), 0,45g de anilina (4,92mmol) , 0,10g de *Xanthomonas spp* ou 1g de *Lactobacillus acidophilus*, 17 mL do respectivo solvente, t.a/7 dias.

- a) Refere-se ao tetrahidrofurano.
- b) Refere-se a rendimento obtido de coluna.
- c) Neste experimento foi obtida apenas a imina e a cetona de partida.

Nas reações nas quais empregou-se a *Xanthomonas spp* utilizou-se a ciclohexanona, o formaldeído, a anilina e 0,1g do catalisador.

Assim como nas reações envolvendo a ciclohexanona, o formaldeído e a anilina com utilização das enzimas quimosina, lipase e Lipozyme®, nestas empregando-se bactéria também obteve-se o composto de interesse para a referida reação em THF. Contudo, optou-se por testar a água como solvente, pois a segundo He et al. (2010) a água poderia acelerar a protonação da cetona e torná-la mais fácil de reagir. Porém, observou-se que o composto de interesse não foi sintetizado, fato que pôde ser explicado, como anteriormente, pela solubilidade dos reagentes no meio reacional.

Com o objetivo de avaliar mais uma bactéria na síntese de compostos β-amino-cetônicos realizamos reações com a o uso do *Lactobacillus acidophilus* (9061 OLA IDN, 19.10#2) seguindo a mesma metodologia utilizada nas reações com *Xanthomonas spp*.

O *Lactobacillus acidophilus* é um microrganismo probiótico habitante normal do intestino de muitos animais, incluindo os seres humanos, gram-positivos e apresentam forma de bastonetes isolados ou em cadeias curtas. (SHAH *et al.*, 1995). Não possuem flagelos, e são incapazes de formar esporos. Algumas cepas produzem H₂O₂ e bacteriocinas. Seu crescimento ideal ocorre em temperaturas entre 37° a 41° e em pH entre 6 e 7. O crescimento pode ser inibido em valores de pH abaixo de 4,5 ou acima de 9,5 e a taxa de crescimento é minimizada em temperaturas em torno de 25 a 28°C (OLIVEIRA, 2007). Estes microrganismos são homofermentativos, ou seja,

realizam a fermentação e produzem ácido láctico a partir da lactose (LAROIA *et al.*, 1991).

Esse microrganismo possui uma grande aplicação indústria alimentícia e estima-se que mais de 70 produtos que contenham *Lactobacillus acidophilus*, incluindo creme de leite, manteiga, iogurte, leite em pó, congelados e sobremesa são produzidos em todo o mundo. As espécies mais utilizadas para fins comerciais são *L. acidophilus*, *L. casei*, *Lactobacillus* GG (semelhante ao *L. casei rhamnosus* subgrupo, ATCC 53.103) (COSTELLO, 1993).

Portanto, quando se realizou tal reação em meio de THF o composto de interesse foi obtido.

É importante ressaltar que para ambas as bactérias utilizadas nesse trabalho nenhum trabalho contendo a descrição de complexos enzimáticos excretados para reações químicas é encontrado na literatura. Portanto, não há nenhuma hipótese adequada nesse instante que possa explicar a obtenção do composto de interesse. Porém, este trabalho introduz essas bactérias como biocatalisadores nas reações de Mannich.

7. CONCLUSÕES

Todas as enzimas testadas apresentaram potencial biocatalítico, porém o estudo da concentração das mesmas é fundamental para que a sua atividade catalítica seja desencadeada. Nas reações em que adicionou-se a quantidade de 10% (m/m) de quimosina em relação à massa referente ao rendimento quantitativo do produto não se obteve a formação do composto de interesse. Com a utilização da quimosina nas concentrações de 20 e 30% (m/m) foi observada uma baixa porcentagem de conversão. A partir desses dados optou-se pela utilização de 50% (m/m) de enzima em relação ao produto de interesse e o mesmo foi obtido com rendimentos consideráveis.

A quimosina é capaz de realizar sua atividade catalítica com a utilização de um amplo espectro de solventes visto que apresentou afinidade por tanto por solvente pouco polar (THF) quanto por solvente polar (DMSO).

Um fator importante no rendimento das reações que envolveram a quimosina é o aumento do tamanho aldeído e conseqüentemente da imina. O aumento do volume molecular da imina dificulta a interação entre este intermediário e o complexo enzimático enzima-cetona, o que diminui o rendimento da reação.

A adição de água no meio reacional diminui abruptamente, em alguns casos, o rendimento da reação com utilização de quimosina. Como não há na literatura nenhuma aplicação prática da quimosina na área de síntese orgânica, a conclusão que se pode tirar desta queda acentuada de rendimento provém do aumento da insolubilidade dos reagentes de partida nesse meio.

O fator basicidade da amina também infere no rendimento das reações, e esse fator está extremamente relacionado não apenas com a amina utilizada, mas também com o intermediário formado, a imina. A diminuição da basicidade da amina diminui a nucleofilicidade e a adição da amina ao aldeído, impossibilitando a formação da imina a qual é condição essencial para que a reação possa se processar.

Contudo, não existe um parâmetro quantitativo confiável para ilustrar as interações entre enzima-solvente orgânico, e assim correlacionar a atividade catalítica de uma enzima e o meio reacional na qual ela está inserida.

Para as reações que envolvem a lipase e a Lipozyme® foi verificado que tanto em solvente pouco polar (THF) como em solvente muito polar (DMSO) as reações se processam com rendimentos apreciáveis. Porém, a adição de água, da mesma forma que

para as reações envolvendo a quimosina, diminui drasticamente o rendimento reacional decorrente da diminuição da solubilidade dos reagentes utilizados. Uma plausível explicação para a obtenção dos compostos de interesse em meio orgânico (THF e DMSO) provém da adequação da estrutura enzimática dessas enzimas em meio orgânico.

No caso da Lipozyme®, mesmo esta sendo uma lipase imobilizada em uma resina de troca iônica macroporosa, não foi observado maiores rendimentos em relação a quimosina na mesma proporção enzimática (50% m/m).

A comparação entre os rendimentos obtidos para as três enzimas nos solventes THF e DMSO mostra que a quimosina assemelha-se muito à Lipozyme®, enzima imobilizada, e que a alteração do solvente pode afetar o rendimento da reação. Os dados indicam que a quimosina e a Lipozyme® apresentam uma preferência por solventes polares apróticos.

Porém, é importante salientar que não há na literatura nenhuma descrição sintética para a utilização da quimosina sendo que a mesma atuou, a contento, como biocatalisador nas reações descritas neste trabalho o que atribui uma nova aplicação catalítica para quimosina em química orgânica. Cabe salientar que a quimosina é biodegradável, é facilmente extraída do meio reacional, de baixo custo e poderá ser reutilizada.

Já, para as reações envolvendo microrganismos como biocatalisadores, os dados obtidos para a utilização do fungo *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de padaria) e das cepas de *Saccharomyces* isoladas da cana-de-açúcar em meio de THF corroboram com os valores anteriormente obtidos nas reações envolvendo as enzimas. Porém, neste caso, a hipótese para tal fato refere-se a ativação, através do THF, das proteínas MAPK (proteína mitógeno quinase ativada), pois é sabido que estas atuam como mediadores na resposta a diferentes estímulos tais como ambiente (solvente).

Nas reações de Mannich com o uso das bactérias *Xanthomonas spp* e *Lactobacillus aciphilus* como biocatalisadores, assim como nas reações com utilização de enzimas, obteve-se o composto de interesse para a referida reação em THF.

Para ambas as bactérias utilizadas nesse trabalho nenhum trabalho contendo a descrição de complexos enzimáticos excretados para reações químicas é encontrado na literatura. Portanto, não há nenhuma hipótese adequada nesse instante que possa explicar a obtenção do composto de interesse.

A biocatálise atualmente é um dos estudos mais importantes na área de química fina, principalmente na preparação de enantiômeros. Nesse sentido é importante que pesquisadores e estudantes, que estão envolvidos em química orgânica façam o uso de biocatalisadores, pois os resultados são excelentes.

