



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



**VALMORE HENRIQUE PEREIRA DOS SANTOS**

**FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Handroanthus impetiginosus* COMO BIOCATALISADORES ESTEREOSELETIVOS EFICIENTES PARA A PRODUÇÃO DE BLOCOS CONSTRUTORES QUIRAIS**

Salvador

2020

**VALMORE HENRIQUE PEREIRA DOS SANTOS**

**FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Handroanthus impetiginosus* COMO BIOCATALISADORES ESTEREOSSELETIVOS EFICIENTES PARA A PRODUÇÃO DE BLOCOS CONSTRUTORES QUIRAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eliane de Oliveira Silva

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Valéria Belli Riatto

Salvador  
2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

dos Santos, Valmore Henrique Pereira

FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE  
*Handroanthus impetiginosus* COMO BIOCATALISADORES  
ESTEREOSSELETIVOS EFICIENTES PARA A PRODUÇÃO DE  
BLOCOS CONSTRUTORES QUIRAIS / Valmore Henrique  
Pereira dos Santos. -- Salvador, 2020.

153 f.: il

Orientadora: Eliane de Oliveira Silva.  
Coorientadora: Valéria Belli Riatto.

Dissertação (Mestrado - Química) -- Universidade  
Federal da Bahia, Instituto de Química, 2020.


1. Biotransformação. 2. *T. Purpurogenus* H4. 3.  
Fungos filamentosos. I. Silva, Eliane de Oliveira. II.  
Riatto, Valéria Belli. III. Título.


TERMO DE APROVAÇÃO

VALMORE HENRIQUE PEREIRA DOS SANTOS

“FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *HANDROANTHUS IMPETIGINOSUS* COMO BIOCATALISADORES ESTEREOSSELETIVOS EFICIENTES PARA A PRODUÇÃO DE BLOCOS CONSTRUTORES QUIRAIS”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Eliane de Oliveira Silva   
Doutorado em Ciências, Universidade de São Paulo (USP)  
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Mauricio Moraes Victor   
Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)  
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Douglas Fernando Rambo   
Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
Universidade Federal da Bahia

Salvador, 14 de janeiro de 2020.

## **AGRADECIMENTOS**

Às agências FAPESB, CAPES e CNPq, pelo fomento fornecido para a realização deste trabalho;

À minha orientadora, Eliane Silva (minha mãe científica), um agradecimento mais do que especial pelos ensinamentos, companheirismo, laço de amizade construído, pelas oportunidades, por contribuir grandiosamente para o meu desenvolvimento profissional e pessoal, enfim, por todo suporte dado, serei eternamente grato;

À minha co-orientadora, Valéria Riatto, obrigado pelas contribuições;

Aos professores Maurício Victor, Jorge David e Sílvio Cunha, por estarem sempre de portas abertas dando suporte através de seus equipamentos para que as análises desse trabalho pudessem ser realizadas;

Aos meus amigos de laboratório (irmãos científicos), Daniel, Amanda, Bruno, Rodrigo e Lucas, agradeço pelas trocas de aprendizado e os momentos de descontração ao longo desse tempo;

Aos eternos amigos do laboratório 507 nas pessoas de Fabrícia, Suelém, Eunice e Thayane, pelas trocas de conhecimentos, resenhas, e os melhores serviços de alimentação fornecidos todas as manhã e no tradicional café da tarde, com vocês por perto qualquer caminhada se torna mais leve;

Aos meus amigos do CIENAM (Laboratório 10), Juliana, Gabriel, Vivi e Carla, responsáveis pelos melhores momentos na hora do almoço, as resenhas e principalmente pelos suportes científicos;

Aos meus queridos amigos da UFBA, Akácia, Bruna, Léo e Ícaro, os mitos do IQ, obrigado pela amizade, companheirismo e por serem bons cientificamente, quero ter vocês por perto ao longo da vida;

Ao meu amor, Cássio Sousa, por todo companheirismo, paciência, solidariedade, cumplicidade e conselhos, você foi fundamental nessa trajetória.

## DEDICATÓRIA

*À minha mãe, Eliane  
Pereira fonte inesgotável de  
todo o meu amor e  
inspiração.*

## RESUMO

Recentemente, grande atenção tem sido dada à síntese enantiosseletiva de compostos opticamente puros, utilizando metodologias ecológicas, devido à crescente demanda por medicamentos modernos, ingredientes alimentares e agroquímicos. Álcoois opticamente puros são úteis como blocos de construção para a síntese de compostos bioativos e podem ser transformados em outras funcionalidades sem racemização. As transformações químicas mediadas por células inteiras de micro-organismos têm algumas vantagens sobre os procedimentos químicos clássicos, incluindo baixo custo, alta versatilidade e eficiência quimio-, régio- e estereosseletiva. O objetivo deste estudo foi identificar novas cepas endofíticas para serem usadas como biocatalisadores na redução de cetonas pró-quirais à álcoois quirais com excelentes taxas de conversão (Conv.) e excesso enantiomérico (e.e.). Sete linhagens de fungos endofíticos foram isoladas das folhas de *Handroanthus impetiginosus* (Ipê roxo) e mostraram estereosseletividade na conversão de acetofenona (**21**) em 1-feniletanol (**21a**). Inicialmente, os resultados mostraram que todas as cepas reduziram **21**, porém em diferentes graus de conversão e e.e. Dentre as avaliadas, *Talaromyces purpurogenus* H4 apresentou excelente desempenho com excelente conversão (> 99,9%) e bom e.e. (82,8%). *T. purpurogenus* H4 revelou uma preferência pela formação de (S)-1-feniletanol, que pode ser usado como precursor da síntese de aromas naturais. Visando aumentar as taxas de conversão e excesso enantiomérico da biorredução de **21**, foi realizado um estudo de otimização analisando os parâmetros: pH do meio, tempo reacional, temperatura da reação, co-solvente, quantidade de substrato e a quantidade de fungo empregada. A reação realizada nas condições otimizadas apresentou (%Conv.) e (%e.e.) equivalentes a 97% e 96%, respectivamente. As condições otimizadas foram testadas na biotransformação de 6 (seis) derivados da acetofenona, dentre os estudados, a 4'-nitroacetofenona (**25**) apresentou a maior taxa de conversão (52,2%), e a 4'-metóxiacetofenona (**24**) o maior excesso enantiomérico (91,0%). A reação em escala preparativa foi realizada apenas para **21**, resultando num rendimento isolado de 73% e e.e de 96%. Esses resultados tornam o *T. purpurogenus* H4 um candidato interessante na síntese destes e de outros precursores quirais.

Palavras chave: Biotransformação. *T. purpurogenus* H4. Fungos filamentosos.

## ABSTRACT

Recently, great attention has been paid to the enantioselective demonstration of optically pure compounds, using ecological methods, due to the growing demand for modern medicines, food ingredients and agrochemicals. Optically pure alcohols are useful as building blocks for samples of bioactive compounds and can be transformed into other functionalities without racemization. Chemical transformations mediated by whole cells of microorganisms have some advantages over chemical procedures, including low cost, high versatility and chemical chemistry, regal and stereoselective. The aim of this study was to identify new endophytic cepes for use as biocatalysts in the reduction of pro-chiral ketones to chiral alcohols with high conversion rates (Conv.) And enantiomeric excess (e.e.). Seven lines of endophytic fungi were isolated from the leaves of *Handroanthus impetiginosus* (Ipê purple) and showed stereoselectivity in the conversion of acetophenone (**21**) into 1-phenylethanol (**21a**). Initially, the results show all the reduced strains **21**, but in different degrees of conversion e.e. In addition, *Talaromyces purpurogenus* H4 shows excellent performance with excellent conversion (> 99.9%) and good e.e. (82.8%). *T. purpurogenus* H4 showed a preference for the formation of (S) -1-phenylethanol, which can be used as a precursor to the exposure of natural aromas. Aiming to increase conversion rates and excess bioreduction value by **21**, an optimization study was carried out analyzing the parameters: pH of the medium, reaction time, reaction temperature, co-solvent, amount of substrate and amount of fungus used. The reaction performed under the optimized conditions presented (% Conv.) e (% e.e.) equals 97% and 96%, respectively. The optimized conditions were tested in the biotransformation of 6 (six) acetophenone compounds, among those studied, a 4'-nitro-acetophenone (**25**) exhibited the highest conversion rates (52.2%) and 4'-methoxy-acetophenone (**24**) the largest enantiomeric excess (91.0%). A preparative scale reaction was performed only for **21**, resulting in an isolated yield of 73% e.e. 96%. These results make *T. purpurogenus* H4 an interesting candidate in demonstrating these and other chiral precursors.

Keywords: Biotransformation. *T. purpurogenus* H4. Filamentous fungi.



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química das substâncias huperzina B (hupB) (1), 8 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -epoxi-superzina B (2), 16-hidroxi-superzina B (3) e carinatumina B (4).....	3
Figura 2: Estrutura química da huperzina A (hupA) (5).....	4
Figura 3: Representação da estrutura morfológica de fungos filamentosos compostos por hifas septadas.....	5
Figura 4: Processo de crescimento das hifas a partir de um esporo.....	5
Figura 5: Estrutura química da 1,2-difenil-etanodiona (11), (S)-2-hidroxi-1,2-difeniletanona (12) e (1S,2S)-1,2-difenil-1,2-etanodiol (13).....	10
Figura 6: Curva de energia para uma dada reação com e sem adição de um catalisador.....	12
Figura 7: Mecanismo de inibição irreversível da PGHS pela aspirina (FRAGA, 2001).....	16
Figura 8: Modelo chave-fechadura representativo das interações enzima-substrato.....	17
Figura 9: Representação tridimensional de um complexo formado por uma biomacromolécula (enzima) com uma micromolécula (substrato).....	18
Figura 10: Estrutura química dos enantiômeros da fluoxetina (17) e norfluoxetina (18). .....	19
Figura 12: Equação química geral da redução das acetofenonas usadas como substratos nas reações de biotransformação.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 13: Estruturas de ressonância para o 4'-metóxi-1-feniletanol (4a) .....	42
Figura 14: Estruturas de ressonância do 4'-nitro-1-feniletanol (5a).....	44
Figura 15: Estruturas de ressonância do 4'-bromo-1-feniletanol (7a).....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 16: Cromatograma dos padrões (R/S)-1-feniletanol (1a) .....	46
Figura 17: Proposta de mecanismo da adição de hidreto à carbonila nas reações de redução.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 18: Diagrama de energia livre de Gibbs em função da coordenada de reação para a redução de cetonas por NaBH <sub>4</sub> ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 19: Trajetória de Bürgi-Dunitz realizada pelo nucleófilo para ser adicionada à carbonila .....	48

Figura 20: Equação geral da biorredução da acetofenona (1) por fungos endofíticos gerando 1-feniletanol (1a). .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 21: Estrutura química da trans-decalin-1,4-dionas.....	51
Figura 22: Reduções microbianas de compostos carbonílicos pelo fungo <i>Curvularia falcata</i> , conduzindo principalmente ao enantiômero S. As esferas cinza e branca representam os grupos R1 (grande) e R2 pequeno, respectivamente. (Adaptado de Prelog, 1964) ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 23: Taxas de conversão (%Conv.) da acetofenona e excesso enantiomérico (%e.e.) do (S)-1-feniletanol obtidos em reações de biorredução da acetofenona pelo fungo <i>T. purpurogenus</i> H4 em diferentes velocidades de agitação.....	54
Figura 24: Taxas de conversão (%Conv.) da acetofenona e excesso enantiomérico (%e.e.) do (S)-1-feniletanol obtidos em reações de biorredução da acetofenona pelo fungo <i>T. purpurogenus</i> H4 em diferentes temperaturas. ....	55
Figura 25: Taxas de conversão (%Conv.) da acetofenona e excesso enantiomérico (%e.e.) do (S)-1-feniletanol obtidos em reações de biorredução da acetofenona pelo fungo <i>T. purpurogenus</i> H4 em diferentes tempos de incubação.....	57
Figura 26: Taxas de conversão (%Conv.) da acetofenona e excesso enantiomérico (%e.e.) do (S)-1-feniletanol obtidos em reações de biorredução da acetofenona pelo fungo <i>T. purpurogenus</i> H4 em diferentes concentrações de substratos.....	58
Figura 27: Taxas de conversão (%Conv.) da acetofenona e excesso enantiomérico (%e.e.) do (S)-1-feniletanol obtidos em reações de biorredução da acetofenona em diferentes quantidades do fungo <i>T. purpurogenus</i> H4.....	60
Figura 28: Taxas de conversão (%Conv.) da acetofenona e excesso enantiomérico (%e.e.) do (S)-1-feniletanol obtidos em reações de biorredução da acetofenona pelo fungo <i>T. purpurogenus</i> H4 empregando diferentes co-solventes. ....	61
Figura 29: Taxas de conversão (%Conv.) da acetofenona e excesso enantiomérico (%e.e.) do (S)-1-feniletanol obtidos em reações de biorredução da acetofenona pelo fungo <i>T. purpurogenus</i> H4 em função do pH do meio de cultura. ....	63

Figura 30: Cromatograma da biorredução da acetofenona pelo endófito <i>T. purpurogenus</i> H4 empregando as condições otimizadas.....	64
Figura 31: Equação geral do processo de biorredução da acetofenona e seis de seus derivados pelo fungo endofítico <i>T. purpurogenus</i> H4. <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
Figura 32: Cromatograma da biotransformação da 2-cloro-acetofenona (2) por <i>T. purpurogenus</i> H4 nos respectivos álcoois enantioméricos. ....	66
Figura 33: Cromatograma da biotransformação da 2-bromo-acetofenona (6) por <i>T. purpurogenus</i> H4 nos respectivos álcoois enantioméricos .....	67
Figura 34: Cromatograma da biotransformação da 4'-cloro-acetofenona (3) por <i>T. purpurogenus</i> H4 nos respectivos álcoois enantioméricos .....	69
Figura 35: Cromatograma da biotransformação da 4'-bromo-acetofenona (7) por <i>T. purpurogenus</i> H4 nos respectivos álcoois enantioméricos. ....	70
Figura 36: Cromatograma da biotransformação da 4'-nitro-acetofenona (5) por <i>T. purpurogenus</i> H4 nos respectivos álcoois enantioméricos .....	72
Figura 37: Cromatograma da biotransformação da 4'-metóxi-acetofenona (4) por <i>T. purpurogenus</i> H4 nos respectivos álcoois enantioméricos. ....	73
Figura 38: Cromatograma dos enantiômeros <i>R</i> e <i>S</i> do 1-feniletanol (1a) por <i>T. purpurogenus</i> H4 nos respectivos álcoois enantioméricos. ....	75
Figura 39: Estruturas químicas dos cofatores: (a) NADH (forma reduzida) e (b) NAD <sup>+</sup> (forma oxidada).....	76
Figura 40: Mecanismo de ação da álcool desidrogenase em cetonas pró-quirais utilizando o co-fator NADH; (b) Mecanismo da regeneração do cofator NADH pela enzima formiato desidrogenase (FDH).....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Reação de biotransformação da 5,7,3',4',5'-pentametóxiflavanona (6) por <i>Penicillium griseoroseum</i> . .....	8
Esquema 2: Formação do metabólito 3,4-dimetil-2-(4'-hidróxi-3',5'-dimetóxfenil)-5-metóxi-tetraidrofurano (10) empregando o endófito <i>Phomopsis</i> sp. ....	9
Esquema 3: Resolução cinética de uma mistura racêmica do 4-fenil-butan-2-ol (14). .....	15
Esquema 4: Resolução cinética de álcoois empregando células inteiras de <i>Candida parapsilosis</i> . .....	15
Esquema 5: Síntese da fluoxetina a partir do bloco construtor quiral 3-cloro-1-fenil-propan-1-ol (19) (PEREIRA, 1997). .....	20
Esquema 6: Equação química geral da redução das acetofenonas usadas como substratos nas reações de biotransformação. ....	34
Esquema 7: Proposta de mecanismo da adição de hidreto à carbonila nas reações de redução. ....	47
Esquema 8: Equação geral da biorredução da acetofenona (21) por fungos endofíticos gerando 1-feniletanol (21a). ....	49
Esquema 9: Reduções microbianas de compostos carbonílicos pelo fungo <i>Curvularia falcata</i> , conduzindo principalmente ao enantiômero S. As esferas cinza e branca representam os grupos R1 (grande) e R2 pequeno, respectivamente. (Adaptado de Prelog, 1964). ....	52
Esquema 10: Equação geral do processo de biorredução da acetofenona e seis de seus derivados pelo fungo endofítico <i>T. purpurogenus</i> H4. ....	65
Esquema 11: Mecanismo de ação da álcool desidrogenase em cetonas pró-quirais utilizando o co-fator NADH; (b) Mecanismo da regeneração do cofator NADH pela enzima formiato desidrogenase (FDH). ....	77

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Classes de enzimas conforme as reações que catalisam .....	12
Tabela 2: Coenzimas utilizadas em reações biocatalíticas .....	13
Tabela 3: Rendimentos dos produtos obtidos após redução química da acetofenona e derivados. ....	35
Tabela 4: Taxas de conversão da acetofenona e excesso enantiomérico (e.e.) de (S)-1-feniletanol das biotransformações realizadas pelos sete fungos endofíticos. ....	50

## LISTA DE ABREVIÇÕES

ABD	Ágar Batata Dextrose
AcOEt	Acetato de etila
ADH	Álcool desidrogenase
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
Conv.	Conversão
DMSO	Dimetilsulfóxido
e.e.	Excesso enantiomérico
FDH	Formiato desidrogenase
HSD	Hidroxisteróide desidrogenase
HupB	Huperzina B
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
NAD <sup>+</sup>	Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina (forma oxidada)
NADH	Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina (forma reduzida)
PGHS	Prostaglandina endoperóxido sintase
pH	Potencial Hidrogeniônico
ppm	Parte por milhão
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
SAM	(S)-adenosilmetionina
TMS	Tetrametilsilano
t <sub>c</sub>	Tempo de corrida
Ti	Temperatura inicial
t <sub>r</sub>	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta

## LISTA DE SIGLAS

$\delta$	Deslocamento Químico
$d$	Dubleto
$dd$	Duplo dubleto
$s$	Singleto
$q$	Quadrupleto
$m$	<i>Multiplete</i>
$J$	Constante de acoplamento

# SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT .....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iii
ÍNDICE DE ESQUEMAS .....	vi
ÍNDICE DE TABELAS .....	vii
LISTA DE ABREVIACÕES.....	viii
LISTA DE SIGLAS .....	ix
1. REFERENCIAL TEÓRICO .....	1
1.1 Biotransformação .....	1
1.2 Fungos: morfologia, características, importância e aplicações .....	4
1.3 As enzimas e a álcool desidrogenase (ADH) .....	11
1.4 Blocos Construtores Quirais .....	18
2. OBJETIVOS .....	21
2.1 Geral .....	21
2.2 Específicos.....	21
3. METODOLOGIA.....	23
3.1 Materiais utilizados.....	23
3.2 Métodos cromatográficos.....	23
3.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD) .....	23
3.2.2 Cromatografia em coluna por adsorção .....	23
3.2.3 Cromatografia a gás com detector de ionização por chama .....	24
3.3 Espectroscopia na região do infravermelho (IV) .....	24
3.4 Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H (RMN de <sup>1</sup> H) .....	24
3.5 Rotação específica e configuração absoluta dos álcoois ( <i>R/S</i> ) .....	25
3.6 Redução química (produção de racemato) da acetofenona e seus derivados .....	25
3.7 Fungos endofíticos.....	29
3.7.1 Isolamento dos fungos das folhas da <i>Handroanthus impetiginosus</i> ....	29
3.7.2 Preparação dos estoques dos fungos endofíticos.....	30
3.8 Biotransformação de cetonas pró-quirais por fungos endofíticos.....	31
3.8.1 Cultura dos fungos endofíticos em meio ABD.....	31



3.8.2 Investigações sobre a biotransformação da acetofenona por fungos endofíticos.....	31
3.8.3 Otimização da biotransformação da acetofenona pelo fungo endofítico H4 .....	32
3.8.4 Biotransformação dos derivados da acetofenona pelo fungo endofítico H4 .....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 Síntese química dos álcoois quirais (padrões) utilizando NaBH <sub>4</sub> .....	34
4.2 Purificação e caracterização dos álcoois quirais (padrões) .....	35
4.3 Mecanismo de redução química das acetofenonas por NaBH <sub>4</sub> .....	46
4.4 Biotransformação da acetofenona por fungos endofíticos .....	48
4.4 Otimização da biotransformação da acetofenona .....	52
4.4.1 Velocidade de agitação .....	53
4.4.2 Temperatura da reação.....	54
4.4.3 Tempo reacional .....	56
4.4.4 Concentração de substrato .....	58
4.4.5 Quantidade de fungo.....	59
4.4.6 Co-solvente .....	60
4.4.7 pH do meio.....	62
4.5 Biotransformação da acetofenona nas condições otimizadas .....	63
4.6 Biorredução dos derivados da acetofenona.....	64
4.6.1 Biotransformação da 2-cloro-acetofenona ( <b>22</b> ).....	66
4.6.2 Biotransformação da 2-bromo-acetofenona ( <b>26</b> ).....	67
4.6.3 Biotransformação da 4'-cloro-acetofenona ( <b>23</b> ) .....	69
4.6.4 Biotransformação da 4'-bromo-acetofenona ( <b>27</b> ).....	69
4.6.5 Biotransformação da 4'-nitro-acetofenona ( <b>25</b> ).....	71
4.6.6 Biotransformação da 4'-metóxi-acetofenona ( <b>24</b> ) .....	72
4.7 Aumento de escala da biotransformação da acetofenona para isolamento do (S)-1-feniletanol.....	74
4.8 Mecanismo de atuação das enzimas em substratos pró-quirais.....	75
5. CONCLUSÕES .....	79
6. REFERÊNCIAS.....	81
APÊNDICE A.....	94
Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) - 1-feniletanol (21a) .....	94

Apêndice B – Espectros de Infravermelho dos produtos obtidos .....	101
Apêndice C – Métodos Cromatográficos para CG com coluna quiral .....	108
Apêndice D – Cromatogramas obtidos de análise em CG com coluna quiral .....	110
Apêndice E - Cromatogramas das biorreduções por fungos endofíticos ...	117

## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 Biotransformação

A busca por novas metodologias cada vez mais inofensivas ao meio ambiente e que se adequem a um maior número de princípios da Química Verde, proporcionou um destaque para a técnica de biotransformação e, conseqüentemente, para a descoberta de novos biocatalisadores. A biotransformação pode ser mais bem definida fazendo uma junção das definições estabelecidas por Scalvenzi, (2012) e Hegazy et al., (2015), e consiste em realizar modificação na estrutura química de uma substância definida gerando um produto estruturalmente distinto através do uso de catalisadores de origem biológica, sendo tais substâncias não utilizadas normalmente pelo metabolismo dessas espécies.

Kaushik, Biswas e Singh, (2014), por sua vez, ressaltam ter a biotransformação apresentado um uso crescente no âmbito da ciência biotecnológica, destacando-se pelo fato de permitir a catálise de reações quimio-, régio- e estereoespecíficas. Além do mais, estas são conduzidas em condições semelhantes às ambientais levando-se em conta, por exemplo, fatores como temperatura, pressão e pH. O referido procedimento bioquímico provê ainda a possibilidade de se trabalhar tanto visando à síntese de produtos inéditos quanto à otimização da obtenção de moléculas já conhecidas (GIRI et al., 2001).

Um aspecto crucial e determinante para o sucesso das modificações estruturais de substâncias químicas consiste na escolha da fonte enzimática a ser empregada (DOS SANTOS; SILVA, 2019). Dentre as existentes, as células inteiras de vegetais e micro-organismos, bem como as enzimas isoladas denotam maiores destaques, entretanto, todas elas apresentam vantagens e limitações acerca de sua utilização (JAYESHKUMAR, SAKTHIVEL, 2015).

O processo de modificação estrutural dos compostos químicos empregando enzimas isoladas é denominado biocatálise (OMORI; PORTAS; DE OLIVEIRA, 2012). Este se destaca pela maior eficiência das

transformações devido à sua biodisponibilidade, o que resulta numa diminuição do tempo podendo aumentar a velocidade da reação de  $10^8$  a  $10^{12}$  quando comparada ao uso de células inteiras (DE CASTRO; MENDES; DOS SANTOS, 2004). No entanto, o processo pode tornar-se relativamente inviável devido à necessidade de adição de cofatores que não são regenerados, logo, não poderão ser reutilizados conferindo assim à biocatálise um processo de alto custo (POLLARD; WOODLEY, 2007).

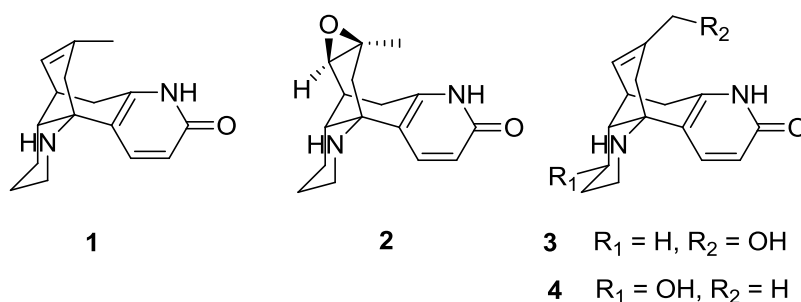
Em comparação com a utilização de enzimas isoladas, as reações empregando células inteiras de vegetais e micro-organismos (biotransformação) apresentam como vantagem o fato dos cofatores requeridos nos processos enzimáticos serem regenerados *in situ*, resultando numa técnica mais eficiente e economicamente viável. Além disso, a biotransformação exhibe um amplo espectro de possibilidades de transformações estruturais, considerando a variedade enzimática que é produzida no meio reacional, possibilitando a ocorrência das reações em várias etapas e por diferentes vias (HANSON, 1995).

Em contrapartida, este processo exhibe como limitações, no caso do uso dos micro-organismos, o longo período necessário para o seu cultivo (ativação), além do tempo necessário para realizar as transformações químicas. Em relação às células inteiras de vegetais, as limitações estão relacionadas ao tempo fundamental para que essas células produzam as enzimas no meio, bem como, as dificuldades de extração dos produtos decorrentes da degradação da biomassa (LI et al., 2016).

A literatura aborda uma gama de trabalhos em que as diferentes fontes enzimáticas aqui citadas são empregadas. Como exemplo, o estudo desenvolvido por Naganthran et al., (2017) trouxe uma modificação na formulação de detergentes para lavagem de louças de forma eficiente, em águas mole e dura. A nova formulação consistiu em adicionar lipases termoestáveis, proteases e amilases - enzimas isolada das cepas de *Geobacillus*, *Bacillus subtilis* e *Geobacillus* sp. SK70, respectivamente. As lipases já eram comumente utilizadas nas formulações de detergentes, entretanto, apresentavam uma baixa eficiência em água dura.

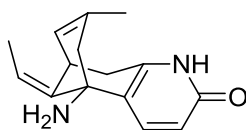
Outro exemplo interessante consiste no trabalho desenvolvido por Zhan et al., (2019). Eles estudaram a biotransformação da huperzina B (hupB) (1), um dos constituintes bioativos característicos da planta medicinal *Huperzia serrata*, pelo endófito fúngico *Bjerkandera adusta* CCTCC M 2017159 da planta hospedeira. Uma nova substância, a 8 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -epóxi-superzina B (2), juntamente com dois análogos da hupB oxigenados já conhecidos, 16-hidróxi-superzina B (3) e carinatamina B (4), foram isolados e identificados. As estruturas químicas destas substâncias estão descritas na Figura 1.

Figura 1: Estrutura química das substâncias huperzina B (hupB) (1), 8 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -epoxi-superzina B (2), 16-hidroxi-superzina B (3) e carinatamina B (4).



A HupB (1) é um alcaloide do tipo licodino isolado de uma planta medicinal chinesa a *Huperzia serrata* (THUNB.). Esta substância tem demonstrado ser um potencial inibidor reversível da acetilcolinesterase, sendo considerada um fármaco promissor no tratamento da doença de Alzheimer (MA; GANG, 2004). A substância 1, apesar de apresentar tais efeitos terapêuticos, ainda é menos potente e seletiva em comparação a huperzina A (hupA) (5) (Figura 2), também isolada da mesma planta. (BAI; TANG; HE, 2000). Por outro lado, 1 exibe um índice terapêutico mais alto devido a apresentar uma ação mais duradoura em comparação com hupA (5). (WANG; TANG, 2005).

Figura 2: Estrutura química da huperzina A (hupA) (5).



5

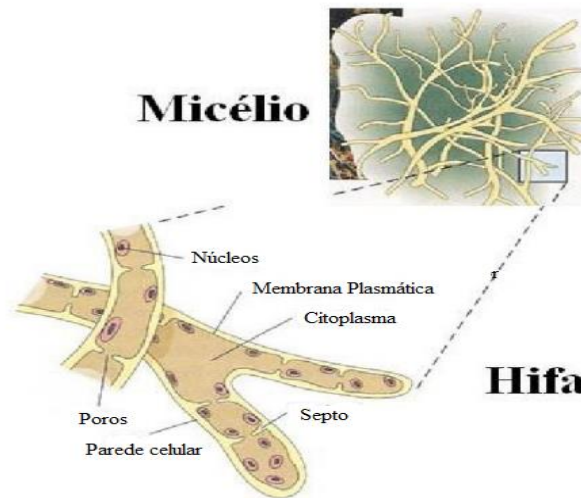
Os exemplos dos trabalhos até aqui mencionados, dão uma ideia da complexidade de modificações e funções que as enzimas produzidas por fungos são capazes de realizar. Na seção seguinte falaremos um pouco desses micro-organismos.

### 1.2 Fungos: morfologia, características, importância e aplicações

Os fungos podem ser definidos como micro-organismos eucariotos, que necessitam de componentes orgânicos como fontes de energia e carbono (químio-heterotróficos), cujo sistema de reprodução é constituído por esporos reprodutivos, podendo ser sexuados ou assexuados. Eles podem ser classificados quanto às estruturas vegetativa em: filamentosos, carnosos, leveduras e dimórficos.

Os fungos filamentosos apresentam um corpo semelhante a filamentos longos, constituídos por várias células conectadas. Esses filamentos são denominados hifas que, por sua vez, podem ser classificadas como hifas septadas se, ao longo dos filamentos, existem paredes cruzadas (septos), que dividem as hifas em distintas unidades celulares (este tipo de hifa está presente na grande maioria dos fungos). Outra classificação são as hifas cenocíticas, quando há ausência de septos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). A Figura 3 esboça a estrutura morfológica dos fungos filamentosos.

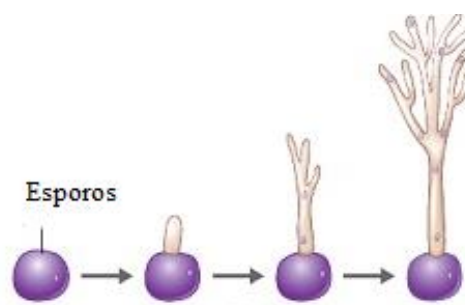
Figura 3: Representação da estrutura morfológica de fungos filamentosos compostos por hifas septadas.



Fonte: Docsity.com

Os fungos filamentosos são micro-organismos cuja origem se dá através dos **esporos** (Figura 4) (WEBSTER; WEBER, 2007). Os esporos necessitam de calor e umidade, para realizarem a germinação e o resultado deste processo é a formação de um ou mais filamentos finos, conhecidos como tubos germinativos. À medida que os tubos germinativos se alongam e se ramificam em todas as direções formando uma grande massa filamentosa, e os micélios fúngicos são formados. Estes, por sua vez constituem o sistema vegetativo, responsável pelo desenvolvimento desse micro-organismo e pela absorção dos alimentos, necessários para o seu crescimento.

Figura 4: Processo de crescimento das hifas a partir de um esporo



Fonte: [alunosanalisesclinicas.wordpress.com](http://alunosanalisesclinicas.wordpress.com)

Os fungos se dispersam na natureza por diferentes meios dentre eles destacam-se a água, o ar, os insetos, o homem bem como outros animais. A eficiência dessa dispersão é relacionada à alta produção de esporos que estes possuem (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). Os fungos que de alguma forma se dispersam e penetram nos tecidos de plantas passando a viver no seu interior são chamados de endofíticos. Esta é uma denominação que pode ser atribuída aos micro-organismos, a exemplo de bactérias e fungos, presentes nos tecidos vegetais habitando, de modo geral, as partes aéreas, como folhas e caules, sem causar danos às plantas hospedeiras, constituindo desta forma, uma relação de simbiose (HARDOIM et al., 2015). Essas espécies endofíticas, também chamadas de endófitos, contribuem para as defesas naturais das plantas, prevenindo a herbivoria e a invasão de prováveis patógenos presentes na superfície (DEMAIN, 2014);(ZHANG; SONG; TAN, 2006).

Esses micro-organismos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX, por Bary (1866), fazendo uma distinção entre eles e os patógenos de plantas, definindo-os como assintomáticos, por não produzirem efeitos aos hospedeiros, sejam eles benéficos ou maléficos (HALLMANN; SIKORA, 1996).

Em geral os endófitos adentram as plantas por aberturas naturais e feridas. Uma das portas de entrada mais utilizadas pelos endófitos são as raízes; a emergência de raízes secundárias laterais sempre é acompanhada por uma “ferida”, que serve de entrada para os micro-organismos. O próprio crescimento das raízes, penetrando no solo, gera abrasões que facilitam a entrada de germes. Outras portas de entrada bastante comuns são as aberturas naturais como estômatos e hidatódios, aberturas causadas por insetos e até por estruturas de fungos patogênicos como os apressórios (estruturas empregadas pelos patógenos fúngicos para forçar e atacar a superfície das plantas na preparação para a infecção) (PAULA; REIS; DÖBEREINER, 1991).

As relações planta hospedeira-endófito são mediadas pelo metabolismo secundário, implicando em enorme importância ecológica (STROBEL; DAISY, 2003). Diversos estudos sobre os metabólitos secundários isolados a partir de culturas de fungos endofíticos, principalmente acerca das



atividades biológicas e diversidade química, têm demonstrado a importância dessas substâncias para o desenvolvimento de novos fármacos. Alguns relatos apontam, inclusive, para a ocorrência de coincidências metabólicas entre o endófito e sua planta hospedeira, possibilitando que a mesma substância seja produzida por ambos os organismos (ZHANG; SONG; TAN, 2006).

Os fungos endofíticos são um grupo diversificado de ascomicetos definidos por sua ocorrência assintomática nos tecidos vegetais. Eles ocorrem em todo o território terrestre, nas comunidades naturais e antrópicas, colonizando plantas no Ártico, Antártica, solos geotérmicos, desertos, oceanos, florestas tropicais, mangues e florestas costeiras (JALGAONWALA; MOHITE; MAHAJAN, 2011). Em quase todas as plantas vasculares, algas marinhas, musgos e samambaias, estudadas até o momento, foram encontradas bactérias e fungos endofíticos (ARNOLD, 2007). A distribuição e a população de endófitos dependem de vários fatores, como a doação genética e a idade da planta hospedeira, bem como as condições ambientais em que elas estão submetidas (JIA et al., 2016).

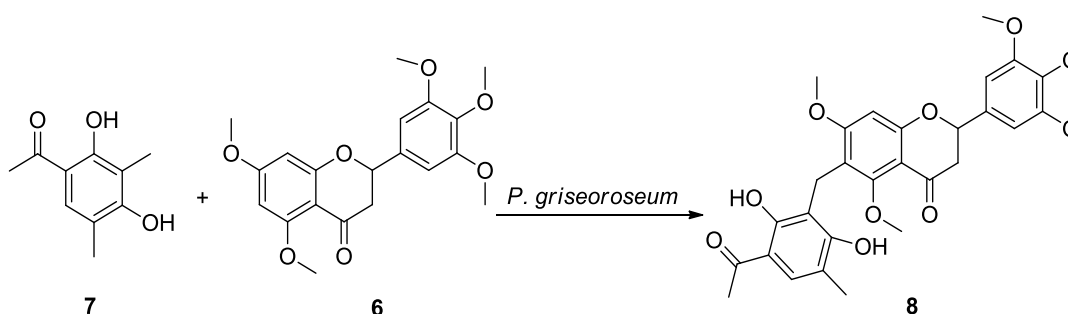
Além da importância do metabolismo secundário dos fungos endofíticos, o potencial enzimático de tais micro-organismos também atrai a atenção de diversos grupos de pesquisa. Os fungos têm ampla capacidade de produção de diversas enzimas, pois elas são usadas naturalmente por eles na degradação de substâncias orgânicas do ambiente (HARMS; SCHLOSSER; WICK, 2011). Um trabalho recente do nosso grupo de pesquisa destacou que o amplo arsenal enzimático dos fungos endofíticos pode ser explorado pela biotecnologia, como nas reações de biotransformação ou biorremediação (SANTOS; SILVA, 2019).

Essa categoria de micro-organismos é mais frequentemente estudada para aplicações nas reações de biotransformação em suas diversas abordagens, pois eles podem produzir enzimas de grande interesse como lipases, invertases, lacases, proteinases, amilases que são capazes de catalisar uma ampla variedade de reações (DO NASCIMENTO; CONCEIÇÃO; SILVA, 2018). Diversos trabalhos descritos na literatura abordam a versatilidade de modificações estruturais as quais as enzimas

produzidas por essas espécies são capazes de realizar, muitas das quais são inviáveis de serem realizadas por vias químicas clássicas.

Um exemplo interessante foi o trabalho realizado por Da Silva e Rodrigues-Fo, (2010) utilizando o *Penicillium griseoroseum*, isolado como endofítico das sementes de *Coffea arabica*, na biotransformação de 5,7,3',4',5'-pentametóxilflavanona (**6**) (Esquema 1). O fungo incorporou o clavatul (**7**), um típico policetídio produzido como metabólito secundário fúngico, na posição 6 da flavanona, resultando em um novo flavonoide benzilado (**8**). O mesmo estudo demonstrou a presença de enzimas capazes de catalisar a ligação C–C, a qual é incomum em fungos.

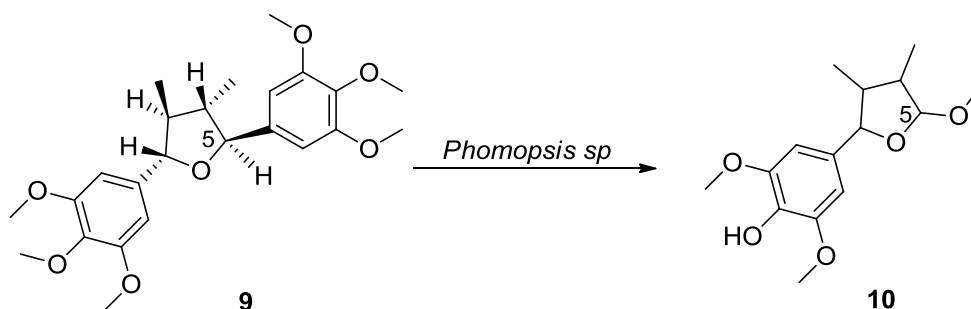
Esquema 1: Reação de biotransformação da 5,7,3',4',5'-pentametóxilflavanona (**6**) por *Penicillium griseoroseum*.



Outro trabalho também de grande relevância foi realizado por Verza et al., (2009), e consistiu na biotransformação da lignana tetraidrofurânica (-)-grandisina (**9**) utilizando o endofítico *Phomopsis* sp., isolado de *Viguiera arenaria*. Tal transformação conduziu à formação de um novo metabólito caracterizado como 3,4-dimetil-2-(4'-hidróxi-3',5'-dimetóxi-fenil)-5-metóxi-tetraidrofurano (**10**). Uma proposta para as transformações ocorridas foi elaborada por Verza et al, onde a metoxila alifática do composto **10** deve ter sido gerada primeiramente por meio de oxidação na posição C-5, seguida de rearranjo para uma lactona e deslocamento do anel aromático. Uma redução adicional da função hemiacetal e O-metilação do grupo hidroxila poderia explicar como o fungo converteu o grupo 3,4,5-trimetóxi-fenil do composto **9** em grupo metóxi do metabólito **10**. As atividades tripanocidas da

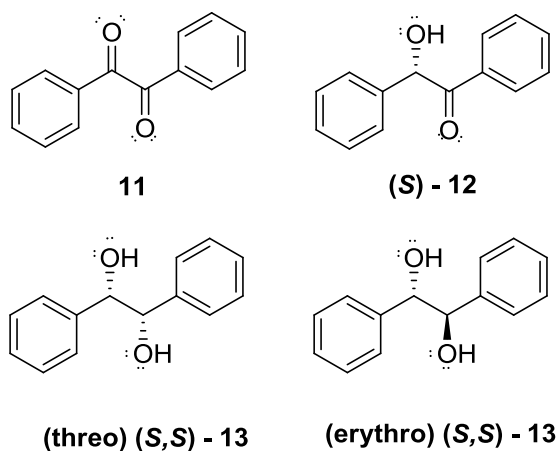
(-)-grandisina (**9**) e de seu metabólito **10** foram avaliadas e demonstraram serem bastante similares. Tal fato destaca que a eliminação de um dos anéis 3,4,5-trimetoxifenil não prejudicou a atividade tripanocida, o que pode ser importante para o planejamento sintético de novos candidatos a fármacos tripanocidas. O esquema 2 destaca a formação do metabólito 3,4-dimetil-2-(4'-hidróxi-3',5'-dimetóxiifenil)-5-metóxi-tetraidrofurano empregando o endófito *Phomopsis* sp.

Esquema 2: Formação do metabólito 3,4-dimetil-2-(4'-hidróxi-3',5'-dimetóxiifenil)-5-metóxi-tetraidrofurano (**10**) empregando o endófito *Phomopsis* sp.



O trabalho realizado por Pal et al., (2015), ilustrou a estereosseletividade da biotransformação da 1,2-difenil-etanodiona **11** (Figura 5) em diferentes pHs. Eles notaram que as enzimas produzidas pelo endófito *Talaromyces flavus*, quando submetida a um ambiente de pH 5,0 reduzia apenas umas das carbonilas do substrato **11**, levando à formação da (S)-2-hidróxi-1,2-difeniletanona (**12**) com excesso enantiomérico >99%. Por outro lado, em pH 7,0, o produto (1S,2S)-1,2-difenil-1,2-etanodiol (**13**) foi obtido exclusivamente (ee >99%, threo/erythro 97:3).

Figura 5: Estrutura química da 1,2-difenil-etanodiona (**11**), (*S*)-2-hidroxi-1,2-difeniletanona (**12**) e (1*S*,2*S*)-1,2-difenil-1,2-etanodiol (**13**).



As benzoínas e hidrobenzoínas enantiomericamente puras são precursoras de vários produtos farmacêuticos e compostos biologicamente ativos. Além disso, as hidrobenzoínas são precursoras de ligantes quirais e auxiliares em síntese orgânica estereosseletiva (ROUSH et al., 1996). A redução biocatalítica de benzoínas é uma abordagem direta para preparar essas moléculas. No entanto, os métodos conhecidos não são seletivos e levam à formação de uma mistura de benzoínas e hidrobenzoínas, exigindo procedimentos de separação dispendiosos (KULIG et al., 2012). Desta forma, a metodologia elaborada por Pal et al. (2015), empregando a cepa *Talaromyces flavus*, configura-se como uma excelente alternativa para a obtenção desses percussores quirais.

O gênero *Talaromyces* pertence à família *Trichocomaceae*. Descrito em 1955 pelo micologista americano Chester Ray Benjamin, as espécies pertencentes a este gênero formam corpos de frutos macios e felpudos (ascocarpos). Os corpos dos frutos geralmente são amarelados ou cercados por grânulos amarelados (BENJAMIN, 1955). Uma estimativa de 2008 colocou 42 espécies no gênero, (KIRK, et al., 2008) mas várias novas espécies foram descritas desde então.

A capacidade dos fungos do gênero *Talaromyces*, bem como dos demais citados previamente neste trabalho em realizar essas e outras transformações é proveniente da grande variedade de enzimas que estas

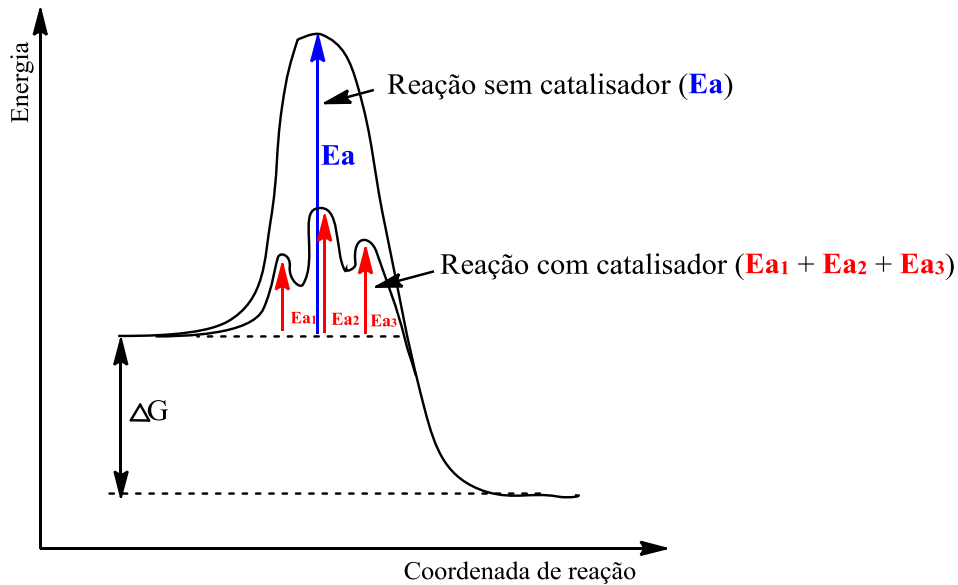
espécies podem produzir no meio reacional, muitas delas são de grande interesse devido ao seu potencial em produzir compostos com elevada estereo-, régio- e quimiosseletividade.

### **1.3 As enzimas e a álcool desidrogenase (ADH)**

As enzimas podem ser definidas como proteínas, que são adicionadas ou produzidas no meio reacional, com o objetivo de acelerar a velocidade da reação. Essas espécies atuam promovendo um mecanismo alternativo, de modo que a energia de ativação seja muito menor do que a energia de ativação para a mesma reação, realizada sem a sua presença. (DRAUZ; GRÖGER; MAY, 2012). A Figura 6 representa uma curva de energia em função da coordenada de reação para uma mesma reação com e sem a adição de um catalisador.

As enzimas apresentam elevada capacidade catalítica, na sua maioria essa capacidade é superior à apresentada pelos catalisadores sintéticos e inorgânicos. Essas espécies apresentam elevado grau de especificidade para seus substratos, aceleram as reações químicas de forma extraordinária, atuando em soluções aquosas que apresentam moderados valores de pH e temperatura. A atividade catalítica das enzimas depende da sua conformação nativa de proteína, ou seja, para que atuem efetivamente como um catalisador sua conformação deve ser equivalente à estrutura tridimensional na qual essa molécula está biologicamente ativa e apresenta propriedades biológicas naturais. Dessa forma, se uma enzima é desnaturada ou degradada em subunidades, as suas propriedades catalíticas são automaticamente destruídas (NELSON; COX, 2018).

Figura 6: Curva de energia para uma dada reação com e sem adição de um catalisador



As enzimas podem ser classificadas quanto ao tipo de reações que catalisam, a Tabela 1, destaca algumas das enzimas e reações mais comumente realizadas.

Tabela 1: Classes de enzimas conforme as reações que catalisam

Classe	Tipo de reação catalisada
Oxirredutases	Reações de transferência de elétrons (íons hidretos ou átomos de H)
Transferases	Reações de transferência de grupos
Hidrolases	Reações de hidrólise (transferências de grupos funcionais da água)
Liases	Adição de grupos a ligações duplas, ou formação de duplas ligações pela remoção de grupos
Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O, C-N pelas reações de condensação acopladas à clivagem do ATP

Fonte: Adaptada de Nelson; Cox, 2018

As oxirredutases representam a segunda classe de enzimas mais utilizada nas reações orgânicas, com um percentual de aplicação equivalente a 25% (OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009). Essas enzimas requerem a presença de cofatores para o seu pleno funcionamento. Os cofatores podem ser de origem inorgânica, a exemplo dos cátions metálicos ( $Zn^{2+}$  e  $Mn^{2+}$ ), que atuam como ácidos de Lewis, normalmente ativando o substrato. Quando os cofatores são moléculas orgânicas, a exemplo das vitaminas, estes recebem a denominação de coenzimas (NELSON; COX, 2018). A Tabela 2 apresenta algumas das principais coenzimas utilizadas nas reações mais convencionais.