Do exposto acima, a importância deste trabalho refere-se à introdução de novos biocatalisadores de baixo custo e ambientalmente seguros nas reações de Mannich, levando em consideração que os mesmos geram afluentes de baixa ou nenhuma toxicidade, além de introduzir uma nova aplicação para microrganismos que são considerados patógenos para os vegetais, principalmente para a cultura de cana-de-açúcar.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARZÚA, H. G. O.; ANDRADE, L. H.; FILHO, M. V. Enzimas em síntese orgânica. *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Interciência, p. 349-366, 2008.
- ALMEIDA, R. V.; ALQUERES, S. M. C.; LARENTIS, A. L.; ROSSLE, S. C.; CARDOSO, A. M.; ALMEIDA, W. I.; BISCH, P. M.; ALVES, T. L. M.; MARTINS, O. B. Cloning, expression, partial characterization and structural modelling of a novel esterase from *Pyrococcus furiosus*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39(9), p.1128-1136, 2006.
- ALEXAKIS, A.; CHIMIA 2007, 61, 212; HAJOS, Z. G.; PARRISH, D. R.; *J. ORG. CHEM.* 1974, 39, 1615; HAJOS, Z. G.; PARRISH, D. R. *Patente Alemã DE 2,102,623*, 1978 (CA, 1978, 88, 62529).
- ANASTAS, P. T.; LANKEY, R. L. Life cycle assessment and green chemistry: the yin and yang of industrial ecology. *Green Chemistry*, v. 2, p. 289-295, 2000.
- ANASTAS, P. T.; BARTLETT, L. B.; KIRCHHOFF, M. M.; WILLIAM, T. C. The role of catalysis in the design, development, and implementation of green chemistry. *Catalysis Today* v. 55 p. 11–22, 2000.
- ARRUDA, A. L. A. Transformações Microbiológicas de Norbornan-7-onas e de Substâncias Liguênicas. 95 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2002.
- ARRUDA, A. L. A.; MARQUES, M. R.; LIMA, D. P.; BEATRIZ, A. π -Face Selectivity from Bioreductions of 2-endo-substituted norbornan-7-ones by *Beauveria densa* and *Curvularia lunata*. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 3, p. 1-6, 2006.
- AREND, M.; WESTERMAN, B.; RISCH, N. Modern Variants of the Mannich Reaction *Angewandte Chemie International Edition*. v. 37, p. 1044, 1998.
- BARROS, M. R. A. Biocatálise em solvente orgânico: ensino em biotecnologia. *Boletim da Sociedade portuguesa de Biotecnologia*, nº. 73, p. 22-29, 2002.
- BARALDI, P. T.; CORRÊA, A. G. O emprego de fermento de pão, *Saccharomyces cerevisiae*, na síntese de feromônios. *Química Nova*, v. 27, nº. 3, p. 421-431, 2004
- BARALDI, P. T.; CORRÊA, A. G.; ZARBIN, P. H. G.; VIEIRA, P. C. *Tetrahedron:Asymmetry*, v. 13, p. 621, 2002.
- BEATRIZ, A.; LIMA, D. P. E; MARQUES, M. R. Biotransformações com Microrganismos em Mato Grosso do Sul: Histórico e Perspectivas. *Revista Ágora - www.fes.br/revistas/agora/ojs/ - Campo Grande*, v.1, nº. 4, 2005.

BREM, J.; PILBAK, S.; PAIZS, C.; BANOCZI, G.; IRIMIE, F. D.; TOSA, M.I.; POPPE, L. Lipase-catalyzed kinetic resolutions of racemic 1-(10-ethyl-10H phenothiazin- 1,2, and 4- yl)ethanols and their acetates. *Tetrahedron: Asymmetry*, v.22, p. 916–923, 2011.

BRENELLI, E. C. S. Redução de alguns compostos carbonílicos derivados de fenil cetonas empregando-se fermento de pão. Tese de Doutorado, Campinas, SP, 1994.

CARR, R.; ALEXEEVA, M.; TURNER, N. J. Directed evolution of enzymes: new biocatalysts for asymmetric synthesis. *Organic & Biomolecular Chemistry* I, p. 4133-4137, 2003.

CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. *Engenharia Enzimática LIDEL*. Edições Técnicas, Lisboa PT, p.121-140, setembro 2003.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. *Química Nova*, v. 18, n. 16, p. 544-554, 1995.

CHARTRAIN, M. Asymmetric bioreductions: application to the synthesis of pharmaceuticals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.11, p.504, 2001.

CHAMPE, C. P.; HARVEY A. A.; FERRIER, R. D. *Bioquímica Ilustrada*: Trad. Carla Dalmaz. 3.ed. Porto Alegre, Artmed, 2006.

CHAUBEY, A.; PARSHAD, R.; GUPTA, P.; TANEJA, S. C.; QAZI, G. N.; RAJAN, C. R.; PONRATHNAM, S. Arthrobacter sp. lipase immobilization for preparation of enantiopure masked β -amino alcohols. *Bioorg. Journal of Medicinal Chemistry* 1, v. 7, p.29-34, 2009.

CHAUBEY, A.; PARSHA, D. R.; KOUL, S.; TANEJA, S. C.; QAZI, G. N. J. Enantioselectivity modulation through immobilization of Arthrobacter sp lipase: kinetic resolution of fluoxetine intermediate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v. 42, p. 39-44, 2006.

CHENG, R. P.; GELLMAN, S. H.; DEGRADO, W. F. β -Peptides: From Structure to Function. *Chemical Reviews*, v.101, p. 3219, 2001.

CHEETHAM, P. S. Biotransformations: New routes to food ingredients. *Chemistry & industry*, v. 7. p. 265-268, 1995.

CHITPINYOL, S.; CRABBE, M. J. C. Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chemistry*, v. 61, n^o. 4, p. 395-418, 1998.

CHOUDHURY, L. H.; PARVIN, T. Recent advances in the chemistry of imine-based multicomponent reactions (MCRs). *Tetrahedron* v. 67, p.8213-8228, 2011.

CHRISTENSEN, T.; WOELDIKE, H.; BOEL, E.; MORTENSEN, S. B.; HJORTSHOEJ, K.; THIM, L.; HANSEN, M. T. High level expression of recombinant genes in *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology*, v. 6, p. 1419-1422, 1988.

CLARK, J. H. Chapter 1: Introduction. *Handbook of Green Chemistry and Technology* Edited by James Clark, Duncan Macquarrie. Blackwell Science Osney Mead Oxford USA, 2002.

CORRÊA, A. G.; ZUÍM, V. G. Química Verde: Fundamentos e Aplicações. 1 ed. São Carlos: EDUFSCar, v. 1, p. 9-22.1, 2009.

COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. *Química Nova*, São Paulo, v. 22, n. 6, Dec. 1999. Disponível em : <<http://www.scielo.br/scielo>. Acesso em: 26 set. 2011.

COMASSETO, J. V.; ANDRADE, L. H.; OMORIAT A. T.; ASSIS, L. F.; PORTO, A. L. M. Deracernization of aryl ethanols and reduction of acetophenones by whole fungal cells of *Aspergillus terreus* CCT 4083, *A-terreus* CCT 3320 and *Rhizopus oryzae* CCT 4964. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.29, p.55–61, 2004.

COSTELLO, M. Probiotic Foods. *The Food Industry Conference Proceedings, Sydney Convention and Exhibition Centre*, Publ. FoodPro-93, Sydney, p. 12-14, July 1993.

DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: The economic power of the microbe. *Biotechnology Advances*, v.18, p. 499–514, 2000.

DE CONTI R.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R. Biocatálise: Avanços Recentes. *Química Nova*, Brasil, 2001.

DURÁN, N.; CONTI, R.; RODRIGUES, J. A. R. Biotransformations by microorganisms, organisms and enzymes: state of art. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, Chile, v. 45, p. 109-121, 2000.

FABER, K. Biotransformations in Organic Chemistry. 3.ed. *Berlin: Springer-Verlag*, v. 402, 1997.

FABER, K.; PATEL, R. Chemical biotechnology a happy marriage between chemistry and biotechnology: asymmetric synthesis via green chemistry. *Current Opinion Biotechnology*, v.11, p. 517-519, 2000.

FARIAS, L. A.; FÁVARO, D. I. T. Vinte anos de química verde: conquistas e desafios. *Química Nova*, v. 34, nº. 6, p. 1089-1093, 2011.

FENG, X.; SUN, L.; FU, S.; ZOU, Z.; SUN, D. Microbial transformation of 7-epi-10-deacetylbaecatin III to 10-deacetylbaecatin. III *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 64, p. 45–47, 2010.

FOJAN, P.; JONSON, P. H.; PETERSEN, M. T. N. What Distinguishes an Esterase from a Lipase: A Novel Structural Approach. *Biochimie*, v. 82, p. 1033-1041, 2000.

FOLTMANN, B. Ontogeny and characterization of porcine prochymosin, pepsinogen B, progastricsin and pepsinogen A. In *Abstract of the Fifth International Conference on Aspartic Proteinases*. Gifu, Japão. L5/5, 1993.

GAO, L.; XU, J.; LI, X. Optimization of *Serratia marcescens* Lipase Production for Enantioselective Hydrolysis of 3-Phenylglycidic Acid Ester. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 30, p. 252-259, 2004.

GILLILAND, G. L.; WINBORNE, E. L.; NACHMAN, J.; WLO-DAWER, A. The three-dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.3 Å resolution. *Proteins: Structure, Function and Genetics* v.8, p. 82-101, 1990.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, p. 15-32, 2002.

HASAN, F.; SHAH, A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microbial Technology*, v. 39, n.º. 2, p. 235-251, 2006.

HANSCH, C., LEO, A., D. HOEKMAN. Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. Washington, DC: *American Chemical Society*, p. 32, 1995.

HANDBOOK Of Green Chemistry And Technology . Editado por James Clark, Duncan Macquarrie Copyright por Blackwell Science Ltda, 2002.

HE, T.; LI, K.; WU, M. Y.; FENG, X. W.; WANG, N.; WANG, H. Y.; LI, C.; YU, X. Q. Utilization of biocatalytic promiscuity for direct Mannich reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 67, p. 189-194, 2010.

HÖGBERG, H. E.; BERLUNG, P.; EDLUND, H.; FÄGERHAG, J.; HEDENSTRÖM, E.; LUNDH, M.; NORDIN, O.; SERVI, S.; VÖRDE, C. *Catalysis. Today*, v.22, p.591, 1994.

HOLT, G. J.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H.; STANLEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: *Williams & Wilkins*, 787p., 1994.

ILLANES, A. *Biotecnología de Enzimas*, Série Biología no 35, Ediciones Universitarias de Valparaiso, Capítulo 1, Chile, Universidad Católica de Valparaiso, 1994.

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

ISHIHARA, K.; HAMADA, H.; HIRATA, T. NAKAJIMA, N. Biotransformation using plant cultured cells. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.23, p. 145-170, 2003.