Tabela 2: Coenzimas utilizadas em reações biocatalíticas

<b>Coenzimas</b>	<b>Tipo de Reação</b>
NAD <sup>+</sup> /NADH ou NADP <sup>+</sup> /NADPH	Remoção ou adição de hidreto
ATP	Fosfoliração
SAM	C1-alquilação
Acetil-CoA	C2-alquilação
Flavinas	Oxigenação
Pirodoxal-fosfato	Transaminação
Biotina	Carboxilação
Complexos metal-porfirina	Peroxidação e oxigenação

Fonte: Adaptada de Nelson; Cox, 2018.

As álcoois desidrogenases (ADHs) são as enzimais normalmente utilizadas para catalisar a redução de compostos carbonílicos, sendo também conhecidas como carbonil redutases (FORREST; GONZALEZ, 2000). Além das reações de redução, são também capazes de realizar a reação reversa - a oxidação dos álcoois correspondentes (REID; FEWSON, 1994). A característica mais promissora das ADHs é o reconhecimento estrito do substrato, o que leva a uma alta quimio-, regio- e

enantioseletividade. ADHs são biocatalisadores versáteis em síntese assimétrica de produtos enriquecidos enantiomericamente, a exemplo dos álcoois quirais, que são blocos de construção muito importantes para a produção de fármacos, agroquímicos e produtos químicos finos para as indústrias química e farmacêutica (PANKE; HELD; WUBBOLTS, 2004).

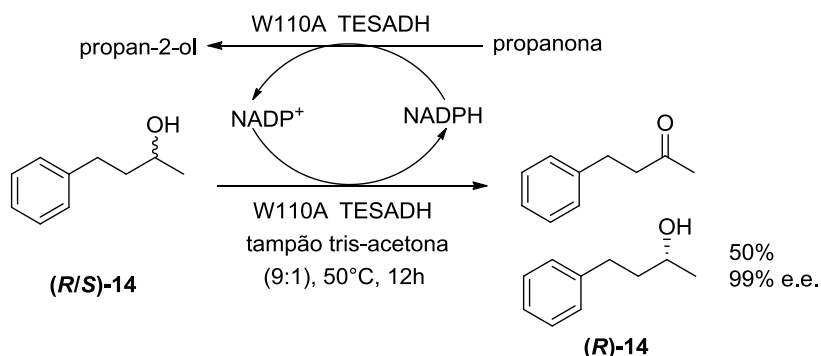
ADHs de diferentes espécies foram isolados e são comercialmente disponibilizadas para diversas preparações, incluindo enzimas purificadas e enzimas envolvidas em células inteiras (MOORE et al., 2007);(DE WILDEMAN et al., 2007). As ADHs catalisam a redução de carbonila ou a oxidação de hidroxila por transferência de hidreto entre coenzima e substrato. Normalmente, os produtos quirais de ADHs que catalisam reação assimétrica são álcoois opticamente ativos e derivados hidroxil quirais correspondentes. Portanto, as aplicações de ADHs na síntese orgânica incluem principalmente as reduções assimétricas de cetonas proquirais, a oxidação estereoespecífica de álcoois, a resolução de álcoois racêmicos e a inversão da estereoquímica de álcoois racêmicos.

Dois exemplos dessas aplicações encontrados na literatura foram abordados neste trabalho para demonstrar eficiência dessas enzimas nos dados processos.

O primeiro deles consiste numa resolução cinética de uma mistura racêmica do álcool 4-fenil-butan-2-ol, onde um dos enantiômeros do racemato foi oxidado enantiosseletivamente pela ADH enquanto o outro permaneceu inalterado durante todo o processo. Musa et al., (2007) empregaram uma ADH enantiosseletiva da *Thermoanaerobacter ethanolicus* para separar os álcoois racêmicos. No entanto, o rendimento máximo de cada enantiômero não pôde exceder 50%. O Esquema 3 descreve a resolução cinética realizada para a mistura racêmica do 4-fenil-butan-2-ol (***RS***)-14.



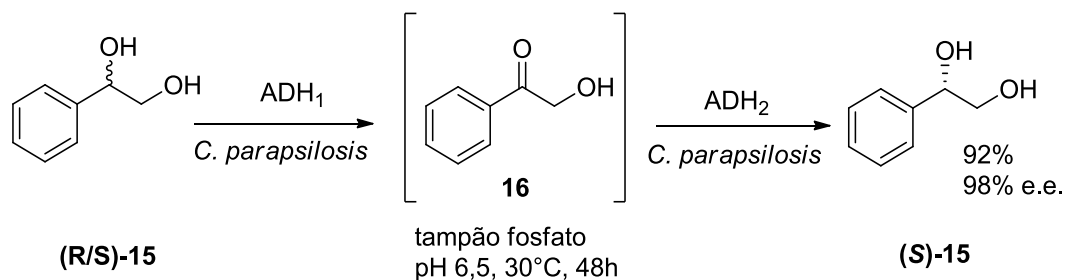
Esquema 3: Resolução cinética de uma mistura racêmica do 4-fenil-butan-2-ol (**14**).



W110A TESADH = *Thermoanaerobacter ethanolicus* secondary

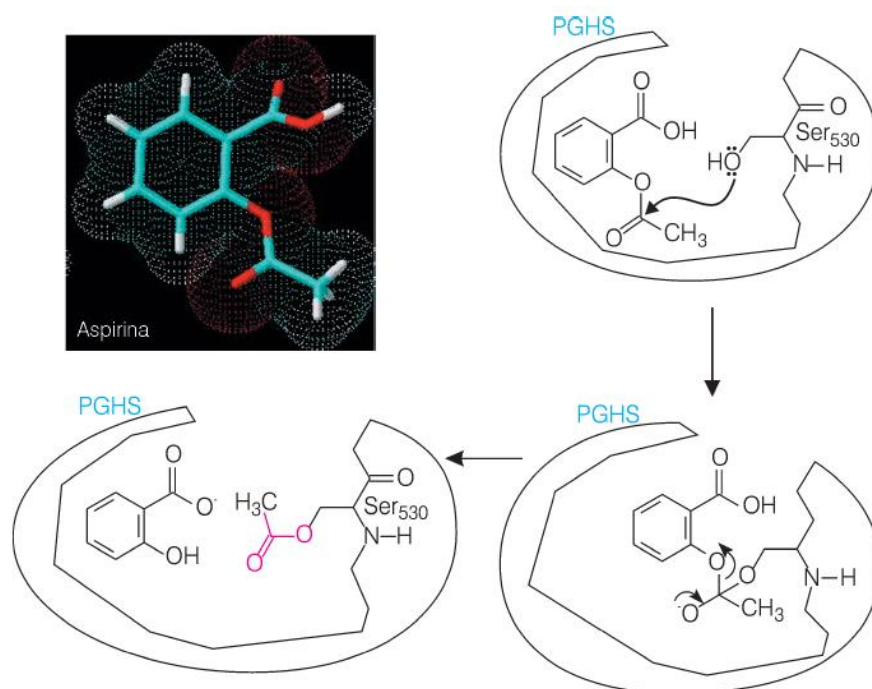
O segundo estudo foi referente a uma resolução cinético-dinâmica de uma mistura racêmica do álcool 2-hidroxi-1-feniletanol (**15**) empregando células inteiras de fungos. A conversão estereoquímica foi alcançada por meio de uma biotransformação múltipla (duas enzimas diferentes realizaram o trabalho em etapas distintas). Neste trabalho, foi possível notar que o emprego de células inteiras como biocatalisador é uma boa opção para a estereoconversão de álcoois racêmicos devido às enzimas necessárias para tais processos serem geradas *in situ*, assim como os cofatores. O uso de enzimas isoladas tornaria o processo inviável devido ao alto custo na aquisição das enzimas e dos cofatores requeridos. Nie, Xu e Mu (2004) empregaram a *Candida parapsilosis*, que contém diferentes ADHs com distintas preferências por coenzimas e substratos. Os resultados de tais transformações estão descritos no esquema 4.

Esquema 4: Resolução cinética de álcoois empregando células inteiras de *Candida parapsilosis*.



As enzimas atuam promovendo um ambiente adequado para que haja a transformação do substrato no produto desejado. Esse ambiente é também chamado de sítio ativo, que nada mais é que um bolsão confinado da própria enzima, aonde o substrato irá se ligar. O sítio ativo tem sua superfície constituída por grupos substituintes que são os responsáveis pelas transformações na molécula do substrato (BETTELHEIM, et al., 2012). A Figura 7 esboça como esse fenômeno ocorre usando como exemplo a interação da enzima prostaglandina endoperóxido sintase (PGHS) com o fármaco aspirina.

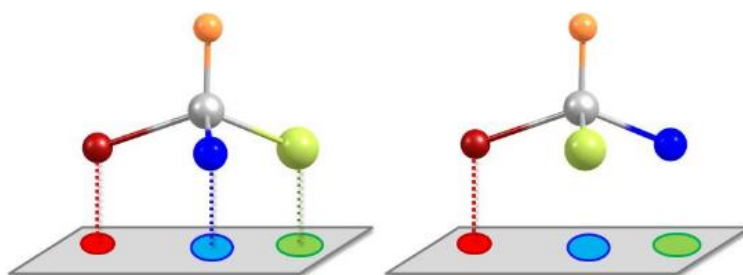
Figura 7: Mecanismo de inibição irreversível da PGHS pela aspirina (FRAGA, 2001).



Após o substrato adentrar o bolsão da enzima e se ligar ao sítio ativo, há a formação do complexo enzima-substrato, todas as transformações irão ocorrer neste momento e levarão à formação do complexo enzima-produto. Por fim, as interações são desfeitas e os produtos são liberados no meio reacional. Para que tais transformações ocorram é necessário que os substituintes presentes no substrato apresentem interações efetivas com os pontos ativos da enzima. Isso ocorre devido a essas espécies serem altamente específicas, de tal modo que diante de diversos substratos, o seu

sítio ativo terá preferência por aquele que apresentar o encaixe perfeito, esse fenômeno é demonstrado de forma simplificada através do esquema chave-fechadura (Figura 8) (RÍSQUEZ-CUADRO et al., 2013).

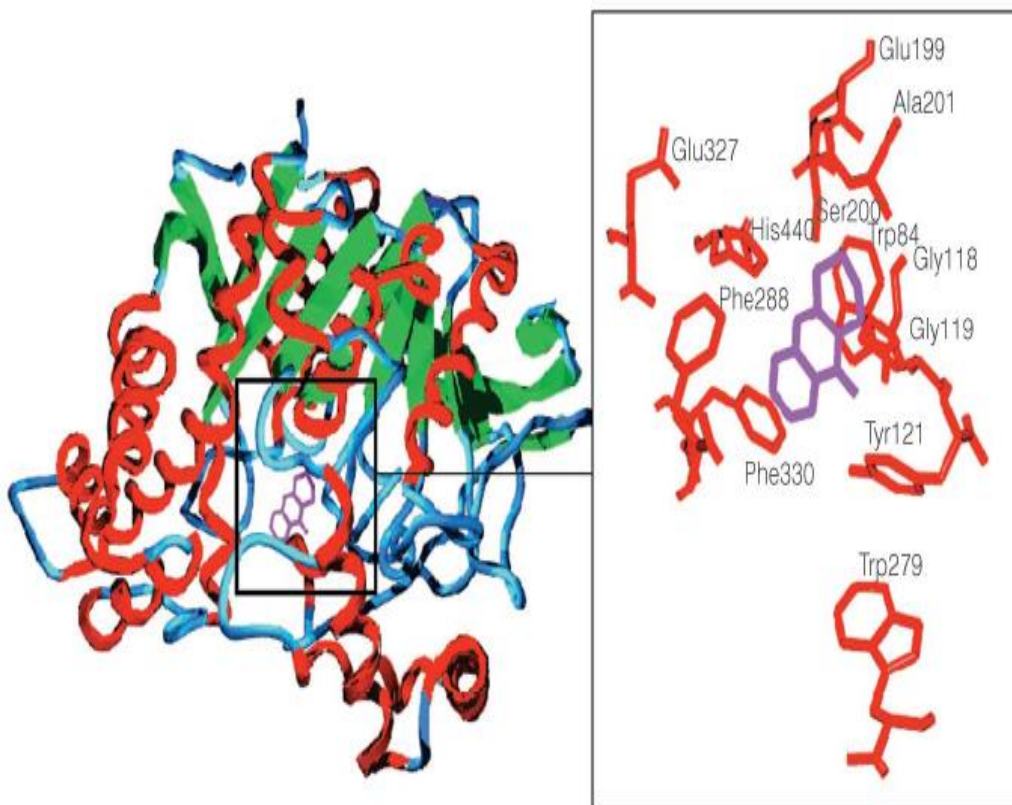
Figura 8: Modelo chave-fechadura representativo das interações enzima-substrato.



Fonte: Cadernos temáticos de Química Nova na escola, n. 3, 2001.

Apesar de o modelo chave-fechadura ser útil na compreensão dos eventos envolvidos no reconhecimento molecular ligante-receptor, caracteriza-se como uma representação parcial da realidade, uma vez que as interações entre a biomacromolécula (receptor) e a micromolécula (substrato) apresentam características tridimensionais. Dessa forma, o volume molecular do ligante, as distâncias interatômicas e o arranjo espacial entre os grupamentos farmacofóricos compõem aspectos fundamentais na compreensão das diferenças na interação substrato-receptor (BARREIRO e FRAGA, 2014). A Figura 9 ilustra a representação tridimensional de tais interações. É possível observar a estrutura do substrato (em roxo), interagindo com os diferentes resíduos de aminoácidos que compõe o sítio ativo da biomacromolécula (enzima). Essa representação melhor explica a interação mais efetiva das enzimas com um dos estereoisômeros de uma dada substância. Quando se tem dois estereoisômeros diferentes do mesmo substrato, tem-se a inversão da posição espacial de pelo menos dois dos substituintes do substrato e, conseqüentemente, as interações desses dois pontos são modificadas e tornam-se ineficientes.

Figura 9: Representação tridimensional de um complexo formado por uma biomacromolécula (enzima) com uma micromolécula (substrato).



Fonte: Cadernos temáticos de Química Nova na escola, n. 3, 2001.

#### 1.4 Blocos Construtores Quirais

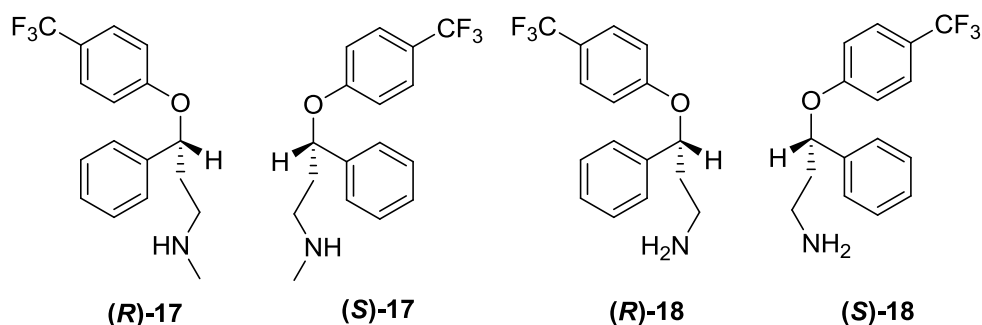
Os blocos construtores quirais podem ser definidos como qualquer substância química que apresente em sua estrutura, centro(s) assimétrico(s) e que seja empregada como intermediário ou material de partida na síntese de micro ou macromoléculas com aplicações farmacêuticas, agroindustriais, de produtos químicos finos e do ramo alimentício (AGUIRRE-PRANZONI et al., 2014).

Os álcoois quirais representam a classe de substâncias mais amplamente utilizadas como blocos de construção, principalmente nas áreas de química fina e na indústria farmacêutica (SUAN; SARMIDI, 2004). A redução da acetofenona (**21**) ao 1-feniletanol (**21a**) quiral é uma biotransformação de alta aplicação potencial, porque ambos os

enantiômeros deste composto são importantes aromas naturais. O (S)-1-feniletanol é facilmente identificado pelo seu aroma suave de gardênia com nuances de morango (FARBOOD et al., 2003), enquanto que o (R)-1-feniletanol denota um odor floral de verde-terra e madressilva (HOMOLA et al., 2015)(HOMOLA et al., 2016).

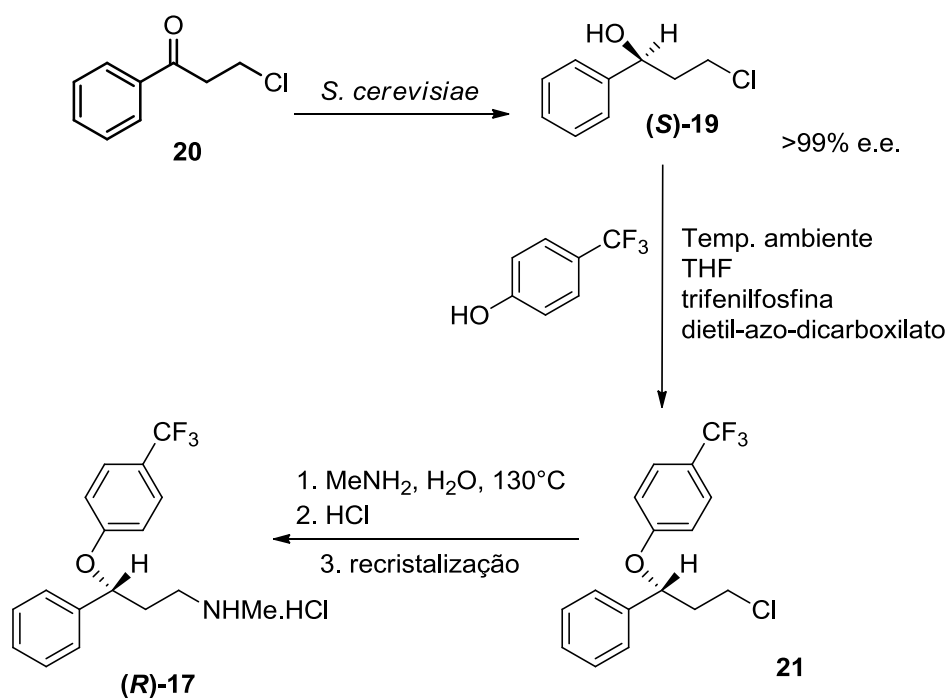
Esses enantiômeros, bem como seus derivados, são massivamente utilizados na preparação de diversos fármacos, um exemplo deles é a síntese da fluoxetina (**17**) (Prozac), um fármaco antidepressivo da classe dos inibidores seletivos de recaptação de serotonina. Suas principais indicações são para uso em depressão de nível moderado a grave, transtorno obsessivo-compulsivo (TOC), transtorno alimentar, transtorno do pânico e de ansiedade (STOKES; HOLTZ, 1997). O composto **17** é comercialmente disponibilizado na forma de racemato devido aos seus enantiômeros serem aproximadamente equipotentes, no bloqueio da recaptação de serotonina (WONG et al., 1985). Contudo, os enantiômeros do metabólito desmetilado, norfluoxetina (**18**), diferem consideravelmente em sua atividade farmacológica. (S)-(+)-**18** é cerca de 20 vezes mais potente que (R)-(-)-**18** como inibidor da recaptação de serotonina *in vivo* e *in vitro*. A Figura 10 esboça as estruturas químicas dos enantiômeros da fluoxetina (**17**) e da norfluoxetina (**18**).

Figura 10: Estrutura química dos enantiômeros da fluoxetina (**17**) e norfluoxetina (**18**).



A fluoxetina pode ser obtida a partir de um dos enantiômeros do 3-cloro-1-fenil-propan-1-ol (**19**) conforme mostrado no esquema 5.

Esquema 5: Síntese da fluoxetina a partir do bloco construtor quiral 3-cloro-1-fenil-propan-1-ol (**19**) (PEREIRA, 1997).



O estudo realizado por Pereira (1997) mostra a síntese da (*R*)-fluoxetina (**17**), tendo como bloco construtor quiral o 3-cloro-1-fenil-propan-1-ol (**19**). Este foi obtido na primeira etapa da síntese a partir da biotransformação da 3-cloro-1-fenil-propanona (**20**) empregando cepas comerciais de *Saccharomyces cerevisiae*. O álcool foi obtido com um excesso enantiomérico superior a 99% do enantiômero *S*. As etapas seguintes foram realizadas por vias químicas clássicas.

Dentro do que foi exposto, o presente trabalho buscou o desenvolvimento de novas tecnologias verdes para a obtenção de álcoois quirais com elevados excessos enantioméricos, os quais poderão futuramente serem empregados na síntese de substâncias úteis do ponto de vista farmacêutico.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar o potencial biocatalítico de fungos endofíticos isolados das folhas da *Handroanthus impetiginosus* (ipê roxo) para a biorredução estereosseletiva de carbonilas pró-quirais.

### 2.2 Específicos

- ✓ Sintetizar os padrões álcoois utilizando NaBH<sub>4</sub>.
- ✓ Estimar o potencial dos fungos endofíticos na biotransformação da acetofenona e selecionar uma das cepas;
- ✓ Otimizar a biotransformação da acetofenona pela cepa endofítica selecionada por meio do estudo dos seguintes parâmetros: tempo reacional, quantidade de substrato, velocidade de agitação, pH do meio, temperatura, co-solvente e quantidade de fungo;
- ✓ Avaliar os parâmetros de maior influência na biotransformação da acetofenona;
- ✓ Biotransformar a acetofenona e seis derivados empregando as condições ótimas;
- ✓ Estudar a influência de grupos químicos (substituintes do anel aromático da acetofenona bem como do carbono  $\alpha$  carbonílico) na biotransformação da acetofenona;
- ✓ Determinar as taxas de conversão e excessos enantioméricos dos substratos e produtos das biotransformações, respectivamente, por cromatografia gasosa utilizando coluna com fase estacionária quiral;

- ✓ Estabelecer a configuração absoluta dos enantiômeros em excesso produzidos nas biotransformações por polarimetria.



### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Materiais utilizados**

Todos os solventes orgânicos (grau P.A) utilizados foram obtidos da Êxodo científica. O solvente deuterado, clorofórmio-d1 (99,8%), foi adquirido da Cambridge Isotope Laboratories (CIL). O sulfato de sódio anidro foi adquirido da F. MAIA Indústria e Comércio. O meio de cultura ABD (Batata-Dextrose-Ágar) foi obtido da Acumedia e os reagentes para preparação do meio líquido Koch's K1 foram comprados da Synth (glicose anidra) e Merck (peptona e extrato de levedura). A acetofenona e os derivados foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

#### **3.2 Métodos cromatográficos**

##### **3.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)**

As análises por cromatografia de adsorção em camada delgada (CCD) empregadas no monitoramento das reações químicas foram realizadas em placas de alumínio recobertas com sílica gel de 250 µm de espessura de camada e dimensões de 20 x 20 cm, fornecidas pela Whatman® e fase móvel composta por hexano:AcOEt (8:2). A revelação das substâncias nas placas de CCD foi realizada incidindo sobre elas radiação ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e/ou 365 nm, além de uma solução ácida de vanilina utilizada como revelador.

##### **3.2.2 Cromatografia em coluna por adsorção**

As separações das substâncias foram realizadas por cromatografia em coluna tendo como fase estacionária sílica gel de granulação 0,063-0,200mm (70-230 MESH) adquirida da CRQ. A fase móvel empregada foi preparada a partir dos solventes orgânicos hexano e AcOEt na proporção 8:2, respectivamente, oriundos de fornecedores especializados já mencionados. A eluição ocorreu à pressão ambiente.