JAEGER K. E.; DIJKSTRA B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology*, v. 53, p.315-351, 1999.

JOHNSON, M. E.; LUCEY, J. A Major technological advances and trends in cheese. *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 1174-1178, 2006.

JUARISTI, E.; WILEY, V.C.H. Enantioselective Synthesis of α -Amino acids. New York, NY, 1997.

KIDWAY, M.; JAIN, A.; PODDAR, R.; BHARDWAJ, S. Bis [(L) prolinato-N,O]Zn in acetic acid – water: a novel catalytic system for the synthesis of β -amino carbonyls via Mannich reaction at room temperature. *Applied Organometallic Chemistry*, v.25, p. 335-340, 2011.

KREGER-VANRIJ, N. J. W. Biology and Activities of Yeasts; editados por Skinner, F.A.M. Passmore, S.M. Davenport, R. R. *The Society for Applied Bacteriology Symposium*, Series n^o9, Academic Press, p.28-52, 1980.

LABES, J. R.; WENDHAUSEN, R. Seleção de microorganismos com ação sobre compostos carbonilados gerando alcoóis quirais. *Dynamis revista tecno-científica*, n^o.14 vol.1, p. 73-79, 2008.

LAROIA, S.; MARTIN, J. H. Effect of pH on survival of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in frozen fermented dairy desserts. *Culture Dairy Products Journal*, v.26, n^o.4, p. 13-21, 1991.

LIST, B. Introduction: Organocatalysis. *Chemical Review*, v.107, p. 5413-5417, 2007.

LIST, B.; LERNER, R. A.; BARBAS III, C. F. Proline-Catalyzed Direct Asymmetric Aldol Reactions. *Journal of American Chemical Society*, v.122, p. 2395-2396, 2000.

MARTIN, P.; RAYMOND, M. N.; BRICAS, E.; DUMAS, B. R. Kinetic studies on the action of *Mucor pusillus*, *Mucor miehei* acid proteases and chymosins A and B on a synthetic chromophoric hexapeptide. *Biochemistry Biophysical Acta*, v. 612, p. 410-420, 1980.

MATSUMAE, H.; FURUI, M.; SHIBATANI, T. Lipase-Catalyzed Asymmetric Hydrolysis of 3-Phenylglycidic Acid Ester, the Key Intermediate in the Synthesis of Diltiazem Hydrochloride. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 75, p. 93-98, 1993.

MOHANTY, A. K.; MUKHOPADHYAY, U. K.; KAUSHIK, J. K.; GROVER, S.; BATISH, V. K. Isolation, purification and characterization of chymosin from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal of Dairy Science*, v. 70, p. 37-43, 2003.

NEWMAN, M.; SAFRO, M.; FRAZAO, C.; KHAN, G.; ZDANOV, A.; TICKLE, I. J.; BLUNDELL, T. L.; ANDREEVA, N. X-ray analyses of aspartic proteinases IV: Structure and refinement at 2.2 \AA resolution of bovine chymosin. *Journal of Molecular Biology*, v. 221, p. 1259-1309, 1991.

NEUBERG, C.; WELDE, E. *Biochemistry*. v.60, p. 472, 1941.

OLIVEIRA, A. C. Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, microencapsulados por coacervação, seguida de secagem por 'spray drying' e leite de jorro. 2007. Dissertação (Mestrado em Medicamentos e Cosméticos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007. Disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-10052007-103644/>. Acesso em: 2012-02-17.

OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. *Química Nova*, v. 32, N^o. 3, 742-756, 2009.

PAIVA, A L., BALCÃO, V. M., MALCATA, F.X., "Kinetics and mechanics of reactions catalysed by immobilized lipases", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, p. 187-204, 2000.

PALOMO, J. M.; SEGURA, R. L.; MATEO, C.; TERRENI, M.; GUISAN, J. M; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Properties of lipases including stability, specific activity, and substrate specificity. *Tetrahedron Asymmetry*, v. 16, p. 869–874, 2005.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 29(2), p.119:31, 1999.

PIOVAN, L.; KAGOHARA, RICCI, L. C.; KEPPLER, A. F.; CAPELARI, M.; ANDRADE, L. H.; COMASSETO, J. V.; PORTO, A. L. M. Chemoselective screening for the reduction of a chiral functionalized (\pm)-2-(phenylthio)cyclohexanone by whole cells of Brazilian micro-organisms. *Tetrahedron: Asymmetry*, v.19, p. 2385–2389, 2008.

RAI, U. S.; SHETTY, A. M. I. P.; ISLOOR, N.; MALLADI, S.; FUN, H. K. Synthesis and biological evaluation of aminoketones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, p. 6090-6094, 2010.

RAMOS, A. S.; RIBEIRO, J. B.; VAZQUEZ, L.; FIAUX, S. B.; LEITE, S. G. F.; RAMOS, M. C. K. V.; NETO, F. R. A.; ANTUNES, O. A. C. Immobilized microorganisms in the reduction of ethyl benzoylacetate. *Tetrahedron Letters*, v.50, p. 7362–7364, 2009.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review *Advances in Colloid and Interface Science*, p. 147–148 e 237–250, 2009.

REETZ, M. T. Directed Evolution of Enantioselective Enzymes as Catalysts for Organic. Synthesis *Advanced Catalysis*, v. 49, p. 61–69, 2006.

REETZ, M. T. Lipases as practical biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 6, p.145–150, 2002.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 64, p. 1-22, 2010.

RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. D. Recent Advances in The Biocatalytic Asymmetric Reduction Of Acetophenones And α , β - Unsaturated Carbonyl Compounds. *Food Technology Biotechnology*, v. 42 (4), p. 295-303, 2004

ROSENBLUM, S. B.; HUYNH, T.; AFONSO, A.; JR. DAVIS, H. R.; YUMIBE, N.; CLADER, J. W.; BURNETT, D. A. Discovery of 1-(4-Fluorophenyl)-(3R)-[3-(4-fluorophenyl)-(3S)- hydroxypropyl]-(4S)-(4-hydroxyphenyl)-2-azetidinone (SCH 58235): A Designed, Potent, Orally Active Inhibitor of Cholesterol Absorption. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 41(6), p. 973-980, 1998.

SCHIMID, A.; HOLLMANN, F.; PARK, J. B. The Use of Enzymes in the Chemical Industry in Europe. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, p. 359- 366, 2002.

SHAH, N. P.; WARNAKULASURIYA E. V.; BRITZB, L. M. L.; KYLE, W. S. A. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in Commercial Yoghurt During Refrigerated Storage. *Dairy Journal*, v. 15, p. 515-521, 1995.

SHELDON, R. A. In Chirotecnology, Industrial Synthesis of Optically Active Compounds, *Marcel Dekker*: New York, 1993.

SHELDON, R.A.; ARENDS, I; HANEFELD, U. Green Chemistry and Catalysis. *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim*, Germany, 2007.

SILVA, R. A. Aminação redutiva de aldeídos e cetonas promovida por Zinco em meio aquoso. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química. UFPE, Recife/PE, junho de 2007.

STRAATHOF, A. J. J.; PANKE, S.; SCHIMID, A. The Production of Fine Chemical by Biotransformation. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, p. 548-556, 2002.

TEMBA, E. S. C.; OLIVEIRA, I. M. F.; DONNICI, C. L. Álcoois quirais: métodos químicos e catalíticos de obtenção por redução assimétrica. *Química Nova*, v.26, n.1, p.112-122, 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. Porto Alegre: ARTMED, 894p., 2007.

TRAMPER, J. Chemical versus biochemical conversion: when and how to use biocatalysts. *Biochemistry and Bioengineering*, v.52(2), p. 345-376, 1996.

TROST, B. M.; TERRELL, L. R. A Direct Catalytic Asymmetric Mannich-type Reaction to syn-Amino Alcohols. *Journal of the American Chemical Society*, v. 125 (2), p. 338-339, 2003.

VERKADE, J. M. M.; HEMERT, L. J. C.; PETER J. L. M. Organocatalysed asymmetric Mannich reactions Quaedflieg and Floris P. J. T. Rutjes. *Chemical Society Review*, v.37, p. 29, 2008.

VERKADE, J. M. M.; LIEKE, J. C.; HEMERT, V.; PETER J. L. M.; QUAEDFLIEG, P. J. T.; FLORIS P. J. T. Rutjes cheminform abstract: *Organocatalyzed asymmetric Mannich reactions*, v. 39, Issue 17, p. 22, 2008.

VERSCHUEREN, K. Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals. v. 1-2. 4th ed. *John Wiley & Sons*, New York, NY. p. v1: 212, 2001.

VIEIRA, G. A. B.; ARAÚJO, D. M. F. A; LEMOS, T. L. G.; MATTOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; MELO, V. M. M.; GONZALO, G., FERNÁNDEZ, V. G.; GOTOR, V. Candida tropicalis CE017: A New Brazilian Enzymatic Source for the Bioreduction of Aromatic Prochiral Ketones. *Southern Brazilian Journal of Chemistry*, Vol. 00, No. 00, 1-8, Printed in Brazil - ©2010 Sociedade Brasileira de Química 0103 – 5053, 2010.

WANG, Z.; DAÍ, Z. Extractive microbial fermentation in cloud point system. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, p.407–418, 2010.

WESCOTT, C. R.; NORITOMI, H.; KLIBANOV, A. M. Rational Control of Enzymatic Enantioselectivity through Solvation Thermodynamics. *Journal of the American Chemical Society*, v.118 (43), p. 10365–10370, 1996.