### 3.2.3 Cromatografia a gás com detector de ionização por chama

Para determinar o excesso enantiomérico e os valores de conversão das reações de biotransformação foi utilizado um cromatógrafo a gás do fabricante *Agilent Technologies*, modelo 7820A, com detector por ionização em chama e injetor automático. Os substratos e produtos de redução foram separados em coluna quiral cyclosil B 30% heptakis (2,3-di-O-metil-6-O-terc-butil-dimetilsilício)  $\beta$ -ciclodextrina com dimensões 28,5m x 0,25mm x 0,25  $\mu$ m (comprimento x diâmetro interno x espessura) e limites de temperatura de 10 a 220°C.

As temperaturas do detector e do injetor foram mantidas em 220°C, com o injetor operando em modo *split* 1:10. A vazão do gás de arraste (He) utilizada foi de 1,18 mL/min.

Os métodos analíticos usados nas análises por Cromatografia Gasosa, especificando as variáveis de temperatura durante as eluições, estão relacionados aos respectivos substratos e produtos analisados no apêndice C deste trabalho.

### 3.3 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

As análises por espectroscopia na região do IV foram realizadas na central analítica do Instituto de Química da UFBA, no espectrômetro Shimadzu com transformada de Fourier Affinity-1, modelo Shimadzu corp. 01645. As análises das amostras foram realizadas como filmes finos puros entre um par de janela de cloreto de sódio (NaCl), previamente polidas e limpas com clorofórmio.

### 3.4 Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ (RMN de $^1\text{H}$ )

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram adquiridos no Laboratório Baiano de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal da Bahia (LABAREM-UFBA), utilizando-se Espectrômetro Varian Inova 500 de 11,5 Tesla, operando na frequência de 500 MHz para o hidrogênio a 25°C. Clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) foi o solvente utilizado na dissolução das amostras para a obtenção dos espectros e o sinal residual do tetrametilsilano (TMS) foi usado na calibração dos espectros. Os

deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram dados em ppm e as constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hz.

### 3.5 Rotação específica e configuração absoluta dos álcoois (*R/S*)

A rotação específica das amostras foi medida em um polarímetro digital automático da marca PERKIN ELMER, modelo 343, pertencente à Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia. As medidas foram feitas no comprimento de onda de radiação do sódio ( $D = 589 \text{ nm}$ ), a uma temperatura de  $20^\circ\text{C}$ . Para dissolução das amostras foram empregados os solventes metanol, cicloexano e clorofórmio (Êxodo).

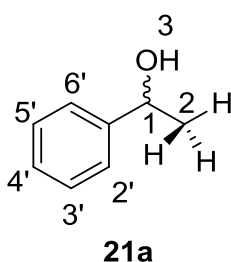
A configuração absoluta dos álcoois obtidos a partir das biotransformações da acetofenona ou de seus derivados foram determinadas comparando a rotação específica ( $\alpha_D^{20}$ ) experimental do mesmo com a  $\alpha_D^{20}$  encontrada na literatura e obtida sob as mesmas condições.

### 3.6 Redução química (produção de racemato) da acetofenona e seus derivados

Para possibilitar a caracterização dos produtos da biorredução dos substratos carbonílicos - acetofenona (**21**), 2-cloro-acetofenona (**22**), 4'-cloro-acetofenona (**23**), 4'-metóxi-acetofenona (**24**), 4'-nitro-acetofenona (**25**), 2-bromo-acetofenona (**26**) e 4'-bromo-acetofenona (**27**), os mesmos foram reduzidos quimicamente empregando borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), utilizando a metodologia descrita por Vogel (1974) com algumas modificações. Dessa forma, foram obtidos os padrões dos álcoois de estudo, os quais foram analisados por CG e possibilitaram comparações dos respectivos tempos de retenção.

Para isso, em um balão de fundo redondo de 125 mL de capacidade, foram adicionados 3 mmol de cada substrato carbonílico dissolvidos em 10,0 mL de metanol. Para cada reação foram adicionados 6 mmol de borohidreto de sódio sob banho de gelo. A mistura foi mantida sob agitação durante 1 hora. Em seguida, o metanol foi evaporado sob pressão reduzida, o material

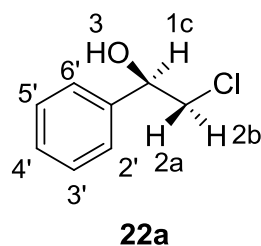
foi solubilizado em água e o respectivo álcool foi extraído com acetato de etila (AcOEt). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o produto foi concentrado em evaporador rotativo. Os álcoois racêmicos **1a-7a** foram purificados em coluna cromatográfica de gel de sílica utilizando como fase móvel uma mistura de hexano/AcOEt (8:2). Uma vez purificados, os álcoois foram caracterizados por análises espectroscópicas de RMN de  $^1\text{H}$  e no infravermelho.



1-feniletanol (**21a**). **RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm): 1,47 (*d*, 3H,  $\text{CH}_3$ ;  $J = 6,4$  Hz), 2,70 (*s*, 1H, OH), 4,84 (*q*, 1H, CH;  $J = 6,4$  Hz), 7,30-7,37 (*m*, 5H, ArH). (AIMAR et al., 2014).

**IV:** (O-H):  $3360,00\text{ cm}^{-1}$ ; (C-H):  $2877,59\text{ cm}^{-1}$ ; (C-O):  $1099,43\text{ cm}^{-1}$ ; (C-H):  $2974,23\text{ cm}^{-1}$ ; ( $\text{Ar}_{\text{C-H}}$ ):  $759,95$  e  $698,23\text{ cm}^{-1}$

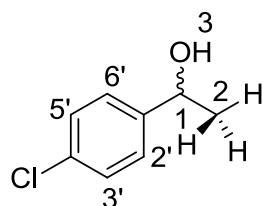
**CG:**  $t_r$  (*R*) = 18,21 min;  $t_r$  (*S*) = 18,70 min



2-cloro-1-feniletanol (**22a**). **RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm): 2,66 (*s*, 1H, OH), 3,66 (*dd*, 1H,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 8,7$  e  $11,2$ ); 3,74 (*dd*, 1H,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 3,5$  e  $11,2$ ), 4,90 (*dd*, 1H, CH,  $J = 3,5$  e  $8,7$ ), 7,33–7,40 (*m*, 5H, ArH). (AGUIRRE-PRANZONI et al., 2014).

**IV:** (O-H):  $3390,86\text{ cm}^{-1}$ ; ((C-H ( $\text{CH}_2$ ))):  $1454,33\text{ cm}^{-1}$ ; (C-O):  $1104,71\text{ cm}^{-1}$ ; (( $\text{Ar}_{\text{C-H}}$ )):  $767,67$  e  $698,38\text{ cm}^{-1}$ ; (C-Cl):  $613,36\text{ cm}^{-1}$ .

**CG:**  $t_r$  (S) = 41,14 min;  $t_r$  (R) = 43,17 min

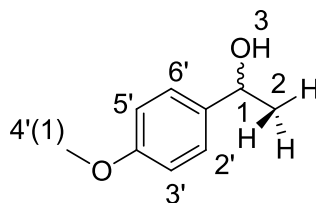


**23a**

4'-cloro-1-feniletanol (**23a**). **RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm): 1.47 (*d*, 3H,  $\text{CH}_3$ ,  $J = 6,4$ ), 2.29 (*s*, 1H, OH), 4.86 (*q*, 1H, CH,  $J = 6,4$ ), 7.28–7.33 (*m*, 5H, ArH). (DECARLINI et al., 2017).

**IV:** (O-H):  $3348,42\text{ cm}^{-1}$ ; (C-H):  $2885,51\text{ cm}^{-1}$ ; (C-O):  $1102,36\text{ cm}^{-1}$ ; ( $\text{Ar}_{\text{C-H}}$ ):  $829,39\text{ cm}^{-1}$ .

**CG:**  $t_r$  (R) = 37,77 min;  $t_r$  (S) = 39,74 min

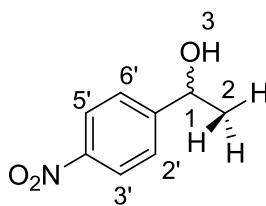


**24a**

4'-metóxi-1-feniletanol (**24a**). **RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm): 1.47 (*d*, 3H,  $\text{CH}_3$ ;  $J = 6,4\text{ Hz}$ ), 2.28 (*s*, 1H, OH), 3.80 (*s*, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.83 (*q*, 1H, CH;  $J = 6,4\text{ Hz}$ ), 6,88 (*d*, 2H, ArH,  $J = 8,7\text{ Hz}$ ). 7,29 (*d*, 2H, ArH,  $J = 8,7\text{ Hz}$ ). (CHANYTSHEVA; VOROBYOVA; ZORIN, 2019).

**IV:** (O-H):  $3360,00\text{ cm}^{-1}$ ; (C-H):  $2835\text{ cm}^{-1}$ ; (C-O<sub>éter</sub>):  $1246,02$  e  $1033,85\text{ cm}^{-1}$ ; (C-O<sub>álcool</sub>):  $1087,75\text{ cm}^{-1}$ ; ( $\text{Ar}_{\text{C-H}}$ ):  $833,25\text{ cm}^{-1}$

**CG:**  $t_r$  (R) = 39,39 min;  $t_r$  (S) = 40,15 min

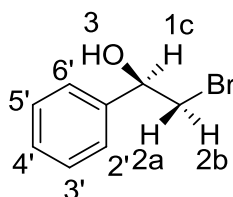


**25a**

4'-nitro-1-feniletanol (**25a**). **RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm): 1.45 (*d*, 3H,  $\text{CH}_3$ ;  $J = 6.4$ ), 3.20 (*s*, 1H, OH), 4.95 (*q*, 1H, CH;  $J = 6.4$ ), 7.46 (*d*, 2H, ArH,  $J = 8,7$  Hz); 8,08 (*d*, 2H, ArH,  $J = 8,7$  Hz), (ORDEN et al., 2009).

**IV:** (O-H):  $3390,86\text{ cm}^{-1}$ ; (C-H):  $2870,08\text{ cm}^{-1}$ ; (C-O):  $1109,07\text{ cm}^{-1}$ ; ( $\text{Ar}_{\text{C-H}}$ ):  $854,47\text{ cm}^{-1}$ ; (N- $\text{ONO}_2$ ):  $1519,91$  e  $1346,31\text{ cm}^{-1}$  (deformações axiais assimétrica e simétrica, respectivamente).

**CG:**  $t_r$  (*R*) = 85,34 min;  $t_r$  (*S*) = 86,26 min

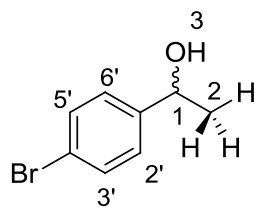


**26a**

2-bromo-1-feniletanol (**26a**). **RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm): 2,72 (*s*, 1H, OH), 3,56 (*dd*, 1H,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 9,1$  e  $10,6$ ), 3,66 (*dd*, 1H,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 3,4$  e  $10,6$ ), 4,94 (*dd*, 1H, CH,  $J = 3,4$  e  $9,1$ ), 7,36–7,40 (*m*, 5H, ArH). (AGUIRRE-PRANZONI et al., 2014).

**IV:** (O-H):  $3421,72\text{ cm}^{-1}$ ; (C-H):  $2831,50\text{ cm}^{-1}$ ; (C-O):  $1111,00\text{ cm}^{-1}$ ; ( $\text{Ar}_{\text{C-H}}$ ):  $759,95$  e  $698,23\text{ cm}^{-1}$ ; ((C-H ( $\text{CH}_2$ )):  $1452,40\text{ cm}^{-1}$ , (C-Br):  $665,44\text{ cm}^{-1}$

**CG:**  $t_r$  (*R*) = 54,52 min;  $t_r$  (*S*) = 56,50



**27a**

4'-bromo-1-feniletanol (**27a**). **RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm): 1,49 (*d*, 3H,  $\text{CH}_3$ ,  $J = 6,4$ ), 4,89 (*q*, 1H, CH,  $J = 6,4$ ), 7,26-7,50 *m*, 5H, ArH) (NAKAMURA; MATSUDA, 1998).

**IV:** (O-H): 3334,92  $\text{cm}^{-1}$ ; (C-O): 1085,92  $\text{cm}^{-1}$ ; (C-H): 2879,72  $\text{cm}^{-1}$ ; ( $\text{Ar}_{\text{C-H}}$ ): 823,60  $\text{cm}^{-1}$ ;

**CG:**  $t_r$  (*R*) = 52,16 min;  $t_r$  (*S*) = 53,89 min

### 3.7 Fungos endofíticos

#### 3.7.1 Isolamento dos fungos das folhas da *Handroanthus impetiginosus*

O material vegetal (folhas) que foi usado como fonte dos fungos endofíticos foi coletado em Alfenas - Minas Gerais (S 21° 18' 49.15, O 45° 57' 28.53"). Foram coletadas folhas sadias de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos (número do cadastro de acesso SISGEN A913C3F), cuja identidade foi confirmada pela bióloga Dra. Lúcia G. Lohmann do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. A excicata do material vegetal foi depositada no herbário da Universidade Federal de Alfenas sob o número 2535.

Após a coleta do material, esse foi envolvido em jornal para o transporte e armazenado em caixa de isopor, até receber o tratamento adequado para o isolamento dos micro-organismos endofíticos. Todos os materiais utilizados no isolamento dos fungos endofíticos, tais como placas de Petri, pinças, bisturis, béqueres, água destilada e meios de cultura, foram previamente esterilizados em autoclave a 121 °C (um atmosfera de pressão), durante 15 minutos.

Inicialmente foi realizada esterilização do material vegetal para garantir a eliminação dos micro-organismos epifíticos. Para isso, foram realizadas diferentes submersões consecutivas das folhas na seguinte ordem: I) álcool

etílico 70%, durante 2,5 minutos; II) solução de hipoclorito de sódio a 5%, durante 60, 90 segundos e 5 minutos; III) solução de álcool etílico 70%, por 1 minuto; e IV) água destilada esterilizada. Após a esterilização, o material vegetal foi cortado com o auxílio de bisturi e pinça em fragmentos pequenos (5 x 5 mm) em placa de vidro, dentro de capela de fluxo laminar. Os fragmentos das folhas foram inoculados, separadamente, em placas de Petri contendo 20 mL de meio ABD (ágar batata dextrose) acrescido de 0,5 g/L de cloranfenicol, para possibilitar o crescimento somente dos fungos endofíticos.

A água esterilizada utilizada na última etapa da esterilização também foi inoculada e funcionou como controle do experimento, ou seja, a inexistência de crescimento microbiano no meio de cultura onde a água foi inoculada certificou a existência de micro-organismos exclusivamente endofíticos.

Todas as placas de Petri foram incubadas à temperatura ambiente e observadas diariamente para acompanhamento do crescimento das colônias fúngicas. Cada nova colônia que surgiu no decorrer do período de incubação foi retirada da placa de Petri original e inoculada em novas placas de Petri contendo meio ABD. Após a confirmação de que as colônias dos fungos endofíticos apresentavam-se puras, fragmentos contendo micélio-ágar foram extraídos com auxílio de dispositivos específicos esterilizados (transfertubes) e transferidos para criotubos contendo água destilada esterilizada. Os criotubos foram selados com filme plástico, identificados e armazenados sob refrigeração (4°C) para a confecção de uma biblioteca de fungos endofíticos (micoteca endofítica).

**Obs.: O isolamento dos fungos foi realizado por colaboradores da Universidade Federal de Alfenas, antes do desenvolvimento deste trabalho. O processo de isolamento foi adicionado apenas para conhecimento e esclarecimento ao leitor.**

### 3.7.2 Preparação dos estoques dos fungos endofíticos

Para confecção dos estoques das culturas fúngicas, todos os fungos utilizados neste estudo foram cultivados separadamente em placas de Petri



contendo o meio sólido ABD (Ágar Batata Dextrose) e incubados à 28°C em câmara DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), durante sete dias. Após esse período, 10 discos contendo micélio-ágar de aproximadamente 6 mm de diâmetro, obtidos com auxílio de um tubo de transferência esterilizado (transfertube), foram transferidos para frascos do tipo eppendorf® esterilizados, contendo 1 mL de solução (500 µL de água destilada e 500µL de glicerol). Os frascos foram, então, vedados com filme plástico e armazenados sob refrigeração (-22 °C).

### **3.8 Biotransformação de cetonas pró-quirais por fungos endofíticos**

#### **3.8.1 Cultura dos fungos endofíticos em meio ABD**

Os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo meio ABD preparado conforme a descrição do rótulo (39 gramas do meio para cada 1000 mL de água destilada). A solubilização do meio de cultura foi realizada em frascos tipo erlenmeyer que foi então levado à ebulição. Em seguida, o erlenmeyer foi vedado com um chumaço de algodão hidrofóbico e esterilizado durante 15 minutos em autoclave à pressão de 1 atm e temperatura de 121°C. Após esse período o material foi transferido para uma câmara de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool etílico 70% e radiação ultravioleta durante 15 minutos. O meio de cultura foi transferido ainda quente para as placas de Petri esterilizadas e deixado em repouso até completa solidificação. Em seguida, os fungos foram inoculados e as placas foram armazenadas em DBO à 28°C durante 7 dias.

#### **3.8.2 Investigações sobre a biotransformação da acetofenona por fungos endofíticos**

O potencial biocatalítico de sete fungos endofíticos isolados das folhas da *H. impetiginosus* foi avaliado na redução estereosseletiva da acetofenona (**21**). Inicialmente os fungos foram nomeados com os códigos H2, H3, H4, H5, H6, H6.1 e H7.1. A biotransformação da acetofenona ocorreu em meio Koch's K1 (1,8 g de glicose, 0,6 g de peptona e 0,4 g de extrato de levedura para 1L de água destilada) em frascos tipo Erlenmeyer de 250

mL de capacidade contendo 100 mL de meio de cultura. Todas as reações foram realizadas em duplicata e para cada fungo foi preparado um controle, o qual não continha o substrato. Foram adicionados a cada Erlenmeyer 0,5287 g da acetofenona solubilizados em 300 µL de DMSO, juntamente com 15 discos de 6 mm de diâmetro do respectivo fungo (780 mg). Nos frascos controles foram adicionados 300 µL de DMSO juntamente com 15 discos de 6 mm de diâmetro do respectivo fungo. Os Erlenmeyers foram vedados e incubados em mesa agitadora durante três dias, sob rotação de 120 rpm e temperatura de 28°C.

Após concluir o tempo de reação, foi realizada uma filtração a vácuo para separar o caldo dos micélios do fungo. O caldo foi então extraído utilizando acetato de etila e a fase orgânica foi concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida. O extrato bruto obtido foi pesado para determinação dos rendimentos e, a partir dele, foi preparada uma solução de concentração de 5 mg/mL a qual foi analisada em CG empregando fase estacionária quiral.

### 3.8.3 Otimização da biotransformação da acetofenona pelo fungo endofítico H4

O fungo endofítico H4 foi selecionado para os estudos sobre os parâmetros que interferem na reação de biotransformação da acetofenona. Para isso, a biotransformação da acetofenona foi otimizada avaliando os parâmetros: (i) temperatura reacional (26, 28 e 30 °C); (ii) velocidade de agitação (80, 120 e 140 rpm); (iii) quantidade de substrato (0,22, 0,44 e 0,88 mmol); (iv) quantidade de fungo (5, 10, 15 e 20 discos de 6 mm de diâmetro); (v) tempo de reação (um, dois, três, quatro e cinco dias); (vi) co-solvente empregado na solubilização da acetofenona (etanol, metanol, butanol, cicloexanol, glicerol, DMSO, isopropanol, THF e acetona) e (vii) pH do meio de cultura (5,0, 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0).

#### 3.8.4 Biotransformação dos derivados da acetofenona pelo fungo endofítico H4

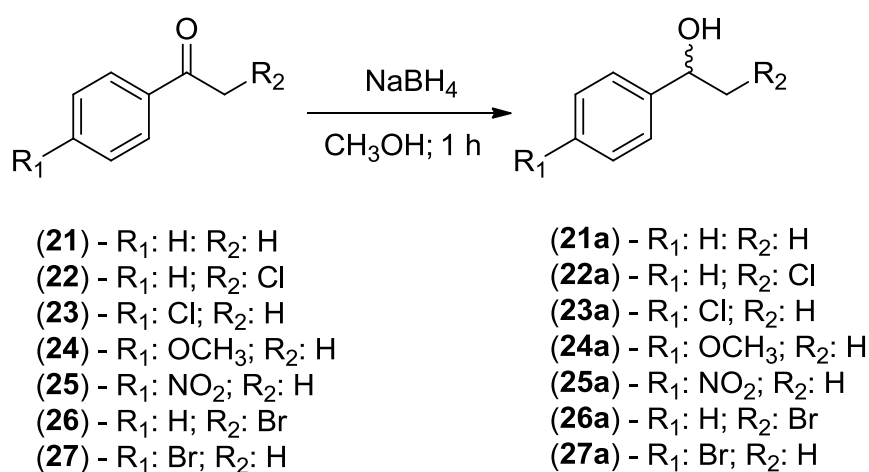
Após definir as condições ótimas para biotransformação da acetofenona, ou seja, as condições que geraram maiores taxas de conversão e melhores excessos enantioméricos, fez-se novas biotransformações da mesma e de seis dos seus derivados - 2-cloro-acetofenona (**22**), 4'-cloro-acetofenona (**23**), 4'-metóxi-acetofenona (**24**), 4'-nitro-acetofenona (**25**), 2-bromo-acetofenona (**26**) e 4'-bromo-acetofenona (**27**) empregando o fungo endofítico H4 e as condições otimizadas.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Síntese química dos álcoois quirais (padrões) utilizando NaBH<sub>4</sub>

Os álcoois quirais foram sintetizados por meio de redução seguindo protocolos disponíveis na literatura (Vogel, 1974). A equação química geral do processo de redução dos vários compostos carbonílicos empregados no presente estudo está descrita no esquema 6.

Esquema 6: Equação química geral da redução das acetofenonas usadas como substratos nas reações de biotransformação.



O acompanhamento sobre a ocorrência das reações foi realizado por cromatografia em camada delgada (CCD). A redução química foi encerrada após a observação de uma única mancha na cromatoplaça, numa posição diferente do substrato. Observou-se, como esperado, que os produtos das reduções dos compostos carbonílicos interagem mais fortemente com a fase estacionária, quando comparados às acetofenonas de partida. Essa maior interação é resultante do fato dos álcoois serem substâncias de maior polaridade quando comparados com as cetonas de partida. As hidroxilas presentes no grupo funcional álcool, realizam interações do tipo ligação de hidrogênio com as moléculas de SiO<sub>2</sub>, e essas interações são consideradas mais fortes em comparação com as realizadas pelas moléculas de cetonas. Desiraju et. al,(1999) e Jeffrey, (1997) estabelecem que praticamente todas as interações do tipo (C–H.....O), (C–H.....N), (C–H.....π), encontram-se

na fronteira entre forças de ligação de hidrogênio e forças de van der Waals. Essa afirmação leva à inferir que embora as cetonas possam apresentar interações do tipo de hidrogênio, estas ainda serão de intensidade inferior às realizadas pelos álcoois.

#### 4.2 Purificação e caracterização dos álcoois quirais (padrões)

Após o encerramento das reações, foram realizadas colunas cromatográficas clássicas para purificar e isolar os produtos, os rendimentos obtidos estão apresentados na Tabela 3. Os produtos resultantes da redução química das cetonas (álcoois **1a-7a**) foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e infravermelho (IV), como descrito a seguir.

Tabela 3: Rendimentos dos produtos obtidos após redução química da acetofenona e derivados.

Produto	Rendimento (%)
21a	84
22a	76
23a	81
24a	88
25a	71
26a	83
27a	69

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Anexo A) da redução química da acetofenona (**21**) forneceu quatro sinais de hidrogênios quimicamente distintos. O primeiro tratou-se de um dubleto ( $d$ ) com um deslocamento químico ( $\delta$ ) de 1,47 ppm, integrando pra três hidrogênios e uma constante de acoplamento ( $J$ ) de 6,4 Hz. Um sinal com característica de dubleto é um

indicativo de que o hidrogênio ao qual este sinal está sendo atribuído está vizinho a um único hidrogênio quimicamente distinto. Além disso, o sinal referente ao dubleto apresentou integral igual a três, indicando a existência de três hidrogênios equivalentes, levando a inferir que se tratava de hidrogênios metílicos.