WEINHEIM, Enantioselective Synthesis of β -Amino Acids (Ed.: E. Juaristi). *Wiley-VCH, Weinheim*, 1960.

WENDHAUSEN Jr., R.; CRUZ, A.; FRIGATO, M. R.; PINHEIRO, H.; FERNANDES, P. Estudo sobre utilização de crisotila como suporte de célula de *Saccharomyces cerevisiae* para o uso em processo contínuo de fermentação alcoólica e biorreduções. Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, SP, 1998.

WENDHAUSEN Jr., R; RISCH, D. H.; HODAPP, M. J. Biorredução de 4-Amino-Acetofenona intermediária por células de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 3174 conduzida em regime contínuo em biorreatores. In: 28. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas – MG. Livro de Resumos. P. TC 042, 2005.

WEIZMANN, C. *US Pat. 1,315,585* 1919; <http://www.freepatentsonline>.

WITTCOFF, H. A.; REUBEN, B. G. Industrial Organic Chemicals. *John Wiley & Sons*: New York, 531p., 1996.

WILKE, D. Chemicals from biotechnology: molecular plant genetics will challenge the chemical and the fermentation industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 52, p.135–145. 1999.

WONG, C. H.; WHITESIDES, G. M. Enzymes in synthetic organic chemistry. 1^a ed. *Oxford, Pergamon*, 1994.

WONG, C. H.; WHITESIDES, G. M. Enzymes in Synthetic Organic Chemistry. *Tetrahedron Organic Chemistry*, Series 12, Pergamon: Oxford, 1995.

WOHLGEMUTH, R. Biocatalysis — key to sustainable industrial chemistry. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 21, Issue 6, p. 713-724, dezembro, 2010.

YADAV, J. S.; REDDY, B. V. S.; SHANKAR, K. S.; PREMALATHA, K.; SWAMY, T. Iodine/EtOH: A Novel and Versatile Catalyst for the Synthesis of α -Amino Ketones via Three Component Reaction. *Letters in Organic Chemistry*, v.5, p. 353-359, 2008.

YAZBECK, D. R.; MARTINEZ, C. A.; HU, S.; TAO, J. Challenges in the development of an efficient enzymatic process in the pharmaceutical industry. *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 15, p. 2757–2763, 2004.

YALKOWSKY, S. H.; HE, Y. Handbook of Aqueous Solubility Data: An Extensive Compilation of Aqueous Solubility Data for Organic Compounds Extracted from the AQUASOL DATABASE. CRC Press LLC, Boca Raton, FL., p. 403, 2003.

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

ZAPATA, M.; GAUD, R. Estrategias para diferenciar *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli* con sales inorgânicas. *Agronomía mesoamericana*, v. 12(1), p. 01-07, 2001.

9. MEMORIAL DAS ATIVIDADES

9.1 TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO

LIMA, A. C. S.; DOMINGUES, N. L. C.; RINALDI, A. W.; SILVA, W. P.; SILVA, C. T. P.; GARCIA, R. H. S.; OLIVEIRA, A. R.; SILVA, É. C.; ARRUDA, E. J.; FRESCHI, G. P. G. Some applications of hybrid materials derived from N-salicylidene-aniline. Hybrid Materials, 2011 – Strasbourg, France.

LIMA, A. C. S.; NETO, M. D. S.; SILVA, G. R.; SILVA, C. T. P.; GONÇALVES, W. D. G.; FRESCHI, G. P. G.; RINALDI, J. C.; DOMINGUES, N. L. C.; RINALDI, A. W. Synthesis and characterization of hybrid materials constituted by nanostructures and conducting polymers. Hybrid Materials, 2011 – Strasbourg, France.

LIMA, A. C. S.; GARCIA, R. H. S.; OLIVEIRA, A. R.; SILVA, É. C.; REIS, D. L. S.; ARANHA, B. S. R.; FIGUEIREDO, D. U.; RINALDI, A. W.; DOMINGUES, N. L. C. Biotransformação de cetonas baseada em processos de redução microbiológica. Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011 – Florianópolis, Santa Catarina.

LIMA, A. C. S.; GARCIA, R. H. S.; OLIVEIRA, A. R.; SILVA, É. C.; SCHNEIDER, N. T.; SILVA, W. P.; RINALDI, A. W.; DOMINGUES, N. L. C. Estudo comparativo de biorredução de cetonas empregando vegetais do cerrado. Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011 – Florianópolis, Santa Catarina.

LIMA, A. C. S.; GARCIA, R. H. S.; OLIVEIRA, A. R.; SILVA, É. C.; REIS, D. L. S.; ARANHA, B. S. R.; FIGUEIREDO, D. U.; RINALDI, A. W.; DOMINGUES, N. L. C. Estudo de biorredução de cetonas empregando vegetais do cerrado. Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química da região Sul, 2010 – Curitiba, Paraná.

ARANHA, B. S. R.; OLIVEIRA, A. R.; LIMA, A. C. S.; FIGUEIREDO, D. U.; REIS, D. L. S.; SILVA, É. C.; GARCIA, R. H. S.; RINALDI, A. W.; DOMINGUES, N. L. C. Utilização da quimiosina como catalisador nas reações de Mannich. Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011 – Florianópolis, Santa Catarina.

OLIVEIRA, A. R.; GARCIA, R. H. S.; LIMA, A. C. S.; ARANHA, B. S. R.; FIGUEIREDO, D. U.; SILVA, É. C.; RINALDI, A. W.; DOMINGUES, N. L. C. Síntese e estudo das propriedades espectroscópicas de materiais híbridos advindos de algumas bases de Mannich. Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011 – Florianópolis, Santa Catarina.

GARCIA, R. H. S.; OLIVEIRA, A. R.; FIGUEIREDO, D. U.; SILVA, É. C.; LIMA, A. C. S.; REIS, D. L. S.; ARANHA, B. S. R.; RINALDI, A. W.; DOMINGUES, N. L. C. "Emprego de algumas oxazolidinas quirais como catalisadores na reação de Mannich " Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011 – Florianópolis, Santa Catarina.

LIMA, A. C. S.; DOMINGUES, N. L. C. Síntese de novos derivados de beta-aminocetonicos via reação de Mannich a partir de catálise enzimática. Enepe 2011 Dourados/MS.

REIS, D. L.; LIMA, A. C. S.; GARCIA, R. H. S.; OLIVEIRA, A. R.; SILVA, É. C.; RINALDI, A. W.; DOMINGUES, N. L. C. Emprego do banho ultrasônico nas reações de Mannich. Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011 – Florianópolis, Santa Catarina.

9.2 CRÉDITOS EXIGIDOS PELO PROGRAMA

Total de créditos exigidos pelo programa: 28

- Disciplinas obrigatórias: 4
- Disciplinas optativas: 14
- Seminários: 2
- Estágio Docência: 2
- Dissertação: 6

9.3 CRÉDITOS CUMPRIDOS

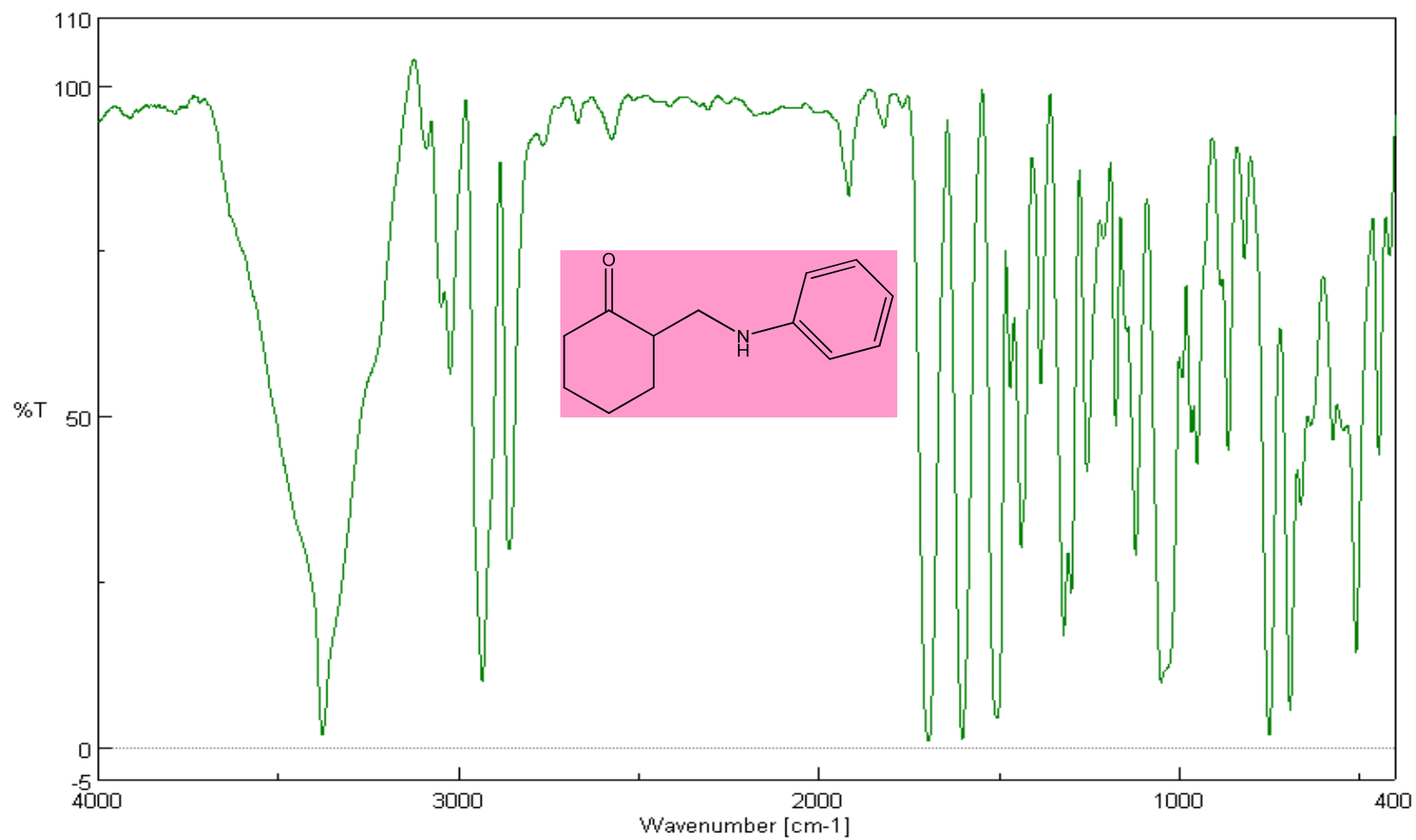
- Total de créditos cumpridos: 33
- Disciplinas obrigatórias: 4

Disciplina	Créditos	Carga Horária	Conceito
Inovação Biotecnológica	2	30h	A
Meio Ambiente e Tecnologia	2	30h	A

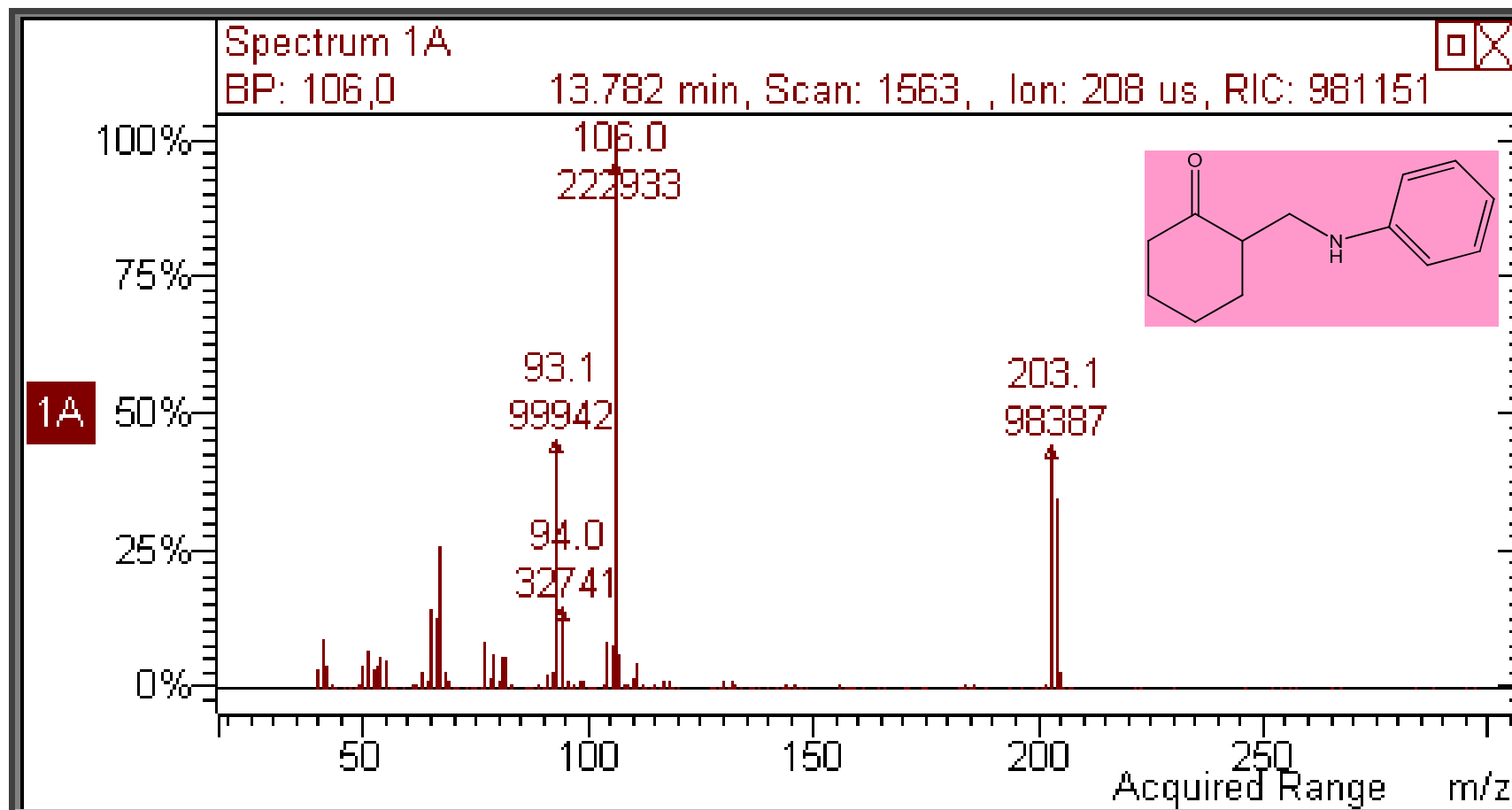
- Disciplinas optativas: 19
- Seminários: 2
- Estágio Docência: 2
- Dissertação: 6

Disciplina	Créditos	Carga horária	Conceito
Ciências dos Materiais I	4	60h	A
Determinação Estrutural de Compostos Orgânicos	4	60h	A
Microbiologia Ambiental	3	45h	A
Fundamentos de Química Verde	4	60h	A
Introdução à Técnicas Aplicadas ao Monitoramento Ambiental	4	60h	A
Seminários	2	30h	A
Estágio Docência	2	30h	A
Dissertação	6	-	-