O segundo sinal era um singleto (s) com deslocamento químico 2,70 ppm, integrando para 1. Um singleto indica que não há hidrogênios vizinhos realizando acoplamento, pela análise da estrutura esperada do produto, pode-se inferir que esse singleto é característico de um hidrogênio de hidroxila de álcoois. Pavia, et al., (2015) estabeleceram que as hidroxilas características de álcoois apresentam valores de deslocamento químico variando de 2-5 ppm. O terceiro sinal consistiu de um quadrupeto (q), de  $\delta$  4,84 ppm, com constante de acoplamento,  $J = 6,4$  Hz e integral 1. A multiplicidade deste hidrogênio significa que o mesmo encontrava-se vizinho a três hidrogênios de mesma equivalência magnética. A constante  $J$  igual a 6,4 Hz indicou que ele acoplava com os hidrogênios metílicos (CH<sub>3</sub>) anteriormente mencionados.

A integral igual a um refere-se à existência de um único hidrogênio proveniente desse sinal, desta forma, pode-se inferir que se tratava de um hidrogênio metínico (CH). Pavia, et al., (2015) abordaram os deslocamentos químicos de hidrogênios de grupos –CH com valores de aproximadamente  $\delta$  1,4 ppm. Entretanto, o sinal obtido foi de 4,84 ppm, esse valor indica que o –CH está ligado a grupos que concentram entorno de si uma maior densidade eletrônica (retiradores de elétrons), tornando o núcleo do hidrogênio metínico mais desblindado. O quarto sinal era um multipeto de  $\delta$  7,30-7,37 ppm, com integral pra cinco hidrogênios.

A região que varia de 6,5-8,0 ppm é descrita por Pavia, et al., (2015) como região característica de hidrogênios aromáticos (Ar-H), levando a inferir que este sinal era referente aos cinco hidrogênios do anel aromático. Portanto, pode-se inferir que o produto da redução da acetofenona (**21**) tratava-se do 1-feniletanol (**21a**). Os deslocamentos químicos descritos

neste trabalho estão de acordo com aqueles relatados na literatura para **21a** (AIMAR et al., 2014).

Tabela 4: Sinais obtidos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do produto **21a**.

Posição	$\delta(\text{ppm}), m, n\text{H}, J(\text{Hz})$	$\delta(\text{ppm}), m, n\text{H}, J(\text{Hz})^*$
1	1,47, <i>d</i> , 3H, CH <sub>3</sub> , 6,4	1,49, <i>d</i> , 3H, CH <sub>3</sub>
2	2,70, <i>s</i> , 1H, OH	2,03, <i>s</i> , 1H, OH
3	4,84, <i>q</i> , 1H, CH, 6,4	4,89, <i>q</i> , 1H, CH
2'3'4'5'	7,26-7,37, <i>m</i> , 5H, ArH	7,25-7,39, <i>m</i> , 5H, ArH

\*AIMAR et al., 2014

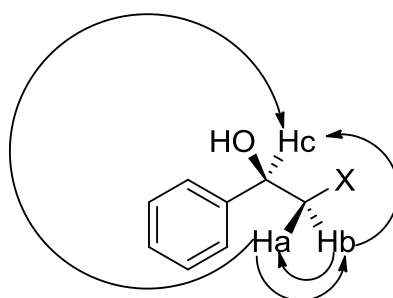
A análise do espectro no infravermelho (Anexo B) reforçou as evidências de formação do produto **21a** devido à presença de uma banda característica de O-H na região de  $3360,00\text{ cm}^{-1}$ . Além dessa banda, notaram-se estiramentos da ligação C-O em  $1099,43\text{ cm}^{-1}$ , característico de álcool secundário e da ligação C-H em  $2974,23\text{ cm}^{-1}$ , proveniente do carbono assimétrico. Observaram-se ainda dois picos referentes à deformação angular nas regiões de  $759,95$  e  $698,23\text{ cm}^{-1}$ , oriundos dos cinco hidrogênios do anel aromático, indicando um composto aromático mono-substituído.

Em seguida passou-se à identificação dos produtos obtidos da redução dos derivados da acetofenona com substituição de um dos hidrogênicos  $\alpha$  carbonílicos pelos halogênios cloro e bromo (2-cloro-acetofenona (**22**) e 2-bromo-acetofenona (**26**)). Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Anexo A) das reduções químicas de **22** e **26** resultou em cinco hidrogênios quimicamente distintos. O primeiro sinal era referente a um multipeto na região de deslocamento químico variando de 7,33-7,40 ppm. Este sinal tinha integral para cinco hidrogênios e estava situado numa região característica de hidrogênios aromáticos, podendo-se inferir que se tratava de hidrogênios característicos de anel aromático mono-substituído.

O segundo sinal apresentou multiplicidade de duplo dubleto (*dd*) com deslocamento químico na região de 4,90 ppm, indicando que este hidrogênio está vizinho a dois outros quimicamente distintos. A integral igual a 1 e o valor de  $\delta$ , apontavam para a presença de um hidrogênio metínico vizinho a um grupo retirador de densidade eletrônica. As constantes de acoplamento foram calculadas obtendo-se os valores de  $^3J = 3,5$  e  $8,6$  Hz. Um singlete de deslocamento químico por volta de 2,70 e integral um, indicava a existência de um hidrogênio sem outros hidrogênios vizinhos, este sinal era de baixa intensidade e encontrava-se numa região característica de hidrogênios de hidroxila. Em 3,56 e 3,75 ppm, observaram-se dois duplos dubletos, ambos com integral 1 (um hidrogênio quimicamente distinto para cada duplo dubleto). Essa observação implica que esses hidrogênios estavam ligados ao mesmo carbono, porém, sem equivalência química, podendo estar vizinhos a um centro estereogênico sendo, portanto, hidrogênios diastereotópicos.

A formação de um duplo dubleto para o hidrogênio diastereotópico,  $H_a$  se deu como consequência do acoplamento com os hidrogênios  $H_b$  (geminal) e  $H_c$  (vicinal), o mesmo ocorreu quando analisamos o duplo dubleto  $H_b$ . Os valores de  $J$  foram calculados para todos os acoplamentos ( $^2J_{ab} = 11,2$  Hz,  $^3J_{ac} = 8,7$  Hz,  $^3J_{bc} = 3,5$  Hz) (Figura 11).

Figura 11: Acoplamento entre os hidrogênios  $H_a$ ,  $H_b$  e  $H_c$ .



A diferença nos valores dos  $^3J$  é resultante do ângulo diedro formado entre as espécies que estavam acoplando, no acoplamento  $H_a$ - $H_c$  o ângulo diedro foi de  $180^\circ$  enquanto que em  $H_b$ - $H_c$  foi equivalente a  $60^\circ$  (PAVIA, et al., 2015). O primeiro duplo dupleto (3,65 e 3,68 ppm), o mais protegido, pode ser atribuído ao hidrogênio codificado por  $H_a$ , visto que este localiza-se



do mesmo lado da hidroxila, dessa forma, ocorreu uma proteção oriunda da proximidade de H<sub>a</sub> com um grupo de maior densidade eletrônica, resultando na blindagem do seu núcleo. O segundo duplo duplete (3,75 ppm) pode ser atribuído ao hidrogênio H<sub>b</sub>, situado diametralmente oposto ao grupo hidroxila, não tendo, portanto, seus núcleos blindados pelos elétrons da hidroxila. Desta forma, têm-se evidências da formação do produto 2-cloro-1-feniletanol (**2a**). Os  $\delta$  aqui descritos estão de acordo com aqueles relatados na literatura para **2a** (AGUIRRE-PRANZONI et al., 2014). Os dados de RMN descritos acima estão relatados na tabela 5.

Tabela 5: Sinais obtidos dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H dos produtos **22a** e **26a**.

<b>2-cloro-1-feniletanol (22a)</b>		
<b>Posição</b>	$\delta$ (ppm), <i>m</i> , nH, J(Hz)	$\delta$ (ppm), <i>m</i> , nH, J(Hz)*
1c	4,90, <i>q</i> , 1H, CH, 6,4	4,87, <i>q</i> , 1H, CH, 6,4
2a	3,74, <i>dd</i> , 1H, CH <sub>2</sub> , 3,5 e 11,2	3,73, <i>dd</i> , 1H, CH <sub>2</sub> , 3,5 e 11,2
2b	3,65, <i>dd</i> , 1H, CH <sub>2</sub> , 8,7 e 11,2	3,65, <i>dd</i> , 1H, CH <sub>2</sub> , 3,5 e 11,2
3	2,66, <i>s</i> , 1H, CH	2,79, <i>s</i> , 1H, CH
2'3'4'5'	7,33-7,40, <i>m</i> , 5H, ArH	7,25-7,36, <i>m</i> , 5H, ArH
<b>2-bromo-1-feniletanol (26a)</b>		
<b>Posição</b>	$\delta$ (ppm), <i>m</i> , nH, J(Hz)	$\delta$ (ppm), <i>m</i> , nH, J(Hz)*
1c	4,94, <i>q</i> , 1H, CH	4,87, <i>q</i> , 1H, CH
2a	3,66, <i>dd</i> , 1H, CH <sub>2</sub> , 3,4 e 10,6	3,76, <i>dd</i> , 1H, CH <sub>2</sub> , 3,5 e 10,4
2b	3,56, <i>dd</i> , 1H, CH <sub>2</sub> , 9,1 e 10,6	3,66, <i>dd</i> , 1H, CH <sub>2</sub> , 8,7 e 10,4
3	2,72, <i>s</i> , 1H, OH	2,65, <i>s</i> , 1H, OH
2'3'4'5'6'	7,38-7,53, <i>m</i> , 5H, ArH	7,25-7,42, <i>m</i> , 5H, ArH

\*Aguirre-Pranzoni, 2014.

O espectro no infravermelho (Anexo B) do produto obtido apresentou sinais que potencializam a suspeita da formação de **22a** e **26a**, o primeiro era uma banda larga na região de 3390,86 cm<sup>-1</sup>, característica de O-H de álcoois, seguida por uma deformação na região de 1104,71 cm<sup>-1</sup> (C-O) comumente observada em álcool secundário. Uma deformação no entorno

de  $1454,33\text{ cm}^{-1}$  é um indicativo da existência de  $(\text{CH}_2)_n$  de cadeias alifáticas com  $n < 3$ , juntamente a esta, observou-se uma deformação em  $613,36\text{ cm}^{-1}$ , inerente de ligações C-X. Além desses sinais, foi possível observar nas regiões de  $767,67$  e  $698,38\text{ cm}^{-1}$ , picos intensos referentes à deformação angular oriunda dos cinco hidrogênios do anel aromático.

Dando sequência às identificações dos padrões, a análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Anexo A) oriundos das reduções químicas das acetofenonas substituídas na posição 4 do anel pelos halogênios cloro e bromo (4'-cloro-acetofenona (**23**) e 4'-bromo-acetofenona (**27**)) forneceu quatro sinais de hidrogênios quimicamente distintos. O primeiro era um dubleto (*d*) com um deslocamento químico ( $\delta$ ) de 1,46 ppm, integrando pra três e uma constante de acoplamento *J* de 6,4 Hz. Além disso, o sinal referente ao dupleto apresentou integral igual a três, indicando a existência de três hidrogênios equivalentes pouco deslocados, semelhante ao observado para grupos metila. O segundo sinal era um singlete (*s*) de deslocamento químico 2,26 ppm, largo e de baixa intensidade integrando pra 1, comumente observado em espectro de substância contendo ligações O-H.

O terceiro sinal consistiu de um quadrupletto (*q*), de  $\delta$  4,85 ppm, uma constante de acoplamento, *J* = 6,4 Hz e integral equivalente a um hidrogênio. A multiplicidade deste hidrogênio juntamente com o valor de *J* = 6,4 Hz, indicou um acoplamento com o primeiro sinal analisado. O quarto sinal corresponde a um multipletto variando de 7,25 a 7,31 ppm de integral equivalente a 5, este sinal é referente aos hidrogênios do anel aromático. Os valores de  $\delta$  discutidos ao longo dessa seção estão de acordo com aqueles obtidos na literatura para **23a** e **27a** (DECARLINI et al., 2017)(NAKAMURA e MATSUDA, 1998). Os dados de RMN relatados acima estão descritos na tabela 6.

Tabela 6: Sinais obtidos dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos produtos **23a** e **27a**.

<b>4'-cloro-1-feniletanol (23a)</b>		
<b>Posição</b>	$\delta$ (ppm), <i>m</i> , nH, <i>J</i> (Hz)	$\delta$ (ppm), <i>m</i> , nH, <i>J</i> (Hz)*
1	1,47, <i>d</i> , 3H, CH <sub>3</sub> , 6,4	1,47, <i>d</i> , 3H, CH <sub>3</sub> , 6,4
2	2,29, <i>s</i> , 1H, OH	1,83, <i>s</i> , 1H, OH
3	4,86, <i>q</i> , 1H, CH, 6,4	4,87, <i>q</i> , 1H, CH, 6,4
2'3'4'5'	7,28-7,33, <i>m</i> , 4H, ArH	7,26-7,31, <i>m</i> , 4H, ArH
<b>4'-bromo-1-feniletanol (27a)</b>		
<b>Posição</b>	$\delta$ (ppm), <i>m</i> , nH, <i>J</i> (Hz)	$\delta$ (ppm), <i>m</i> , nH, <i>J</i> (Hz)**
1	1,49, <i>d</i> , 3H, CH <sub>3</sub> , 6,4	1,46, <i>d</i> , 3H, CH <sub>3</sub> , 6,2
2	1,73, <i>s</i> , 1H, OH	1,9, <i>s</i> , 1H, OH
3	4,89, <i>q</i> , 1H, CH, 6,4	4,86, <i>q</i> , 1H, CH, 6,2
2'3'4'5'	7,26-7,50, <i>m</i> , 4H, ArH	7,20-7,50, <i>m</i> , 4H, ArH

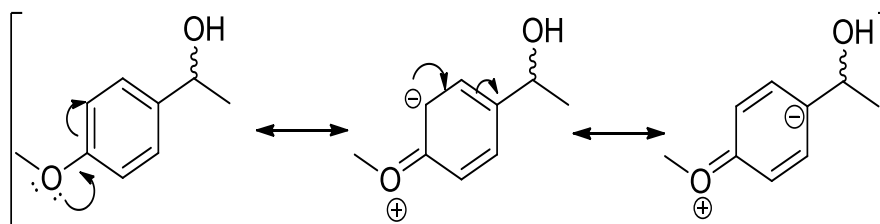
Decarlini et al., 2017\* Nakamura e Matsuda, 1998\*\*

Como forma de sustentar os dados anteriores, a análise do espectro de infravermelho (Anexo B) do produto foi realizada indicando a presença de alguns sinais características, a exemplo de uma banda larga de grande intensidade na região de  $3348,42\text{ cm}^{-1}$  indicando um grupamento O-H e uma deformação na região de  $1102,35\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação C-O característicos de álcoois. Outro sinal de grande intensidade na região de  $829,389\text{ cm}^{-1}$  decorre da deformação angular de hidrogênios arílicos em anéis *para*-substituídos.

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Anexo A) do produto obtido da redução química da 4'-metóxi-acetofenona (**24**) forneceu seis sinais de hidrogênios magneticamente diferentes, o primeiro era um dubleto (*d*) com um ( $\delta$ ) de 1,47 ppm, integrando pra três e uma constante de acoplamento *J* de 6,4 Hz indicando a existência de um grupo metila. O segundo sinal foi referente a um singleto (*s*) de deslocamento químico 2,28 ppm, integrando pra um, com características de um hidrogênio de hidroxila de álcoois. O terceiro sinal consistiu de um quadrupeto (*q*), de  $\delta$  4,83 ppm, de integral equivalente a 1 e uma constante de acoplamento, *J* = 6,4 Hz indicando um

acoplamento com a metila. A multiplicidade igual a um refere-se à existência de um único hidrogênio proveniente desse sinal. Desta forma, pode-se inferir que se trata de um hidrogênio metínico (CH). O quarto sinal era um singlete intenso com deslocamento químico igual a 3,80 ppm, de integral 3. Esse sinal é característico de metilas ligadas a espécies eletronegativas a exemplo do oxigênio em grupos metóxila (OCH<sub>3</sub>). Os dois últimos sinais eram referentes a dois dubletos um mais protegido na região de 6,88 ppm e outro em 7,29 ppm, com integrais igual a 2 e constante de acoplamento 8,6 Hz. Ambos os sinais encontravam-se na região de hidrogênios de anéis aromáticos, o desdobramento em dois dubletos é característico de anéis *para*-substituídos. O sinal em 6,88 ppm era referente aos hidrogênios mais próximos da metoxila, essa blindagem ocorre devido a -OCH<sub>3</sub> ser um grupo doador de densidade eletrônica por ressonância, deixando a posição *orto* em relação a ele com uma maior densidade de carga negativa, já na posição *meta* em relação a este substituinte não se observa essa contribuição do grupo metoxila o que resulta num maior deslocamento químico dos hidrogênios nessa posição. A Figura 12 demonstra as estruturas de ressonância que melhor explicam este processo.

Figura 12: Estruturas de ressonância para o 4'-metóxi-1-feniletanol (**24a**)



Os  $\delta$  aqui descritos estão de acordo com aqueles relatados na literatura para **24a** (CHANY SHEVA, VOROBYOVA e ZORIN, 2019). Os dados de RMN descritos acima, estão elaborados na tabela 7.

Tabela 7: Sinais obtidos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do produto **24a**.

Posição	$\delta(\text{ppm}), m, n\text{H}, J(\text{Hz})$	$\delta(\text{ppm}), m, n\text{H}, J(\text{Hz})^*$
1	1,47, <i>d</i> , 3H, CH <sub>3</sub> , 6,4	1,45, <i>d</i> , 3H, CH <sub>3</sub> , 6,4
2	2,28, <i>s</i> , 1H, OH	2,52, <i>s</i> , 1H, OH
3	4,83, <i>q</i> , 1H, CH, 6,4	4,85, <i>q</i> , 1H, CH, 6,4
2'6'	6,88, <i>d</i> , 2H, ArH 8,7	6,82, <i>d</i> , 2H, ArH, 8,7
3'5'	7,30, <i>d</i> , 2H, ArH, 8,7	7,10, <i>d</i> , 2H, ArH, 8,7
4'(1)	3,80, <i>s</i> , 3H, CH <sub>3</sub> O	3,74, <i>s</i> , 3H, CH <sub>3</sub> O

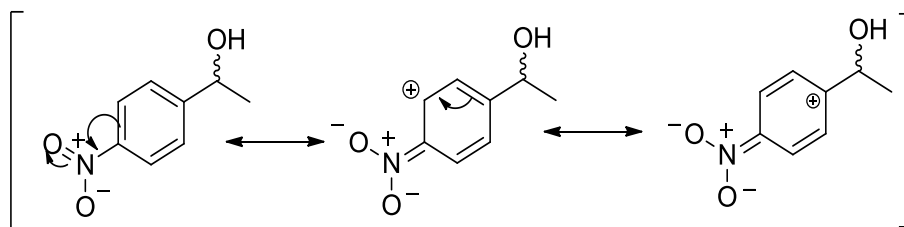
Analisando o espectro de Infravermelho (Anexo B) obtido, notou-se uma banda na região de  $3360,00\text{ cm}^{-1}$  característica de ligação O-H proveniente de álcool. Uma deformação angular em  $1087,75\text{ cm}^{-1}$  resultante de ligações C-O de álcoois secundários que reforça a formação do produto. Além disso, tem-se dois sinais de deformação angular nas regiões de  $1033,85$  e  $1246,02\text{ cm}^{-1}$  característicos da ligação C-O de éteres arílicos. Uma deformação angular fora do plano em  $833,25\text{ cm}^{-1}$  oriunda das ligações C-H de anéis aromáticos *para*-substituídos. Por fim, pode-se inferir com base nos dados de espectroscopia obtidos que o produto desejado **24a** foi formado.

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Anexo A) da redução da 4'-nitroacetofenona (**25**) por  $\text{NaBH}_4$  mostrou cinco sinais de hidrogênios quimicamente distintos. O primeiro foi um dubleto (*d*) com um deslocamento químico ( $\delta$ ) de 1,44 ppm, integrando pra três e uma constante de acoplamento *J* de 6,4 Hz. Um sinal comumente observado em substâncias contendo grupo metila. O segundo sinal era referente a um singleto (*s*) de deslocamento químico 3,20 ppm, e um valor de integral indicando a existência de um único hidrogênio atribuído a este sinal. O terceiro sinal consistiu num quadrupeto (*q*), de  $\delta$  4,95 ppm, uma constante de acoplamento, *J* = 6,4 Hz e integral 1. A multiplicidade deste hidrogênio significa que o mesmo encontra-se vizinho a três hidrogênios de mesma equivalência magnética, e a constante de acoplamento leva a inferir que um dos grupos vizinhos trata-se de uma metila. Os dois últimos sinais eram referentes a dois dubletos, um mais protegido na região de 7,47 ppm e outro

em 8,07 ppm, com integrais iguais a 2 e constantes de acoplamento equivalente a 8,6 Hz. Ambos encontravam-se na região de hidrogênios de anéis aromáticos, o desdobramento em dois dubletos é característico de anéis *para* substituídos. O sinal em 8,07, ppm era referente aos hidrogênios mais próximos do substituinte NO<sub>2</sub>, essa desproteção ocorre devido a este ser um grupo retirador de densidade eletrônica do anel aromático, conseqüentemente uma carga positiva é gerada deixando as posições *orto*, em relação a este substituinte, deficientes em elétrons. Já na posição meta em relação a este substituinte, não se observa a existência de uma carga positiva, deixando os hidrogênios presentes nessa posição mais protegidos. Os valores de deslocamento químico descritos para o produto formado estão alinhados com aqueles relatados na literatura para **25a** (CHANY SHEVA, VOROBYOVA e ZORIN, 2019). Os dados de RMN estão descritos na tabela 8.

A Figura 13 exibe as estruturas de ressonância que melhor explicam este fenômeno.

Figura 13: Estruturas de ressonância do 4'-nitro-1-feniletanol (**25a**)



A análise do espectro de infravermelho (Anexo B) foi realizada como suporte na elucidação do produto formado, ela revelou a presença de alguns picos característicos, dentre eles foram observados uma banda larga na região de 3390,86 cm<sup>-1</sup> comum em compostos com ligações do tipo O-H, uma deformação angular na região de 1109,07 cm<sup>-1</sup> referente à ligação C-O que reforça a existência de um álcool secundário. Uma deformação fora do plano na região de 854,47 cm<sup>-1</sup> referente à ligação C-H de aromáticos *para*-substituídos e dois sinais de deformações axiais assimétrica e simétrica em

1519,91 e 1454,43  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, característicos de grupos  $\text{NO}_2$ . Com base nas análises realizadas, pode-se inferir a formação do produto **25a** a partir da redução da substância **25**.

Tabela 8: Sinais obtidos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do produto **25a**.

Posição	$\delta(\text{ppm}), m, n\text{H}, J(\text{Hz})$	$\delta(\text{ppm}), m, n\text{H}, J(\text{Hz})^*$
1	1,45, <i>d</i> , 3H, $\text{CH}_3$ , 6,4	1,45, <i>d</i> , 3H, $\text{CH}_3$ , 6,4
2	3,20, <i>s</i> , 1H, OH	-
3	4,95, <i>q</i> , 1H, CH, 6,4	4,85, <i>q</i> , 1H, CH, 6,4
2'6'	7,47, <i>d</i> , 2H, ArH, 8,6	7,60, <i>d</i> , 2H, ArH, 8,6
3'5'	8,07, <i>d</i> , 2H, ArH, 8,6	8,16, <i>d</i> , 2H, ArH, 8,6

Chanysheva, Vorobyova e Zorin, 2019.\*

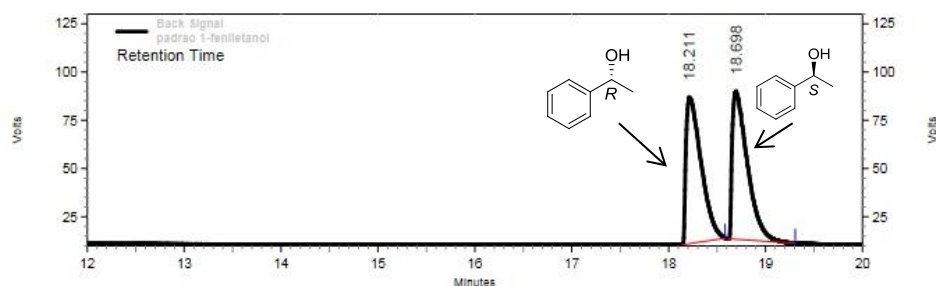
Após a confirmação dos os álcoois padrões, os mesmos juntamente com os substratos (acetofenonas) de origem foram analisados em CG empregando fase estacionária quiral. Foram obtidos os respectivos perfis químicos utilizados nas comparações com os resultados das biotransformações das mesmas acetofenonas pelos fungos endofíticos. Vale destacar aqui que foi analisada solução contendo padrão do (*S*)-feniletanol empregando-se as mesmas condições cromatográficas que as empregadas na análise de **21a**. Essa análise permitiu a determinação do tempo de retenção de cada um dos álcoois enantioméricos: (*R*)-feniletanol 18,211 min e (*S*)-feniletanol 18,698 min. A Figura 20 é referente ao cromatograma dos padrões (*R/S*)-1-feniletanol.