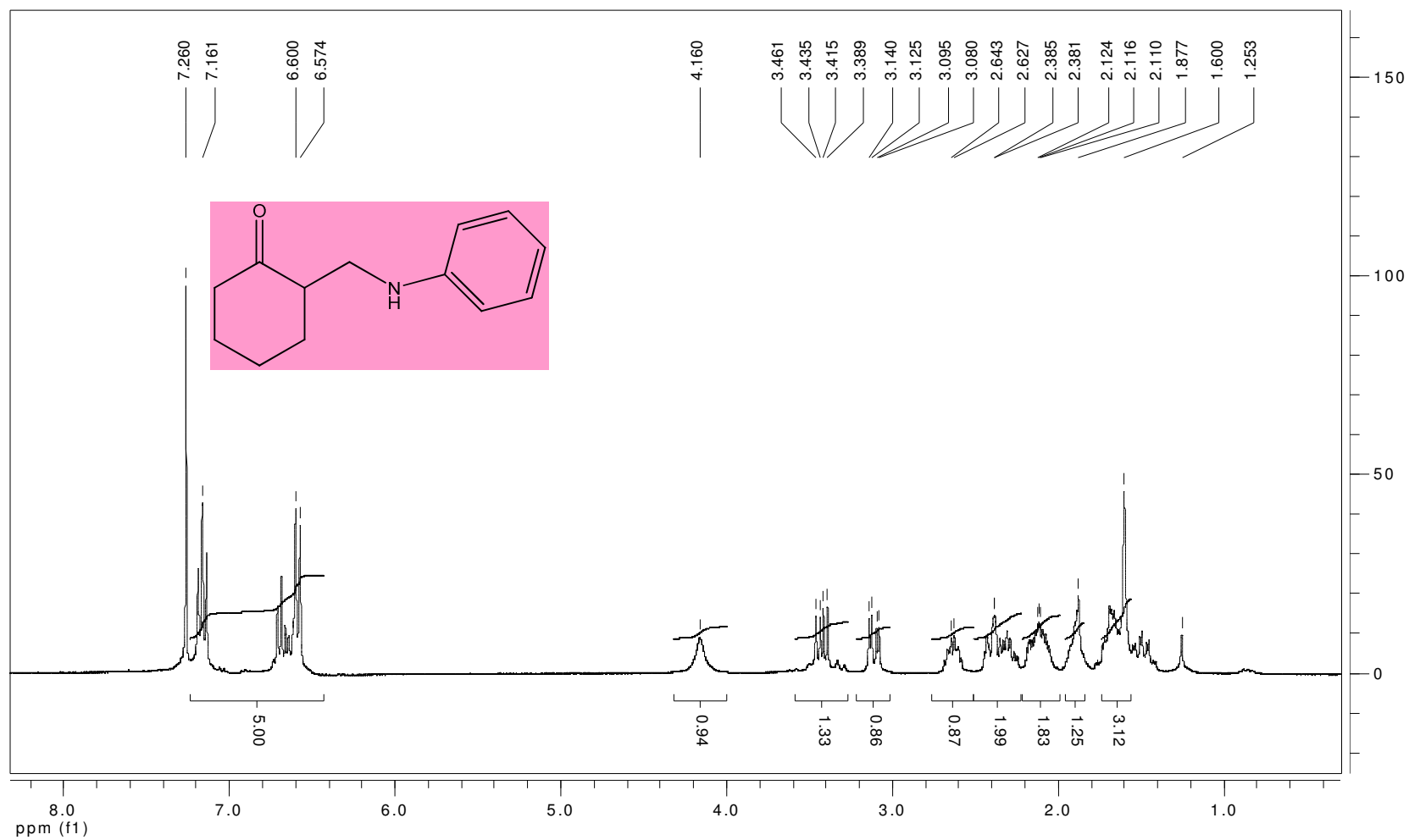
10. ANEXOS



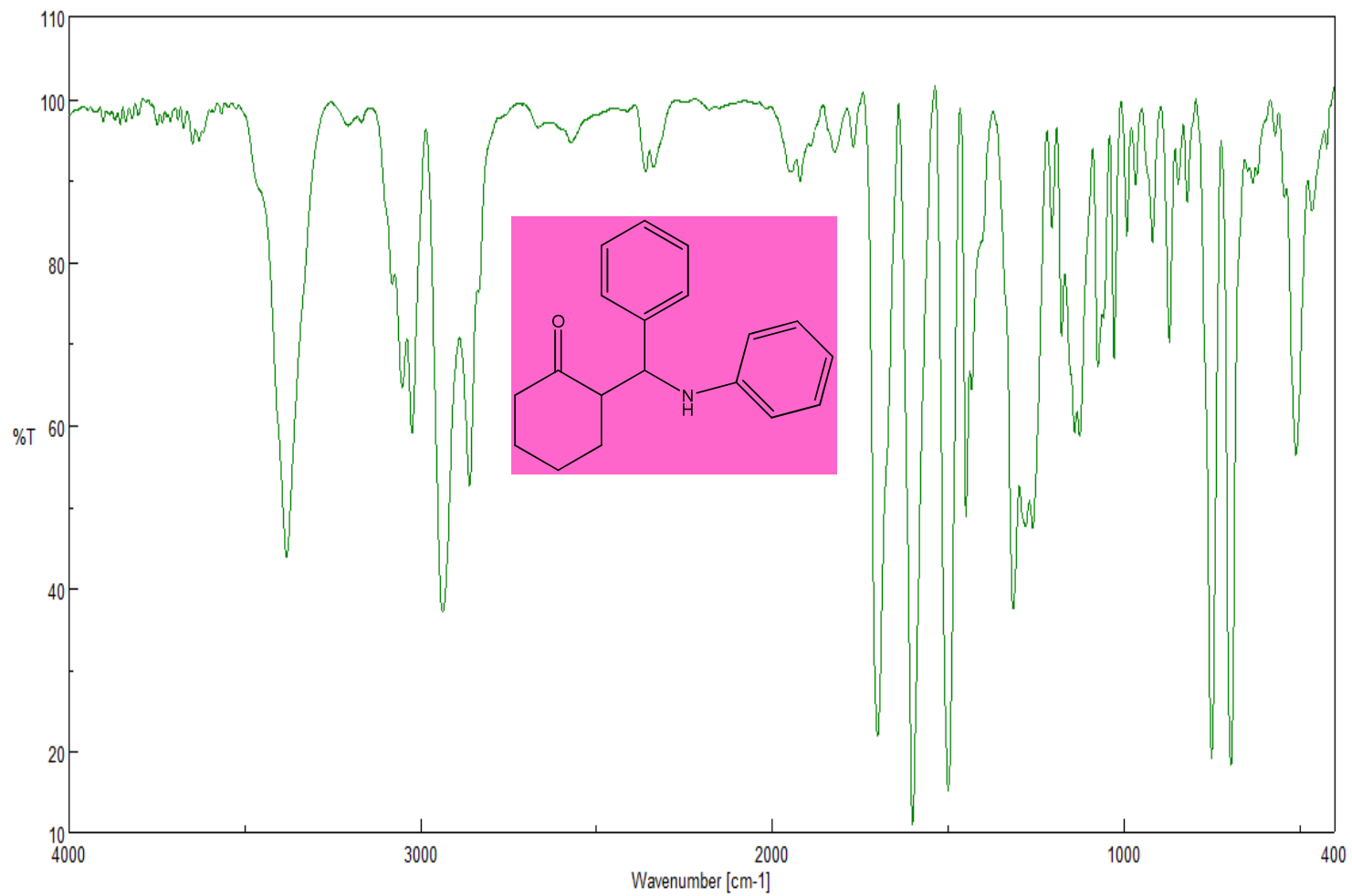
ANEXO A - Espectro de infravermelho do composto 2-[(N-fenilamino)metil]ciclohexanona em KBr.



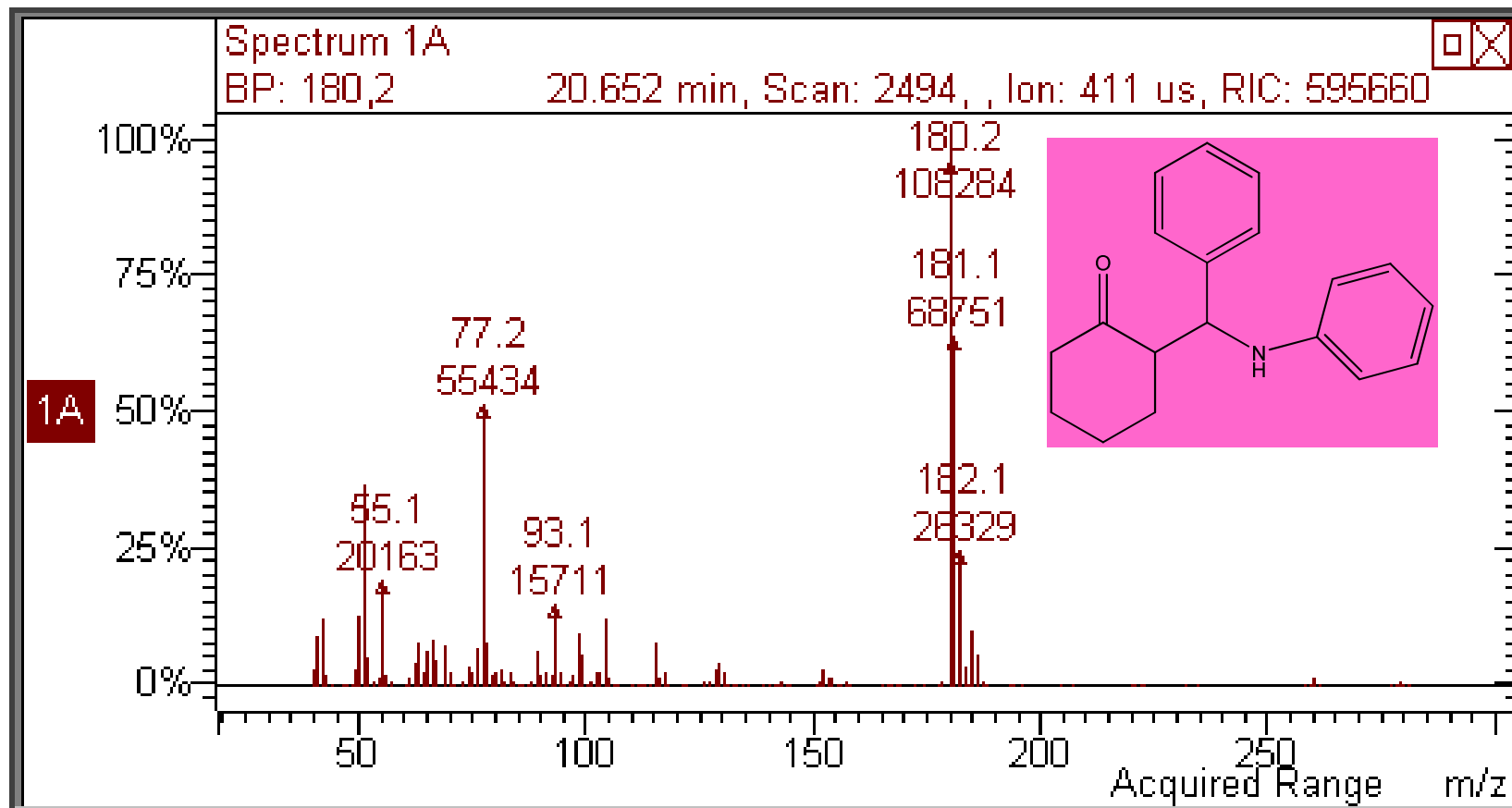
ANEXO B - Cromatograma do composto 2-[(N-fenilamino)metil]ciclohexanona.



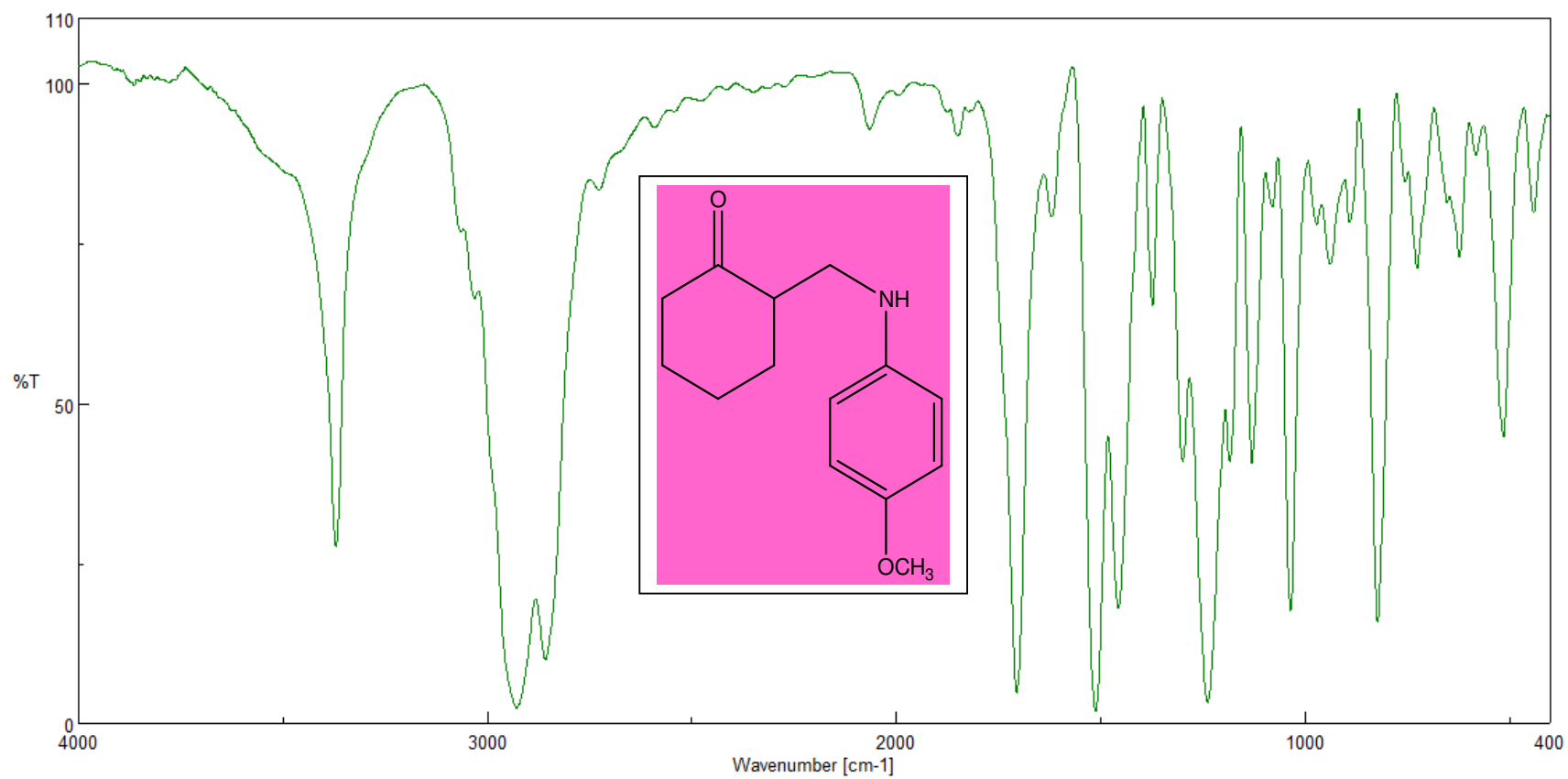
ANEXO C - Espectro de RMN do composto 2-[(N-fenilamino)metil]ciclohexanona em CDCl_3 .



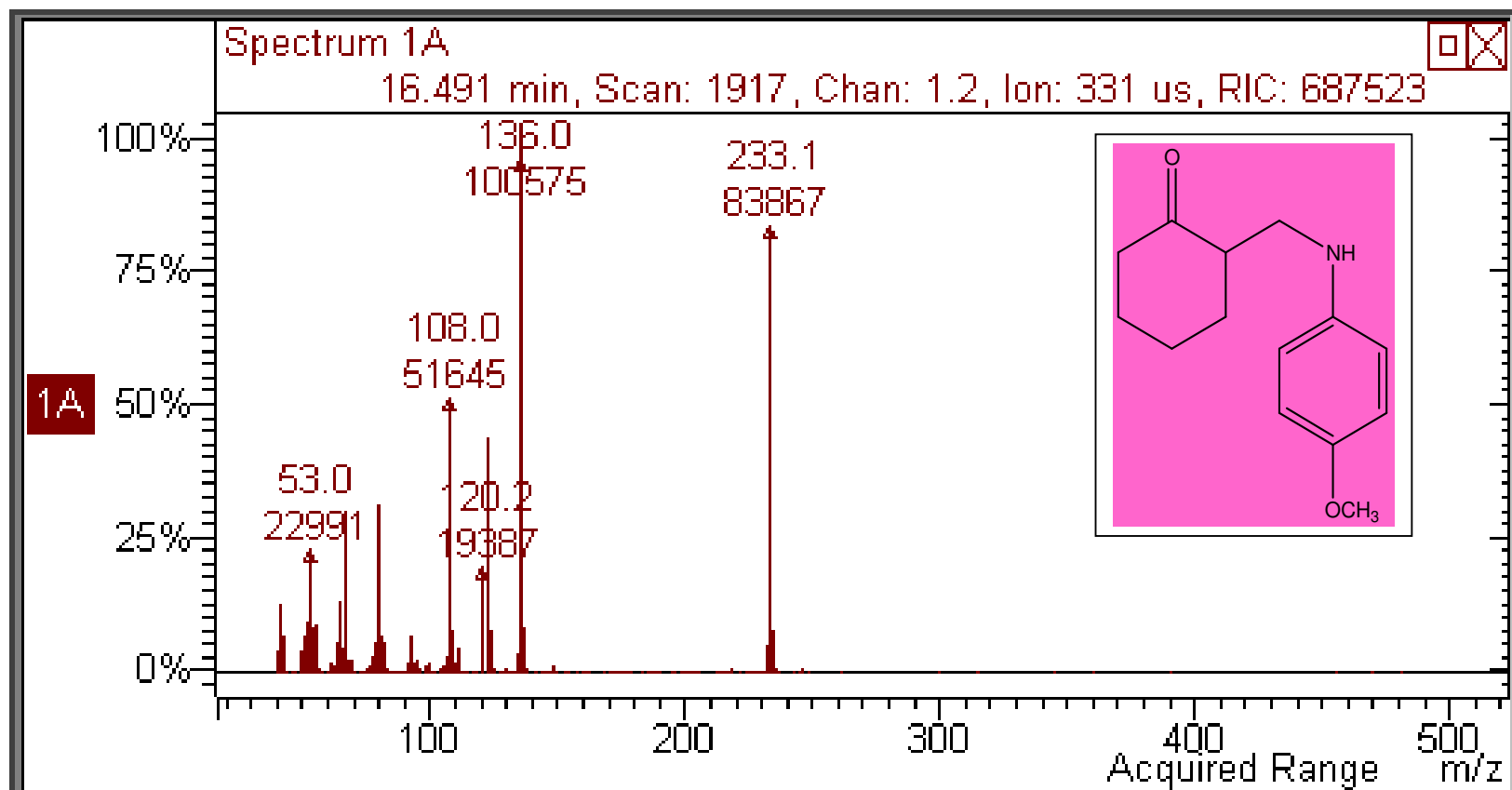
ANEXO D - Espectro de infravermelho do composto 2-[(fenil)-(fenilamino)-metil]-ciclohexanona em KBr.



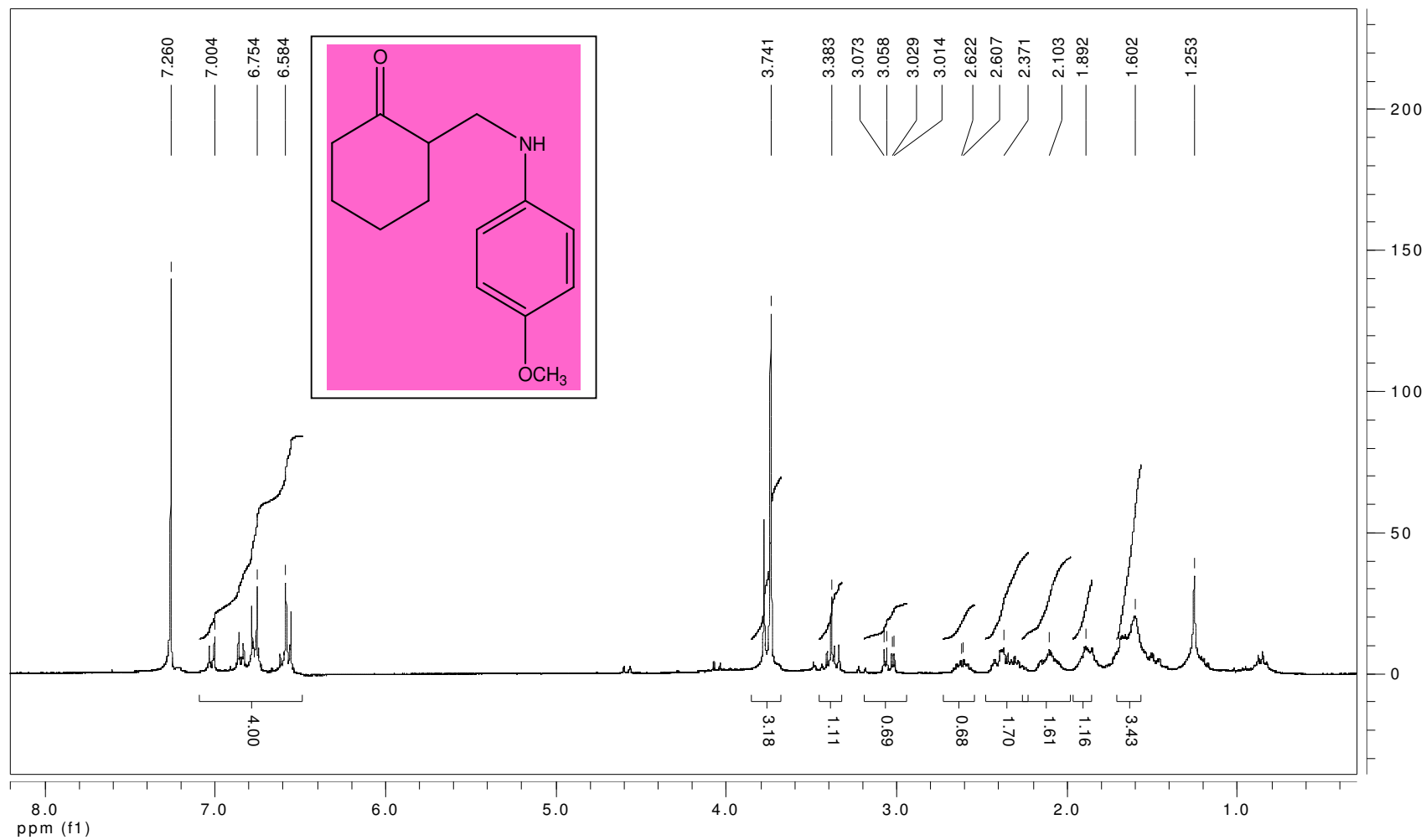
ANEXO E - Cromatograma do composto 2-[(fenil)-(fenilamino)-metil]-ciclohexanona.