Figura 14: Cromatograma dos padrões (R/S)-1-feniletanol (1a)

Page 1 of 1

**Area % Report**

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\padrao 1-feniletanol.rsl\padrao 1-feniletanol.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Method\Novos metodos\teste.AF39min.met  
 Acquired: 4/2/2019 4:16:01 AM (GMT -03:00)  
 Printed: 4/2/2019 5:29:24 AM (GMT -03:00)



Back Signal Results				
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
18.211	6332265	49.54	583429	49.75
18.698	6450850	50.46	589219	50.25
Totals	12783115	100.00	1172648	100.00

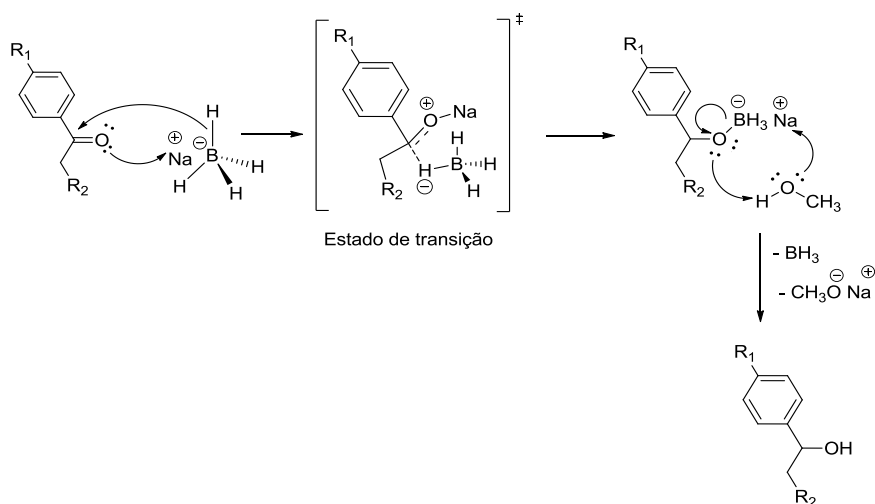
Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e infravermelho mencionados nesta seção, bem como os métodos analíticos empregados e os cromatogramas resultantes (dos substratos e produtos) estão ilustrados nos Apêndices A, B, C e D, respectivamente.

### 4.3 Mecanismo de redução química das acetofenonas por $\text{NaBH}_4$

A reação de redução de carbonilas de cetonas é também conhecida como reação de adição nucleofílica à carbonila. Neste tipo de reação, o nucleófilo ( $\text{BH}_4^-$ ), espécie que atua como uma base de Lewis, utiliza um orbital  $\sigma_{\text{B-H}}$  (HOMO), para se ligar ao orbital  $\pi^*_{\text{C-O}}$  (LUMO) da carbonila. Levando à formação de uma ligação  $\sigma_{\text{C-H}}$ . Apesar de o íon hidreto ( $\text{H}^-$ ) ser a espécie transferida, informações obtidas da literatura afirmam que os orbitais envolvidos na ligação não são os orbitais  $\pi^*_{\text{C-O}}$  e 1s do íon  $\text{H}^-$ . A justificativa para a não ocorrência baseia-se no fato da espécie  $\text{H}^-$  apresentar um orbital muito pequeno de energia e simetria não compatíveis para interagir com o orbital 2p do carbono levando à formação da ligação  $\sigma_{\text{C-H}}$  (ALVES e VICTOR, 2010).



Esquema 7: Proposta de mecanismo da adição de hidreto à carbonila nas reações de redução.



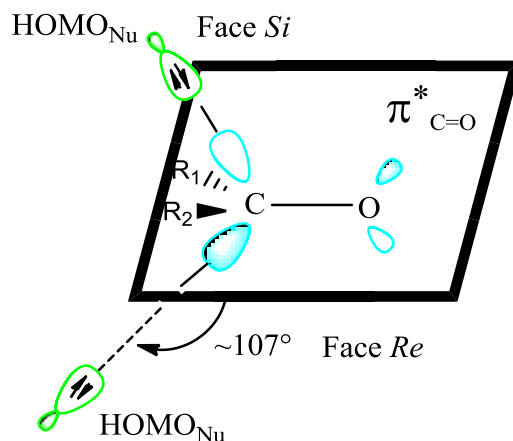
O esquema 7 ilustra uma proposta de mecanismo para a redução de cetonas empregando  $\text{NaBH}_4$ . No primeiro momento, o par de elétrons não ligante do oxigênio se coordena ao cátion sódio ( $\text{Na}^+$ ), contra-íon da espécie redutora, e essa coordenação retira ainda mais a densidade eletrônica da carbonila tornando o carbono mais eletrofílico. Ao mesmo tempo que a coordenação é realizada, o par eletrônico da ligação B-H (orbital  $\sigma_{\text{C-H}}$ ) é adicionado ao orbital  $\pi^*_{\text{C-O}}$  gerando um estado de transição (substrato-produto) onde o carbono passa de uma geometria  $\text{sp}^2$  para uma geometria  $\text{sp}^3$ .

As acetofenonas são espécies planares pró-quirais, desta forma, a adição do hidreto à carbonila pode ocorrer tanto pela face *Re* quanto pela face *Si*. As reações de redução desses compostos, utilizando o agente redutor borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), cujos substituintes da carbonila não apresentem centros assimétricos, levará à formação de uma mistura equimolar (mistura racêmica) dos dois enantiômeros. Nestas condições, essas faces são ditas faces enantiotópicas.

O íon hidreto, assim como outros nucleófilos (Nu), irá se aproximar da carbonila realizando uma trajetória com angulação de  $\sim 107^\circ$ , trajetória

chamada de trajetória de Bürgi-Dunitz. A aproximação do nucleófilo pode ser realizada por ambas as face. A Figura 18 ilustra a trajetória de Bürgi-Dunitz realizada pelo nucleófilo (BÜRGI, et al., 1974).

Figura 15: Trajetória de Bürgi-Dunitz realizada pelo nucleófilo para ser adicionada à carbonila

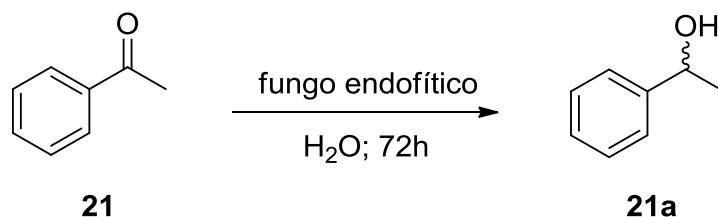


Nota-se (Figura 18) que os orbitais  $\pi^*$  do carbono carbonílico não se mantêm perpendiculares à ligação  $\sigma(C-O)$  quando o nucleófilo se aproxima. Há uma inclinação de  $\sim 107^\circ$ , a qual refere-se ao ângulo ideal para que o ataque do nucleófilo ocorra com mínimas repulsões geradas pelos orbitais  $\pi$  preenchidos (CLAYDEN, et al., 2000).

#### 4.4 Biotransformação da acetofenona por fungos endofíticos

A biotransformação da acetofenona (**21**) foi realizada empregando sete cepas de fungos filamentosos isolados como endofíticos das folhas da *Handroanthus impetiginosus*. O objetivo de tais biotransformações foi focado na detecção da biorredução seletiva da carbonila pró-quiral de **21**. O esquema 8 esboça a equação geral da biorredução da acetofenona.

Esquema 8: Equação geral da biorredução da acetofenona (**21**) por fungos endofíticos gerando 1-feniletanol (**21a**).



Como descrito na seção 3.8.2, seis fungos endofíticos (H2, H3, H4, H5, H6, H6.1 e H7.1) foram empregados na biotransformação da acetofenona em meio Koch's K1. Todas as reações foram realizadas em duplicata e para cada fungo foi preparado um controle, o qual não continha o substrato. Foram empregados 0,44 mmol (50  $\mu\text{L}$ ) da acetofenona solubilizados em 300  $\mu\text{L}$  de DMSO, juntamente com 15 discos de 6 mm de diâmetro do respectivo fungo. Nos frascos controles foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  de DMSO juntamente com 15 discos de 6 mm de diâmetro do respectivo fungo. As biotransformações ocorreram em mesa agitadora durante três dias, sob rotação de 120 rpm e a 28°C. Decorridos os três dias da biotransformação, as massas miceliais foram separadas dos caldos das culturas por filtração. Os caldos foram extraídos com AcOEt, gerando os extratos brutos.

Os extratos resultantes das biotransformações foram analisados em cromatógrafo à gás (CG) acoplado à coluna quiral para permitir a separação dos álcoois enantioméricos, (*R/S*)-1-feniletanol, produzidos nas biorreduções (cromatogramas no Apêndice E deste trabalho).

As taxas de conversão foram estimadas a partir da diferença entre as áreas do pico do substrato (acetofenona) remanescente e os picos dos produtos (álcoois) originados após a biotransformação. A determinação dos excessos enantioméricos dos produtos foi realizada a partir das análises das áreas dos picos dos enantiômeros (álcoois) formados conforme descrito na equação 1:

$$e. e. (\%) = \frac{(\text{área do enantiômero majoritário} - \text{área do enantiômero minoritário}) \times 100}{\text{área do enantiômero majoritário} + \text{área do enantiômero minoritário}} \quad (1)$$

A razão entre picos fornece uma medida da composição enantiomérica da amostra precisa e quantitativa, com alto grau de precisão ( $\pm 0,05\%$ ) (PILISSÃO, 2006).

Os resultados obtidos acerca das taxas de conversão (%Conv.) e excesso enantiomérico (%e.e.) referente às biorreduções catalisadas por cada cepa endofítica estão descritos na Tabela 5.

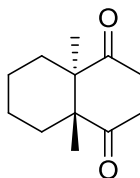
Tabela 9: Taxas de conversão da acetofenona e excesso enantiomérico (e.e.) de (S)-1-feniletanol das biotransformações realizadas pelos sete fungos endofíticos.

Entrada	Fungo	% Conv.	% e.e.	Conf.
1	H2	6,3	89,6	S
2	H3	76,2	76,2	S
3	H4	>99,9	82,8	S
4	H5	41,4	42,0	S
5	H6	>99,9	75,0	S
6	H6.1	2,2	23,6	S
7	H7.1	71,4	90,0	S

Analisando os dados da Tabela 4, nota-se um excelente desempenho em relação às taxas de conversão para os fungos H4 e H6 que converteram a acetofenona (**21**) acima de 99,9%. Em relação ao excesso enantiomérico, as enzimas produzidas pelos fungos H2, H3, H4, H6 e H7.1 mostraram seu potencial estereosseletivo na biotransformação de (**1**) com valores de e.e. variando de 75,0 a 90,0%. O melhor e.e. foi obtido com o fungo H7.1. Entretanto, fazendo um balanço acerca da conversão e da estereosseletividade demonstrada pelas enzimas, o fungo codificado por H4 foi selecionado para dar continuidade aos estudos seguintes. Vale ressaltar a preferência de todas as cepas avaliadas em formar o enantiômero com a mesma configuração absoluta. Um estudo realizado por Prelog (1964) apresenta uma justificativa para tal preferência. Prelog estudou o potencial

biocatalítico de um grande número de micro-organismos e homogenatos de órgãos de animais frente às *trans*-decalin-1,4-dionas (Figura 16) enantioméricas.

Figura 16: Estrutura química da *trans*-decalin-1,4-dionas



Ele verificou que as oxirredutases análogas provenientes de diferentes micro-organismos, como também de diferentes cepas da mesma espécie, diferiam acentuadamente na estereoespecificidade pelo substrato.

Pode-se inferir, tendo por base a infinidade de estudos relativos à aquisição enantiosseletiva de álcoois quirais, a relevância de modelos capazes de prever os produtos de reduções de cetonas de faces enantiotópicas. Prelog expõe um comportamento de certas moléculas pró-quirais frente a ataques nucleofílicos. Visto serem os carbonos de hibridização  $sp^2$  planares, espera-se, a princípio, que a reação de uma espécie do tipo  $R_1-CO-R_2$  com um nucleófilo não quiral gere uma mistura racêmica. Entretanto, em concordância com as descrições do referido autor, caso  $R_1$  e  $R_2$  possuam uma diferença significativa de tamanho, ocorrerá um fenômeno denominado “estereoespecificidade do produto”, através do qual se atinge a formação preferencial de um dos enantiômeros (PRELOG, 1964).

À fim de ilustrar suas observações, Prelog efetuou testes de biotransformação com culturas do fungo *Curvularia falcata*. Em seus experimentos, ele aferiu a tendência de compostos carbonílicos em sofrer redução de modo a originar enantiômeros *S*, como descrito na Figura 21.

Esquema 9: Reduções microbianas de compostos carbonílicos pelo fungo *Curvularia falcata*, conduzindo principalmente ao enantiômero S. As esferas cinza e branca representam os grupos R1 (grande) e R2 pequeno, respectivamente. (Adaptado de Prelog, 1964).



Prelog concluiu ser a razão por trás desse comportamento estereoespecífico decorrente da geometria do estado de transição: após a chegada do nucleófilo à carbonila, o ponto de ruptura e formação de novas ligações químicas demonstraria uma estrutura mais similar à do produto – o álcool quiral – do que à do substrato de origem. Desta forma, as tensões estéricas do álcool resultante determinariam qual dos enantiômeros seria preferencialmente formado. De maneira a evitar conformações estericamente desfavoráveis, a espécie nucleofílica tende a atingir o carbono  $sp^2$  através da face *Re* capaz de originar o produto S.

#### 4.4 Otimização da biotransformação da acetofenona

Baseado nos resultados obtidos com os estudos iniciais sobre as biorreduções da acetofenona pelas sete cepas endofíticas (Tabela 4), o fungo codificado por H4 foi selecionado para dar continuidade a este trabalho. A seleção do endófito H4 baseou-se nas promissoras taxas de conversão e e.e. gerados. Após a seleção da cepa endofítica H4, a mesma foi encaminhada para identificação molecular. A cepa H4 foi identificada por técnicas filogenéticas e de biologia molecular como *Talaromyces purpurogenus* H4 (DO NASCIMENTO et al., 2019).

Diante das excelentes taxa de conversão e elevado excesso enantiomérico obtidos durante a biorredução da acetofenona pelo fungo *T. purpurogenus* H4, foi realizado o estudo sobre alguns parâmetros reacionais implicados em tal biorredução. O objetivo aqui foi aumentar o excesso

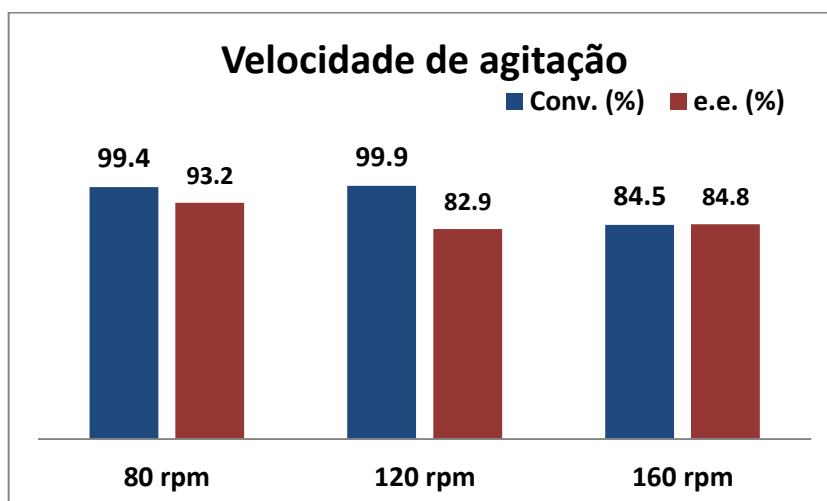
enantiomérico obtido. Os parâmetros estudados foram: velocidade de agitação, temperatura da reação, tempo reacional, concentração de substrato, quantidade de fungo, co-solvente e pH do meio de cultura. Os resultados obtidos para os parâmetros analisados estão descritos a seguir.

#### 4.4.1 Velocidade de agitação

A importância em estudar a velocidade de agitação das reações de biotransformação é resultante da capacidade desse parâmetro em influenciar o conteúdo de oxigênio dissolvido no meio de cultura e a difusão de substrato e produto no sistema de reação. Isso pode levar a alterações na taxa de reação, na conversão e % e.e. do produto obtido (LI et al., 2016).

O experimento consistiu em estudar a rotação ideal durante a reação que conduzisse a maiores valores de taxa de conversão (%Conv.) do substrato e excesso enantiomérico (%e.e.) As rotações avaliadas foram equivalentes a 80, 120 e 160 rpm. A Figura 17 esboça as %Conv. e %e.e. expressos na forma de gráficos.

Figura 17: Taxas de conversão (%Conv.) da acetofenona e excesso enantiomérico (%e.e.) do (S)-1-feniletanol obtidos em reações de biorredução da acetofenona pelo fungo *T. purpurogenus* H4 em diferentes velocidades de agitação.



Analisando a Figura 17, pode-se perceber que a conversão do substrato sofre influência da agitação do meio de cultura. Observou-se uma diminuição de 15,4% na conversão da acetofenona quando comparamos as rotações de 120 e 160 rpm. Por outro lado, ocorreu um ligeiro aumento equivalente a 1,9% em relação ao excesso enantiomérico do (S)-1-feniletanol. Quando dobramos o valor da rotação (de 80 para 160 rpm) foi possível notar que ambas as variáveis, %Conv. e %e.e., sofreram decréscimos de 14,9% e 8,4%, respectivamente. Desta forma, podemos concluir que a maior eficiência das enzimas produzidas pelo fungo *T. purpurogenus* H4, ocorre sob velocidades de agitação moderadas, neste caso, 80 rpm.

#### 4.4.2 Temperatura da reação

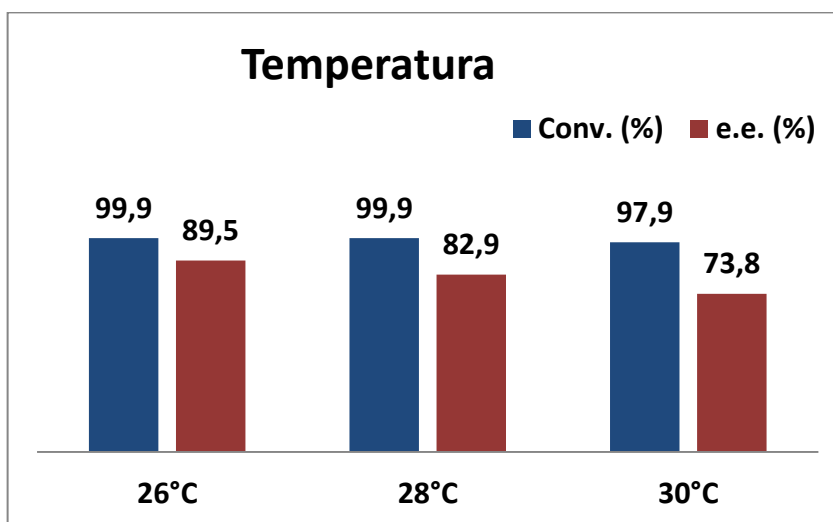
A temperatura é um fator crítico quando um processo biocatalítico é usado, porque esse parâmetro tem uma influência significativa na atividade, seletividade e estabilidade de um micro-organismo (NAKAMURA et al., 2003), com cada micro-organismo tendo uma temperatura ideal



(temperatura ótima) à qual todos processos metabólicos ocorrem eficientemente.

O experimento consistiu em realizar a biotransformação da acetofenona pelo fungo *T. purpurogenus* H4 nas temperaturas de 26, 28 e 30°C. Sabe-se que a temperatura ideal para o desenvolvimento dos fungos filamentosos está em torno de 28°C, desta forma, variou-se a temperatura dois graus acima e abaixo da temperatura ideal, visando mínimos prejuízos para a produção enzimática ótima por parte do micro-organismo. A Figura 18, refere-se aos %Conv. e %e.e. descritos na forma de gráficos.

Figura 18: Taxas de conversão (%Conv.) da acetofenona e excesso enantiomérico (%e.e.) do (S)-1-feniletanol obtidos em reações de biorredução da acetofenona pelo fungo *T. purpurogenus* H4 em diferentes temperaturas.



Analisando a Figura acima, nota-se uma estabilidade dos percentuais em relação à taxa de conversão da acetofenona nas temperaturas de 26 e 28°C, com diminuição apenas do excesso enantiomérico (-6,7%). À medida que a temperatura sobe de 28 para 30°C, tem-se um decréscimo de 2% na conversão e um decréscimo ainda maior para o e.e. (-9%). Observa-se que à medida que a temperatura aumenta, o desempenho das enzimas tende a diminuir, isso ocorre devido à temperatura ser um fator crítico quando se

tratam de processos biocatalítico, sendo capaz de influenciar significativamente na atividade, estereosseletividade e estabilidade de um dado micro-organismo (NAKAMURA et al., 2003).

Estudos relatam o controle da estereosseletividade em processos biocatalíticos variando com a temperatura. Pham, Phillips e Ljungdahl, 1989) avaliaram a estereosseletividade da enzima álcool desidrogenase oriunda de *Thermoanaerobacter ethanolicus* na formação dos álcoois 2-butanol e 2-pentanol. Notou-se que sob temperaturas inferiores a 26°C formava-se preferencialmente o enantiômero (S)-2-pentanol, enquanto temperaturas superiores a este valor tinha-se a formação do enantiômero R em excesso.

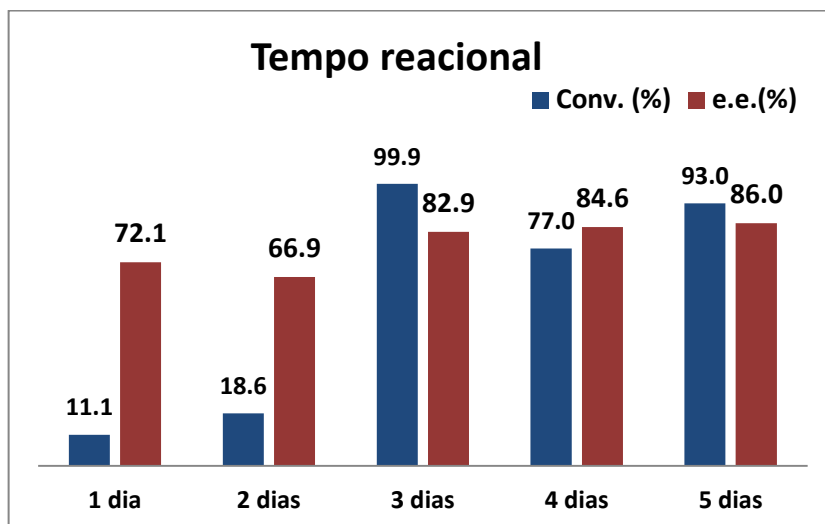
Buscando por parâmetros que resultassem em maiores taxas de conversão e excesso enantiomérico, a temperatura de 26° foi selecionada como valor ótimo.

#### 4.4.3 Tempo reacional

O tempo reacional é um dos parâmetros implicados na biotransformação mais importantes de serem estudados. A busca por biocatalisadores que ofereçam excelentes taxas de conversão e e.e. torna-se ainda mais interessante e promissora se estes conseguirem entregar tais resultados num menor intervalo de tempo.