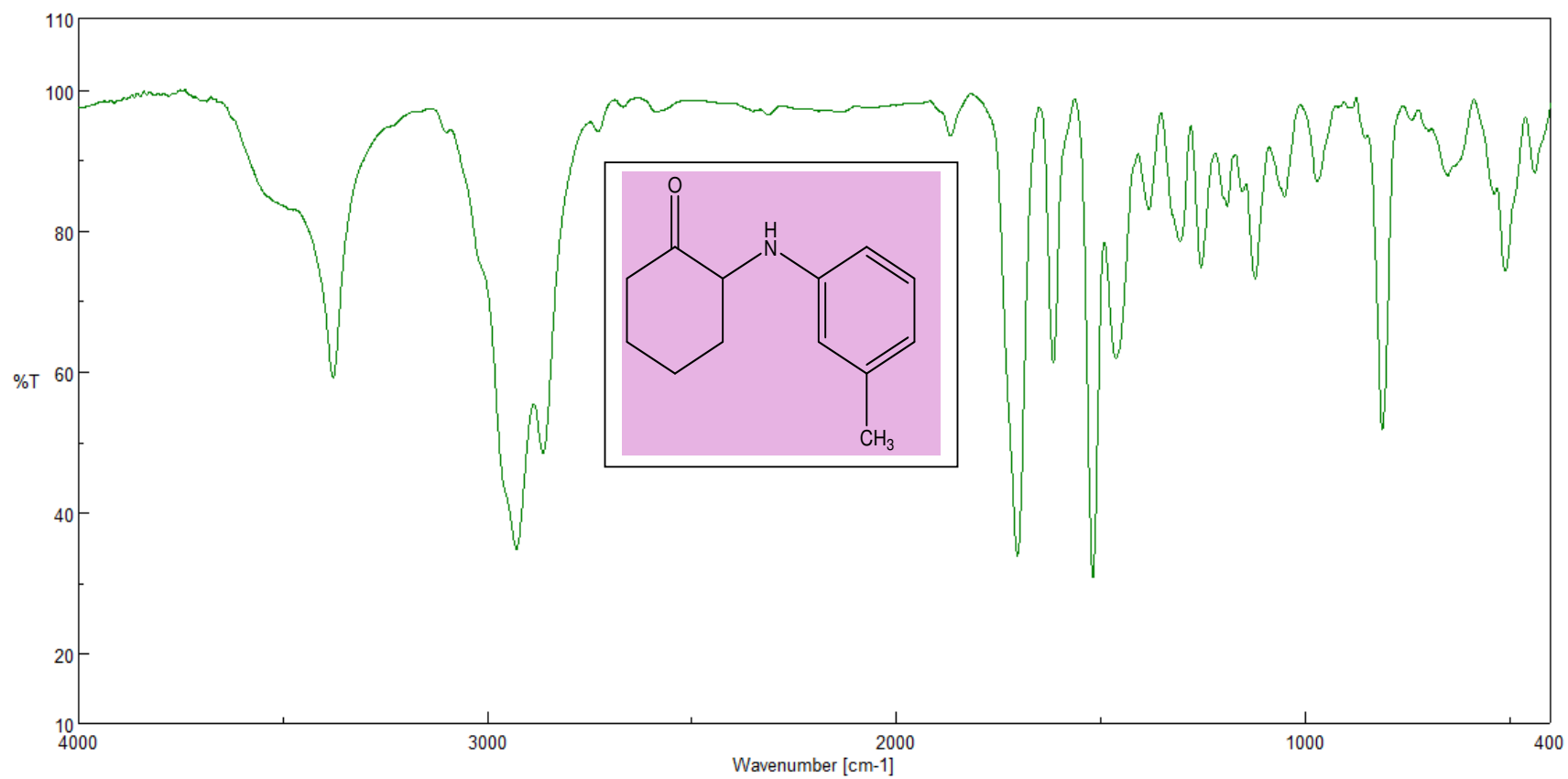
ANEXO F - Espectro de infravermelho do composto 2-[(4'-metóxi-fenilamino)-metil]-ciclohexanona em KBr.



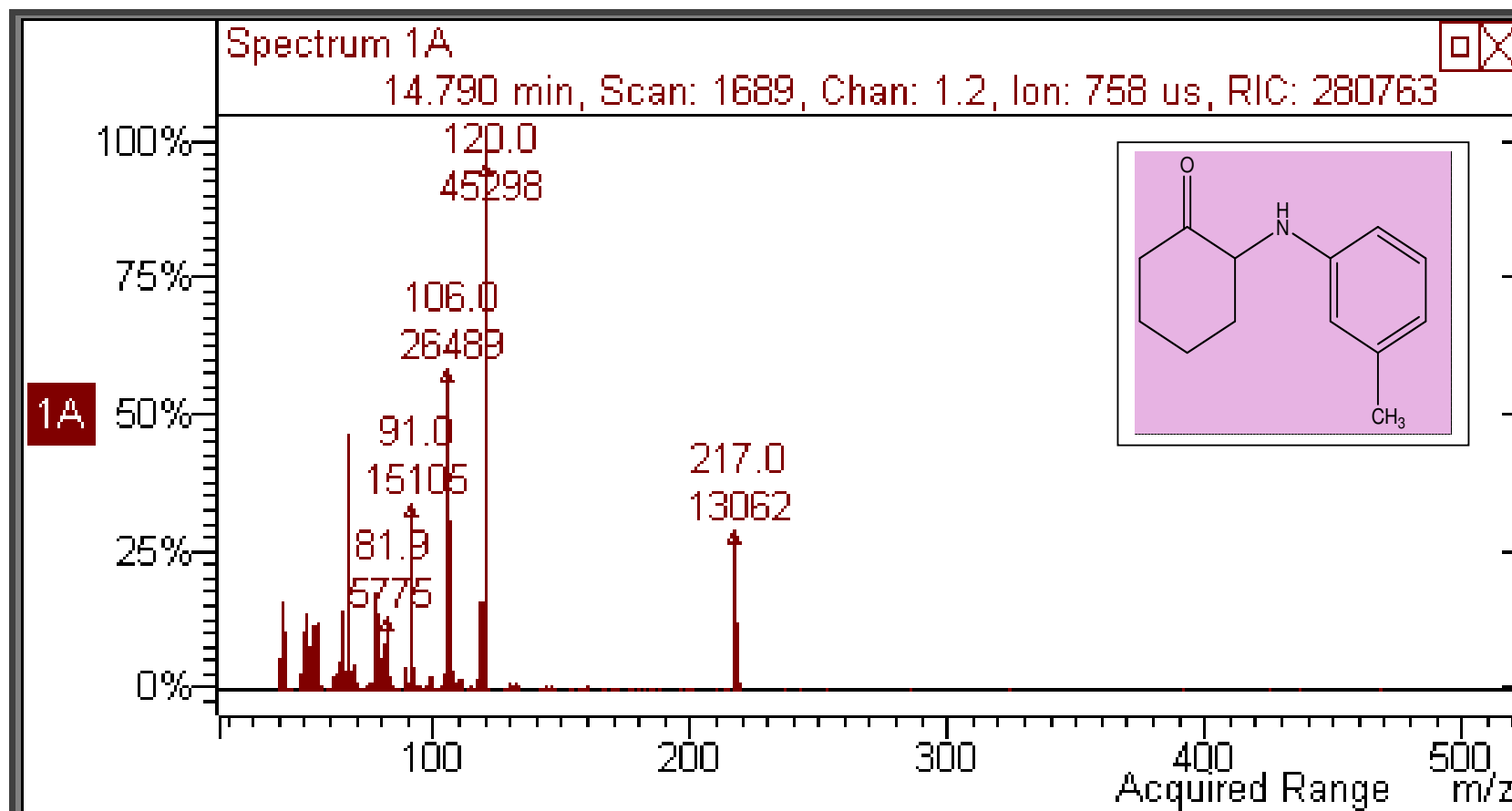
ANEXO G - Cromatograma do composto 2-[(4'-metóxi-fenilamino)-metil]-ciclohexanona.



ANEXO H - Espectro de RMN do composto 2-[(4'-metóxi-fenilamino)-metil]-ciclohexanona em CDCl₃.



ANEXO I - Espectro de infravermelho do composto 2-[(4'-metil-fenilamino)-metil]-ciclohexanona em KBr.



ANEXO J - Espectro de massa do composto 2-[(4'-metil-fenilamino)-metil]-ciclohexanona.