O experimento consistiu em avaliar o comportamento do fungo *T. purpurogenus* H4 em diferentes tempos de reação, ou seja, as reações foram avaliadas durante cinco dias de incubação, com análises diárias de amostras. As taxas de conversão e excesso enantiomérico estão descritas na Figura 19.

Figura 19: Taxas de conversão (%Conv.) da acetofenona e excesso enantiomérico (%e.e.) do (S)-1-feniletanol obtidos em reações de biorredução da acetofenona pelo fungo *T. purpurogenus* H4 em diferentes tempos de incubação.



Analisando a Figura 19, nota-se um crescimento gradativo da conversão do substrato acetofenona (1) quando o tempo reacional foi aumentado de um para três dias. Após esse período observou-se uma diminuição, com posterior novo aumento. Já para o %e.e., observou-se um crescimento significativo (16%) entre o segundo e o terceiro dia, após esse período o crescimento foi pouco significativo.

As reações de biotransformação são realizadas normalmente em meios aquosos pobres em nutrientes, pois em um meio com essas características o fungo passa por um processo de estresse (com limitações de nutrientes), forçando-o a atuar sobre o substrato ofertado. Este processo muito provavelmente deve ocorrer do segundo para o terceiro dia, quando os nutrientes do meio já foram consumidos, restando apenas o substrato. A partir do quarto dia, são produzidas principalmente oxidases que oxidam os álcoois novamente em acetofenona e isso causa uma diminuição na taxa de conversão, após completar os 5 dias de reação a taxa de conversão volta a aumentar indicando uma maior produção de redutases. Desta forma, o tempo reacional de três dias foi selecionado como ideal para a

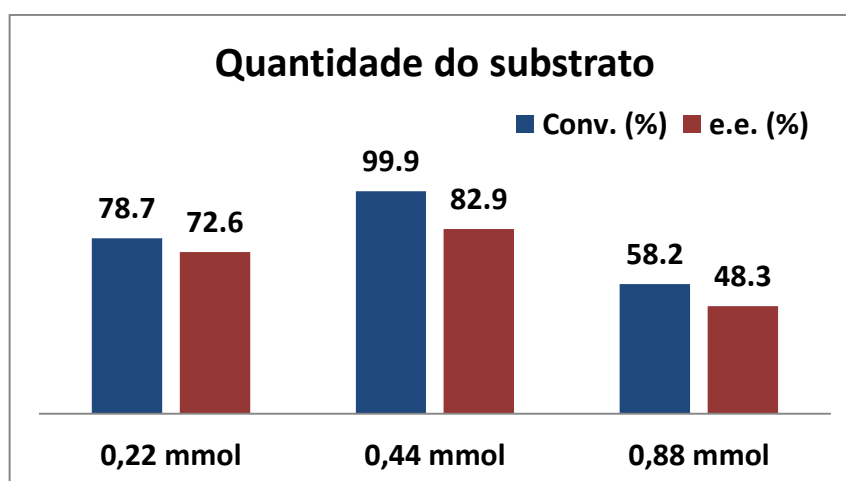
biotransformação da acetofenona pelo fungo por resultar em excelentes taxas, tanto de conversão quanto de excesso enantiomérico num menor tempo.

#### 4.4.4 Concentração de substrato

Uma das principais desvantagens da utilização dos métodos bioquímicos para a realização de reduções químicas é, em geral, a relação carga de substrato / biocatalisador mais baixa quando comparada àquela das metodologias químicas clássicas (NAKAMURA et al., 2003). Consequentemente, é muito importante determinar o efeito da concentração do substrato no rendimento do produto e estereosseletividade.

Este experimento consistiu em estudar o potencial biocatalítico do fungo *T. purpurogenus* H4 frente a diferentes concentrações de acetofenona. As taxas de conversão e excesso enantiomérico estão esboçadas na forma de gráfico na Figura 20.

Figura 20: Taxas de conversão (%Conv.) da acetofenona e excesso enantiomérico (%e.e.) do (S)-1-feniletanol obtidos em reações de biorredução da acetofenona pelo fungo *T. purpurogenus* H4 em diferentes concentrações de substratos.



Analisando o gráfico da Figura 30, nota-se uma diminuição do potencial biocatalítico das enzimas do fungo *T. purpurogenus* H4, tanto em relação à conversão quanto ao excesso enantiomérico, à medida que aumenta-se a quantidade de substrato (de 0,44 mmol para 0,88 mmol). Este fenômeno pode ser atribuído ao aumento da toxicidade que essas substâncias podem apresentar para o fungo.

Dados encontrados na literatura relatam que uma diminuição na conversão de um dado substrato pode também ser resultante da influência de outra(s) enzima(s) inibidora(s) do processo (NAKAMURA et. al, 2003).

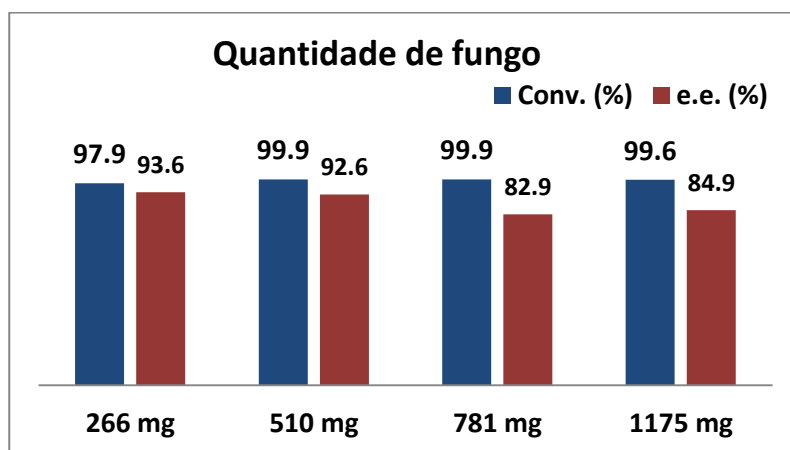
Quando foi utilizada na biotransformação uma quantidade de matéria inferior ao valor médio, as taxa de conversão e de excesso enantiomérico tornaram-se inferiores a 80%. Desta forma, tem-se que a melhor eficiência das enzimas ocorreu para uma quantidade de matéria do substrato equivalente a 0,44 mmol, com %Conv. e %e.e. de 99,9 e 82,9, respectivamente.

#### 4.4.5 Quantidade de fungo

Em um sistema catalítico que emprega célula inteira, a massa de todas as células influencia não apenas as taxas de reação inicial, mas também a regeneração das coenzimas. Além disso, grandes quantidades da massa de células inteiras têm um efeito na viscosidade do meio de reação, e esta situação pode limitar a eficiência da reação (LI et al., 2016).

Este experimento consistiu em avaliar a influência da quantidade de fungo na biotransformação da acetofenona (**1**). Foram analisadas as quantidades de 5, 10, 15 e 20 discos de 6,0 mm de diâmetro (contendo micélio e ágar), correspondentes às massas miceliais de 266, 532, 798 e 1064 mg, respectivamente. Os percentuais de conversão e excesso enantiomérico estão dispostos na Figura 21.

Figura 21: Taxas de conversão (%Conv.) da acetofenona e excesso enantiomérico (%e.e.) do (S)-1-feniletanol obtidos em reações de biorredução da acetofenona em diferentes quantidades do fungo *T. purpurogenus* H4.



Analisando a Figura 21, nota-se certa estabilidade na taxa de conversão da acetofenona entre as quantidades de fungo referentes a 510 e 781 mg. Há ainda uma pequena diminuição da taxa de conversão (0,3%) ao aumentar a quantidade de fungo de 781 para 1175 mg. Por outro lado, tem-se uma diminuição da taxa de excesso enantiomérico quando aumenta-se a quantidade de fungo, o maior decréscimo foi observado ao aumentar de a quantidade de fungo de 510 para 781 mg (9,7%).

Mediante análise dos dados, a quantidade de fungo equivalente a 510 mg foi selecionada como parâmetro ótimo por apresentar melhores resultados a cerca de taxas de conversão e excesso enantiomérico, para uma menor quantidade e fungo empregada.

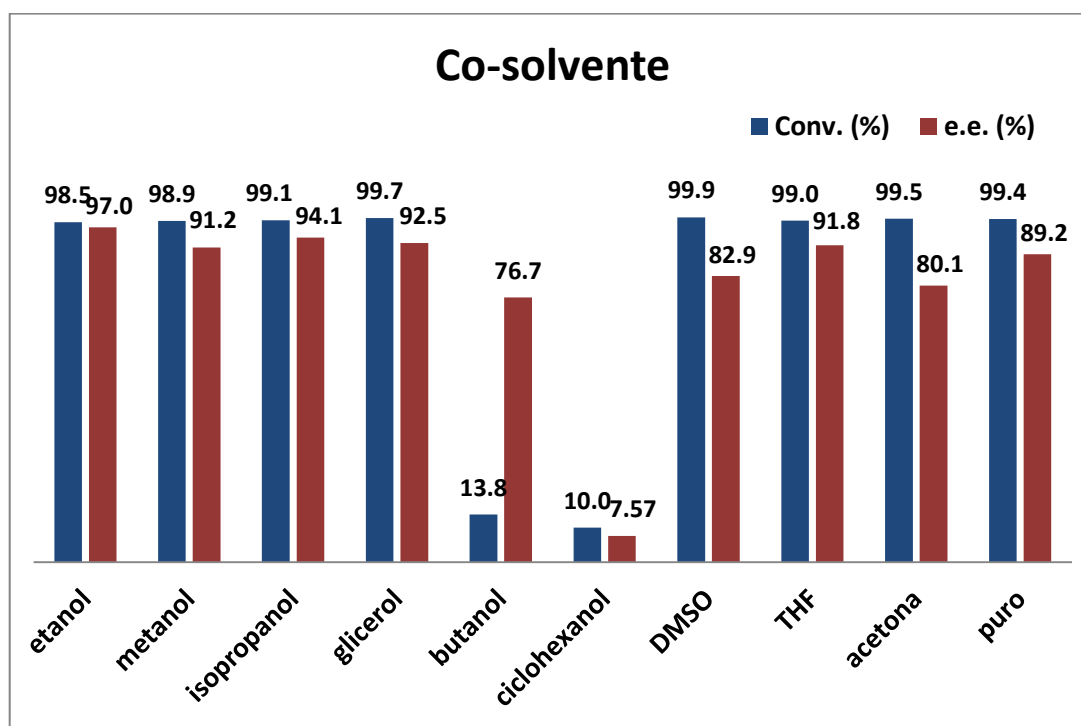
#### 4.4.6 Co-solvente

Embora os sistemas biocatalíticos tenham a vantagem de utilizarem água como solvente, isso também pode ser um inconveniente quando os substratos orgânicos apresentam baixa solubilidade em água. Esta situação pode ser resolvida pelo uso de um cosolvente para facilitar a solubilização do substrato no meio reacional. No entanto, a escolha do co-solvente deve ser estudada, a fim de minimizar seu possível efeito tóxico no desempenho

da reação. De fato, vários co-solventes têm sido utilizados como co-substratos para auxiliar a reciclagem de cofatores enzimáticos e, assim, tornar a interação mais eficiente (DU et al., 2014).

Neste experimento foi avaliada a influência do co-solvente (300µL) na biotransformação da acetofenona. Foram realizados 10 experimentos, com e sem o uso de co-solventes. Os cosolventes utilizados foram etanol, metanol, butanol, ciclohexanol, glicerol, DMSO, isopropanol, THF e acetona. Os resultados estão descritos na Figura 22, com as respectivas taxas de conversão e excesso enantiomérico.

Figura 22: Taxas de conversão (%Conv.) da acetofenona e excesso enantiomérico (%e.e.) do (S)-1-feniletanol obtidos em reações de biorredução da acetofenona pelo fungo *T. purpurogenus* H4 empregando diferentes co-solventes.



Analisando a Figura 22, nota-se que a maioria dos co-solventes utilizados conduziram a excelentes taxas de conversão (>98,5%), levando

a inferir que os co-solventes utilizados apresentaram pouca influência na conversão da acetofenona. Entre os co-solvente, o butanol e o cicloexanol inibiram a ação das enzimas do fungo *T. purpurogenus* H4, conduzindo a baixas taxas de conversão, 13,8% e 10,0%, respectivamente.

Quanto ao excesso enantiomérico, resultados excelentes foram obtidos para etanol, metanol, Isopropanol, glicerol e THF (>91,2%). Quando o cicloexanol foi usado como co-solvente, o e.e. caiu drasticamente.

As reações de biotransformação são reconhecidas principalmente por serem ambientalmente amigáveis, justamente por possibilitarem a ocorrência de reações químicas em água. Devido a isso, faz-se necessário tomar total cuidado na escolha do co-solvente, principalmente pela alta toxicidade que alguns deles apresentam aos organismos biológicos que atuam como catalisadores nas biotransformações (DU et al., 2014).

Os experimentos realizados apresentaram excelentes resultados para vários co-solventes, entretanto, além das elevadas taxas de conversão e excesso enantioméricos produzidos, a baixa toxicidade, foi um dos requisitos fundamentais para a escolha do etanol.

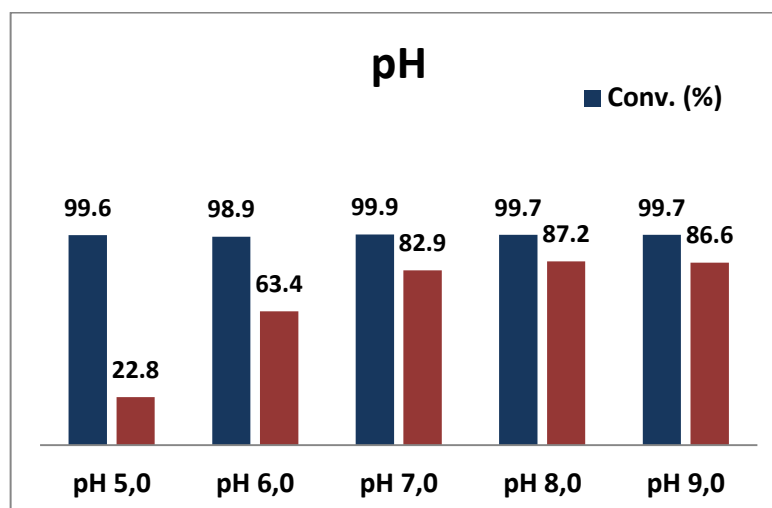
#### 4.4.7 pH do meio

É sabido que o pH é um fator chave nas reações biocatalíticas, pois pode alterar o estado iônico do substrato e/ou a carga das enzimas e, conseqüentemente, afeta o encaixe do substrato no sítio ativo da enzima (LI et al., 2016). Além disso, quando uma reação é catalisada por várias enzimas com enantiosseletividade diferente em diferentes pHs, a alternância de pH alterará o rendimento do produto e o e.e.

Neste experimento avaliou-se a influência do pH do meio de cultura na biotransformação da acetofenona pelo fungo *T. purpurogenus* H4. Foram estudados meios com pH variando entre 5 e 9. As taxas de conversão e excesso enantiomérico estão descritos na Figura 23.



Figura 23: Taxas de conversão (%Conv.) da acetofenona e excesso enantiomérico (%e.e.) do (S)-1-feniletanol obtidos em reações de biorredução da acetofenona pelo fungo *T. purpurogenus* H4 em função do pH do meio de cultura.



Analisando a figura 23, nota-se certa linearidade em relação à taxa de conversão, ao variar o pH do meio entre ácido e básico. Entretanto, para os valores de excesso enantiomérico, observou-se um grande crescimento (60,1%) ao passar de um pH ácido (pH 6,0) para um pH neutro (pH 7,0), inferindo que as enzimas produzidas pelo fungo apresentam baixa estereosseletividade em meio ácido.

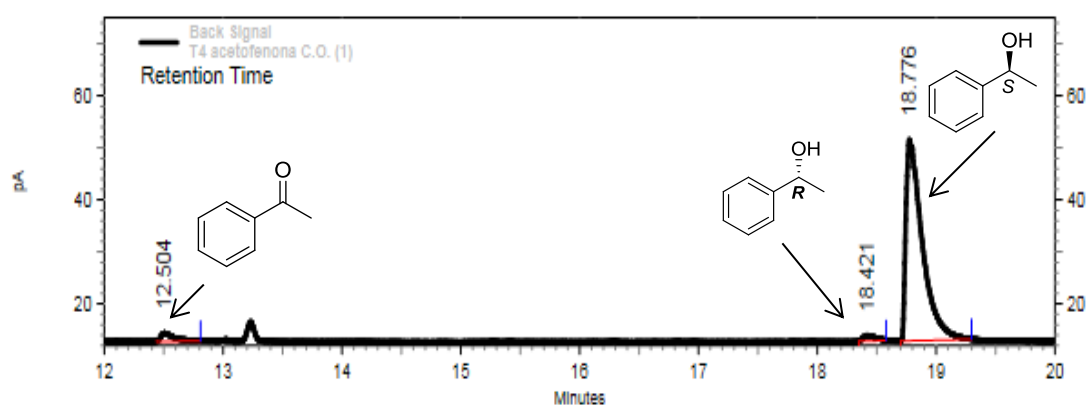
A alteração do pH neutro para o pH básico, causou um ligeiro aumento do excesso enantiomérico. Dessa forma, observou-se que as enzimas responsáveis pela biorredução da acetofenona e que foram secretadas pelo endófito em estudo apresenta melhores desempenhos em pH básico. Dessa forma, foi escolhido o pH 8,0 como valor ótimo.

#### 4.5 Biotransformação da acetofenona nas condições otimizadas

Após estabelecer as condições ótimas (seção 4.4) para a biotransformação da acetofenona pelo endófito *T. purpurogenus* H4, foi realizada uma nova biotransformação empregando-se as condições

otimizadas. A Figura 24 mostra o cromatograma da biorredução da acetofenona nas condições otimizadas, ou seja, essa nova biotransformação foi realizada a 80 rpm de agitação, 26°C, durante três dias, empregando 0,44 mmol de substrato e 510 mg de fungo, usando etanol como co-solvente e pH 8 do meio de cultura.

Figura 24: Cromatograma da biorredução da acetofenona pelo endófito *T. purpurogenus* H4 empregando as condições otimizadas.



A biotransformação empregando as condições previamente otimizadas resultou num pequeno decréscimo da taxa de conversão do substrato, equivalente a 2,9% (passando de 99,9 para 97%). Entretanto, houve um ganho relativamente significativo no excesso enantiomérico do (S)-1-pheniletanol, passando de 82,8 para 96% (um ganho de 13,2%), indicando que a otimização da reação quando aplicada para a redução do substrato acetofenona pelo endófito *T. purpurogenus* H4 foi satisfatória.

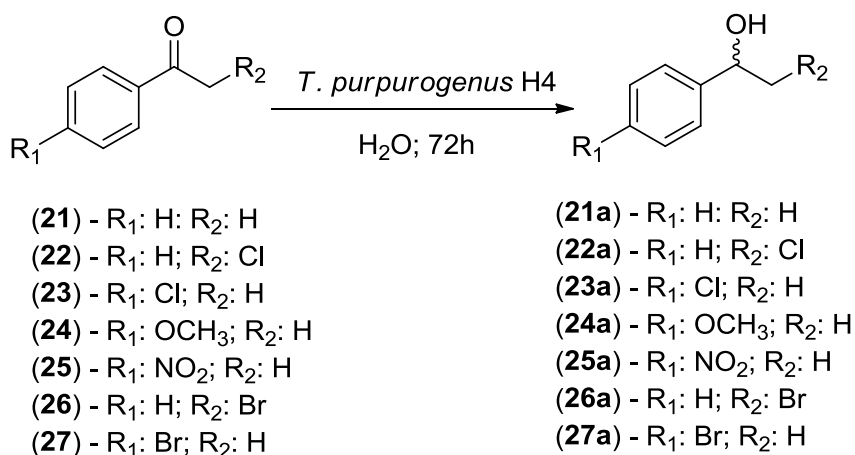
#### 4.6 Biorredução dos derivados da acetofenona

Após a definição dos novos parâmetros da reação, ou seja, daqueles parâmetros que conduzem às melhores taxas de conversão da acetofenona

pelo fungo *T. purpurogenus* H4 e geram o melhor e.e. de (S)-1-feniletanol, foi investigada a biotransformação de seis derivados da acetofenona.

A equação geral das reações está descrita no esquema 10. O objetivo desses ensaios foi verificar as influências que grupos substituintes – ativantes ou desativantes – na estrutura química da acetofenona (**21**) exercem nas taxas de conversão e e.e. das biorreduções.

Esquema 10: Equação geral do processo de biorredução da acetofenona e seis de seus derivados pelo fungo endofítico *T. purpurogenus* H4.

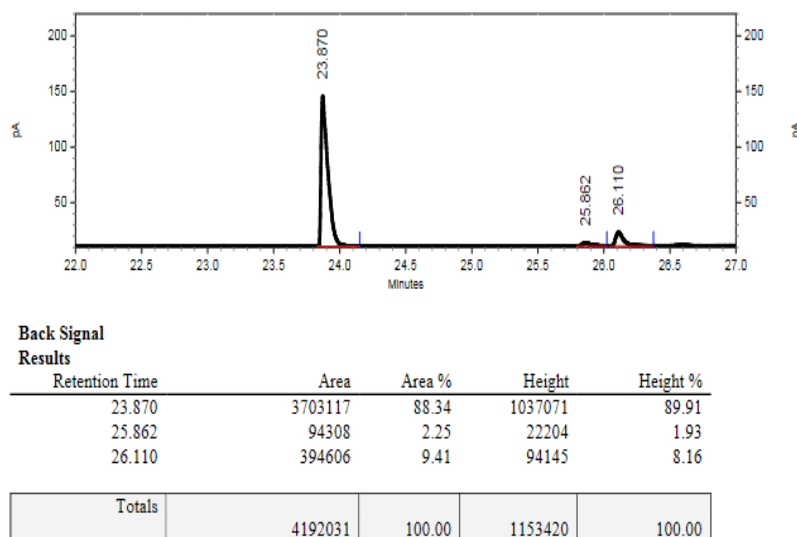


Diferentemente do que ocorre nas reduções empregando NaBH<sub>4</sub>, nas reações utilizando células inteiras dos fungos endofíticos tem-se a formação preferencial de um dos enantiômeros devidos a estereosseletividade apresentada pela enzima álcool desidrogenase (ADH), enzima frequentemente produzida por tais micro-organismos. Os principais motivos do emprego dessas espécies como catalisadores consistem na capacidade de obtenção seletiva de blocos construtores quirais (a exemplo dos álcoois quirais), amplamente utilizados na síntese de fármacos, agroquímicos e produtos para a indústria alimentícia com excelentes taxas de excesso enantiomérico, através de metodologias seguras, ambientalmente amigáveis, a baixo custo e com fontes biocatalíticas renováveis (NAKAMURA et al., 2003).

#### 4.6.1 Biotransformação da 2-cloro-acetofenona (**22**)

A investigação da biotransformação da 2-cloro-acetofenona (**22**) por *T. purpurogenus* H4 foi realizada mediante análise do extrato bruto em CG acoplada a fase estacionária quiral. O cromatograma da análise da biotransformação de **22** está mostrado na Figura 25.

Figura 25: Cromatograma da biotransformação da 2-cloro-acetofenona (**22**) por *T. purpurogenus* H4 nos respectivos álcoois enantioméricos.



A biotransformação da 2-cloro-acetofenona (**22**) nas condições otimizadas gerou como resultado uma taxa de conversão de 11,7% e um percentual de excesso enantiomérico equivalente a 60,4%. Na sequência, foi realizada a determinação da rotação óptica específica do extrato da biotransformação, obtendo uma medida equivalente a  $-19,5^\circ$ . A análise foi realizada seguindo a mesma metodologia empregada por Fardelone; Rodrigues; Moran, (2003). Tais autores reportaram a rotação óptica específica do (*R*)-2-Cloro-1-feniletanol como sendo  $-48,0$ , ( $c$  1,0, ciclohexano). Com base nisso, conclui-se que a biorredução de **22** conduziu à formação majoritária do enantiômero *R*.

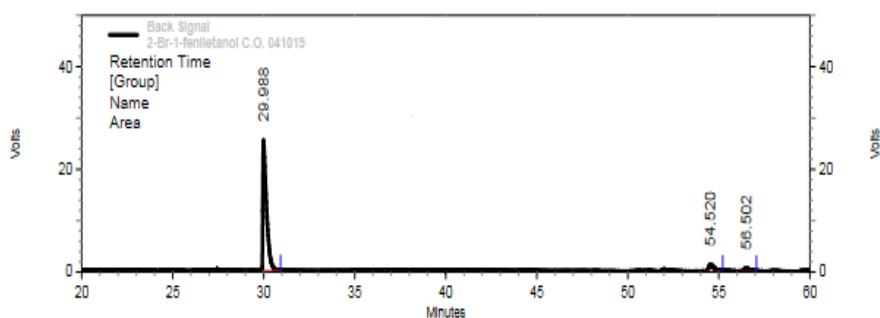
#### 4.6.2 Biotransformação da 2-bromo-acetofenona (**26**)

Analisando o cromatograma obtido para a biotransformação da 2-bromo-acetofenona (**26**) por *T. purpurogenus* H4, notou-se uma baixa taxa de conversão, 10,1%, e um excesso enantiomérico moderado e equivalente a 39,8%.

A medida da rotação óptica específica do extrato da biotransformação foi realizada de acordo com a metodologia empregada por (Gilmore, Jones, Muldowney, (2004). Esse trabalho relatou que a rotação óptica do (S)-2-bromo-1-feniletanol (**26a**) é de  $[\alpha]_D^{20} = -30.9^\circ$ , (*c* 1.0, clorofórmio) >99,% e.e. Nossas medidas indicaram um valor de  $-7^\circ$  para a rotação óptica do extrato da biotransformação de **26**, indicando que o enantiômero em excesso era o S.

O cromatograma referente ao processo de biorredução do substrato 2-bromo-acetofenona está esboçado na Figura 26.

Figura 26: Cromatograma da biotransformação da 2-bromo-acetofenona (**6**) por *T. purpurogenus* H4 nos respectivos álcoois enantioméricos

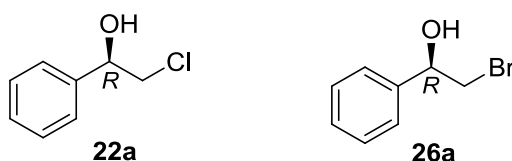


Back Signal				
Results				
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
29.988	2779378	89.88	195766	92.85
54.520	218301	7.06	10399	4.93
56.502	94670	3.06	4679	2.22
Totals	3092349	100.00	210844	100.00

As baixas taxas de conversão obtidas para as acetofenonas contendo um átomo de halogênio no carbono  $\alpha$ -carbonílico, podem ser atribuída a alguns fatores, dentre os possíveis, destacam-se a baixa solubilidade do substrato no meio reacional, a toxicidade que ele pode apresentar para o fungo, bem como a interferência do volume ou densidade eletrônica dos elementos cloro e bromo com os pontos de interação da enzima responsável pela biorredução.

É possível notar que as taxas de conversão de **22** e **26** foram bem próximas, entretanto, com uma maior conversão para a 2-cloroacetofenona (**22**). Isso implica dizer que talvez o fator de maior contribuição para a baixa taxa de conversão do substrato possa ser atribuído ao maior tamanho do átomo de bromo em relação ao átomo de cloro (ambos pertencentes ao grupo 17, entretanto o bromo apresenta uma camada eletrônica a mais que o cloro, o que confere um maior raio atômico). Raios atômicos maiores geram maior dispersão da densidade eletrônica no átomo, o que pode aumentar as repulsões em relação aos elétrons do nucleófilo (hidreto) que se aproxima da carbonila. Ambos os substratos quando biotransformados levaram majoritariamente à formação do produto com estereoquímica *R* (figura 27).

Figura 27: Estrutura química dos produtos majoritários da biotransformação de **22** e **26**.

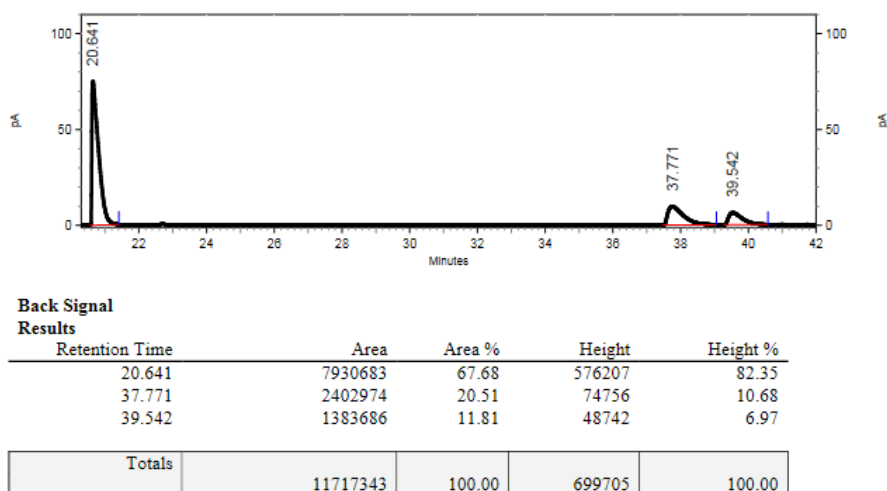


Este fato poderia ser explicado pela possível presença de desidrogenases plúrais de álcool (ADHs) com diferentes seletividades e estereopreferência de substrato. Essas enzimas podem até apresentar diferentes níveis de expressão e/ou atividades (ANDRADE et al., 2006).

#### 4.6.3 Biotransformação da 4'-cloro-acetofenona (**23**)

A biotransformação da 4'-cloro-acetofenona (**23**) resultou nas taxas de conversão e excesso enantiomérico de 32,3 e 27,0%, respectivamente. O enantiômero em maior excesso foi caracterizado como sendo o S, identificado por análise de polarimetria, com  $[\alpha]_D^{20} = -15,2^\circ$ . A determinação foi realizada em metanol, na mesma concentração e temperatura realizada por (DU et al., 2006), os quais reportam o valor de  $[\alpha]_D^{21} = +47.2$  (c 1.8, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). para (R)-4'-cloro-1-feniletanol (**23a**). O sinal negativo da análise do extrato bruto proveniente da biorredução de **23** indicou que o plano polarizado da luz foi desviado para a esquerda, diferente do observado por Mathre et. al, desta forma, pode-se concluir que o enantiômero S foi formado em maior quantidade seguindo a regra de Prelog. O cromatograma da biotransformação mencionada encontra-se descrito na figura 28.

Figura 28: Cromatograma da biotransformação da 4'-cloro-acetofenona (**23**) por *T. purpurogenus* H4 nos respectivos álcoois enantioméricos

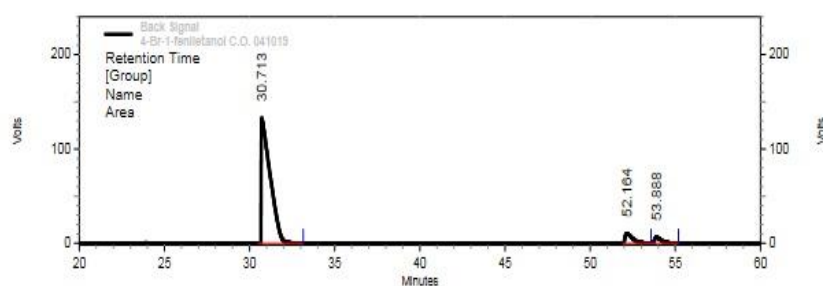


#### 4.6.4 Biotransformação da 4'-bromo-acetofenona (**27**)

A biotransformação da 4'-bromo-acetofenona (**27**) nas condições otimizadas foi realizada dando como resultado uma taxa de conversão de 9,1% e um percentual de excesso enantiomérico equivalente a 29,2%. A

determinação do  $[\alpha]_D^{20}$  da mistura foi analisada no polarímetro à temperatura de 20°C, obtendo uma medida equivalente a - 9°. A análise foi realizada seguindo a mesma metodologia empregada por Basavaiah, Reddy e Chandrashekar, (2002), cujo resultado apresentado para o (*R*)-4'-bromo-1-feniletanol foi  $[\alpha]_D^{20} = + 16,8$  (c 2.1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). A comparação do resultado obtido com o fornecido na literatura indicou um excesso do enantiômero *S*. O cromatograma da biotransformação da 4'-bromo-acetofenona está descrito na Figura 29.

Figura 29: Cromatograma da biotransformação da 4'-bromo-acetofenona (**27**) por *T. purpurogenus* H4 nos respectivos álcoois enantioméricos.



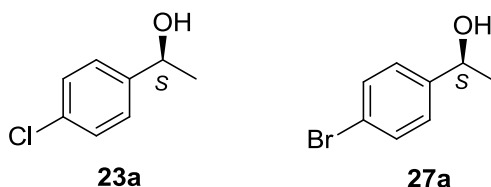
Back Signal Results				
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
30.713	37007020	90.91	1019188	88.85
52.164	2391671	5.88	78617	6.85
53.888	1308742	3.21	49219	4.29
Totals	40707433	100.00	1147024	100.00

Comparando as taxas de conversão dos substratos contendo os substituintes cloro e bromo na posição *para* do anel aromático, nota-se que a 4'-cloro-acetofenona (**24**) apresentou a maior taxa de conversão. Esse comportamento pode ser atribuído à maior eletronegatividade do cloro em relação ao bromo. Por ser o cloro maior retirador de densidade eletrônica por indução, ele é menor doador por ressonância devido à sua maior eletronegatividade. Tais fenômenos tornam o carbono carbonílico mais



nucleofílico. As estruturas químicas dos produtos obtido majoritariamente na biorredução de **23** e **27** estão descritos na figura 30.

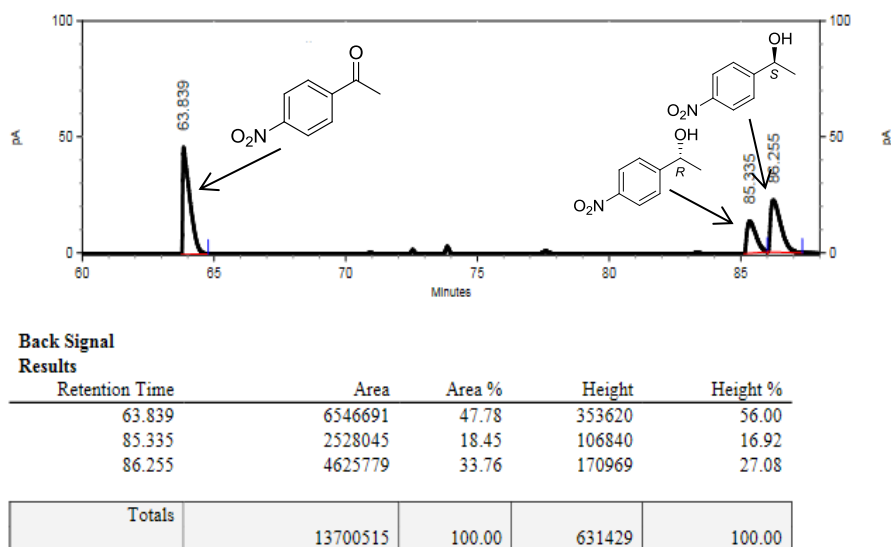
Figura 30: Estruturas químicas dos produtos majoritários da biorredução de **23** e **27**.



#### 4.6.5 Biotransformação da 4'-nitro-acetofenona (**25**)

A biotransformação da 4'-nitro-acetofenona (**25**) realizada nas condições otimizadas gerou o cromatograma da exposto na Figura 40. Observou-se uma maior taxa de conversão em comparação com os demais derivados, e equivalente a 52,2%, a taxa referente ao e.e. foi de 29,3% do enantiômero S. A estereoquímica do enantiômero gerado em maior quantidade foi determinada mediante a determinação da rotação óptica específica, cujo valor foi de  $[\alpha]_D^{20} - 7,2^\circ$ . A análise foi realizada seguindo a metodologia empregada por Mathre et al, (1993) que apresentam resultado para o (R)-4'-nitro-1-feniletanol de  $[\alpha]_D^{25} = +31.0$  (c 1.225, MeOH), 98.7 % e.e. O sinal positivo do  $[\alpha]_D^{20}$  encontrado na literatura, indica que o 4'-nitro-1-feniletanol (**25a**) obtido neste trabalho apresentou configuração absoluta contrária a da literatura, desta form, pode-se inferir que o enantiômero obtido em excesso a partir da biorredução de **25** apresentou configuração absoluta S.

Figura 31: Cromatograma da biotransformação da 4'-nitro-acetofenona (**25**) por *T. purpurogenus* H4 nos respectivos álcoois enantioméricos



Dentre os derivados da acetofenona biotransformados, nota-se que a 4'-nitro-acetofenona (**25**) foi o único substrato que possui grupo retirador de densidade eletrônica do anel aromático. Assim, como esperado, tal substrato apresentou a maior taxa de conversão.

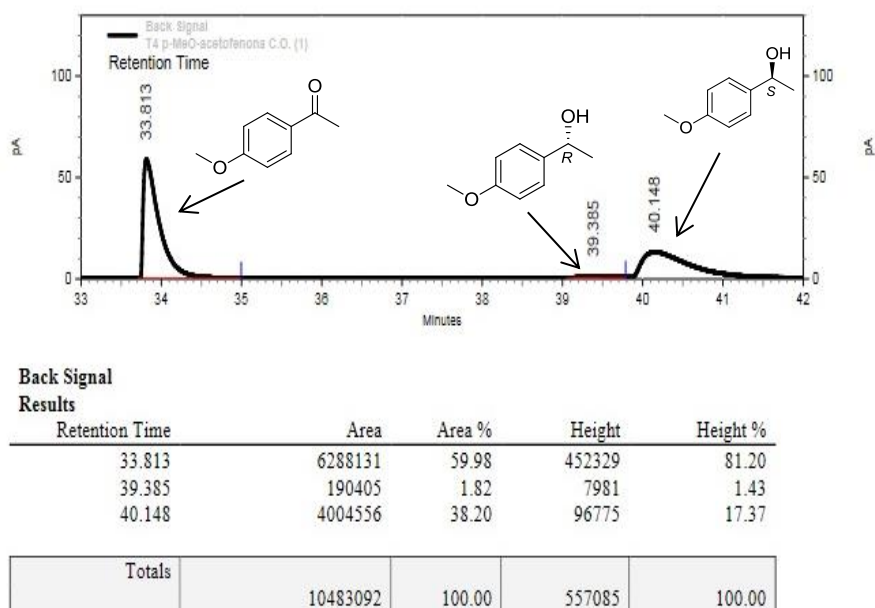
#### 4.6.6 Biotransformação da 4'-metóxi-acetofenona (**24**)

A biotransformação da 4'-metóxi-acetofenona (**24**) resultou em taxas de conversão e excesso enantiomérico equivalentes a 40,0 e 91,0, respectivamente. A configuração absoluta foi determinada através da análise de  $[\alpha]_D^{20}$  seguindo a metodologia utilizada por Mathre et al., (1993): (*R*)-4'-metóxi-1-feniletanol:  $[\alpha]_D^{21} = +41.0$  (*c* 1.069, MeOH), 99.6 % e.e), cujo valor obtido foi  $-33,4^\circ$ , indicando excesso do enantiômero S em nossa biotransformação.

Dentre os derivados utilizados, **24** apresentou a maior taxa de e.e. (91,0%), este excelente resultado é um indicativo de uma maior afinidade dos pontos do sítio ativo da ADH do fungo *T. purpurogenus* H4 com este

substrato. O cromatograma da biotransformação da 4'-metóxi-acetofenona (**24**), está descrito na Figura 32.

Figura 32: Cromatograma da biotransformação da 4'-metóxi-acetofenona (**24**) por *T. purpurogenus* H4 nos respectivos álcoois enantioméricos.



Trabalhos descritos na literatura dão suporte para justificar o comportamento diferente observado para alguns substratos quando submetidos à presença de um mesmo biocatalisador. Estudo sobre os efeitos das acetofenonas *para*-substituídas na atividade catalítica da 3 $\alpha$ -hidroxisteróide desidrogenase (3 $\alpha$ -HSD) do fígado de rato (*Rattus norvegicus*) mostrou que as propriedades doadora e retiradora de densidade eletrônica característica de alguns grupos de substituintes influencia a taxa de redução (UWAI et al., 2008). A introdução de um grupo retirador de densidade eletrônica resulta no aumento da taxa de redução, enquanto que uma doação de densidade eletrônica ao anel aromático implica no efeito contrário. Outros estudos realizados por Zhu, Malik e Hua, (2006) e (Zhu, Yang e Hua, (2006), reforçam essa afirmativa quando eles estudaram a redução de acetofenonas substituídas empregando a enzima carbonil redutase da *Candida magnolia*, obtendo menores taxas de conversão para

os substratos contendo substituintes ativantes do anel aromático. Isso ocorre porque o grupo substituinte doador de elétrons na posição *para* suprime a deslocalização gerada pela polarização do grupo carbonila que desloca a densidade eletrônica para o átomo de oxigênio. Nos anéis aromáticos com grupos desativantes, além da retirada provocada pelo oxigênio da carbonila, o substituinte retira a densidade eletrônica do anel que conseqüentemente retira densidade do carbono da carbonila tornando-o ainda mais eletrofílico.

#### **4.7 Aumento de escala da biotransformação da acetofenona para isolamento do (S)-1-feniletanol**

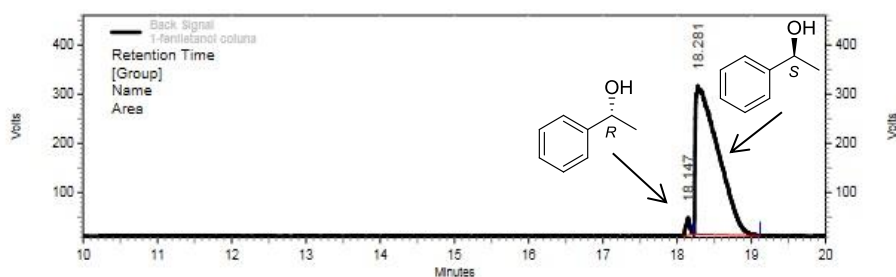
O aumento de escala da biotransformação foi realizado em 10 erlenmeyers, cada um contendo 50 µL de acetofenona (equivalente a 51,5 mg) dissolvidos em 350 µL de etanol, 10 discos contendo *T. purpurogenus* H4 e 100 mL de meio koch's k1. Os frascos foram incubados segundo as condições selecionadas como sendo as ótimas para a produção do (S)-1-feniletanol. Após a incubação, foi realizada a extração e o extrato rendeu 620 mg. O extrato foi submetido à purificação em cromatografia em coluna clássica utilizando sílica gel como fase estacionária e fase móvel composta por hexano:acetato de etila na proporção 8:2.

A purificação foi monitorada por CCD revelada em luz UV a 254 nm. As frações contendo apenas o álcool foram concentradas, resultando num rendimento de 73% (massa do produto: 382,23 mg).

A configuração absoluta da amostra purificada foi determinada seguindo a metodologia empregada por Ma et al., (1999) - (*R*)-1-feniletanol:  $[\alpha]_D^{25} = +44.5$  (*c* 1.0, MeOH); 98.4 % e.e.). O valor encontrado para o  $[\alpha]_D^{20}$  foi equivalente a  $-37,5^\circ$ , indicando que o enantiômero em excesso na amostra tratava-se do S.

O excesso enantiomérico obtido foi calculado através das áreas dos picos do produto formado (Figura 33), obtendo um excesso equivalente a 96% do (S)-1-feniletanol;

Figura 33: Cromatograma dos enantiômeros *R* e *S* do 1-feniletanol (**21a**) por *T. purpurogenus* H4 nos respectivos álcoois enantioméricos.



**Back Signal  
Results**

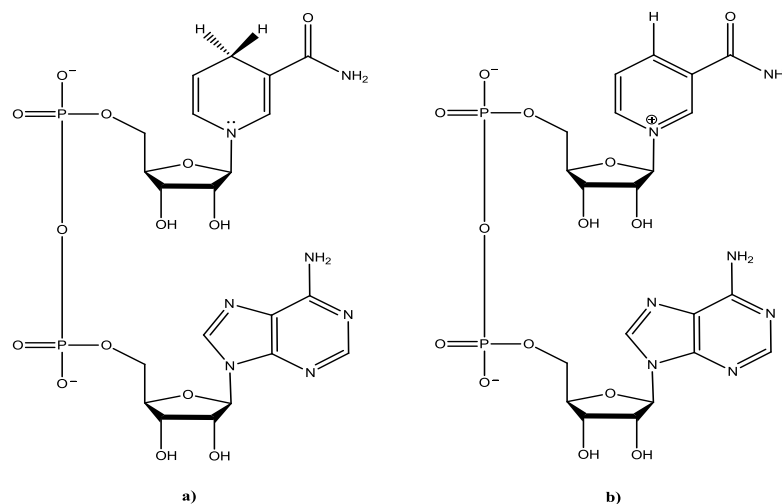
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
18.147	980219	1.97	272453	10.54
18.281	48772667	98.03	2311893	89.46
Totals	49752886	100.00	2584346	100.00

O aumento de escala foi realizado apenas para o substrato acetofenona, devido aos melhores resultados de conversão e excesso enantiomérico apresentados.

#### 4.8 Mecanismo de atuação das enzimas em substratos pró-quirais.

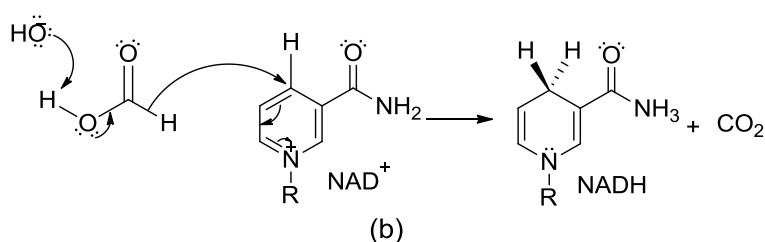
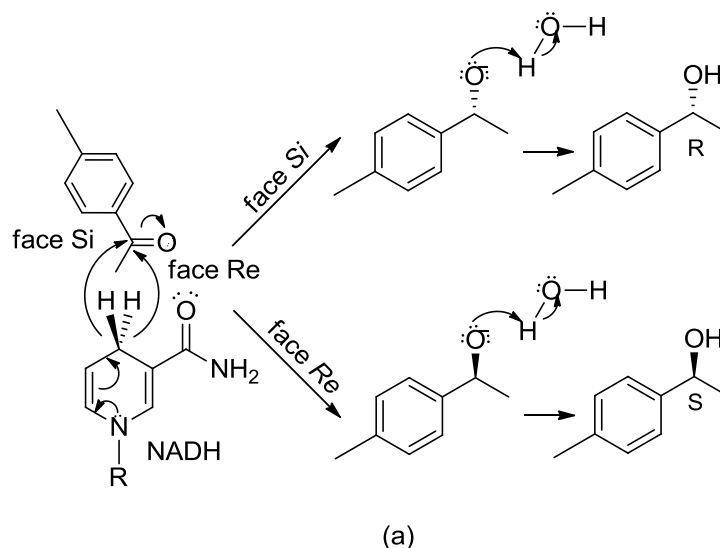
Os fungos endofíticos são espécies capazes de produzir uma grande variedade de enzimas a depender do meio no qual estão inseridos. As enzimas produzidas nos processos de biorredução são as oxirredutases (enzimas que participam de processos de oxidação-redução) (BETTELHEIM, et al., 2012). Nas reações de redução de cetonas por fungos, a enzima álcool desidrogenase (ADH) é a mais amplamente utilizada. A ADH, assim como outras enzimas, necessita da presença de um cofator (coenzima) para realizar tais biotransformações. Na presença de células inteiras, os cofatores são produzidos no meio reacional (NAIK et al., 2012). O NADH, dinucleótido de nicotinamida e adenina, é uma das coenzimas amplamente utilizadas neste tipo de reação (BETTELHEIM, et al., 2012). A estrutura química dessa espécie, tanto na sua forma reduzida quanto na oxidada, está descrita na Figura 34.

Figura 34: Estruturas químicas dos cofatores: (a) NADH (forma reduzida) e (b) NAD<sup>+</sup> (forma oxidada).



As reações enzimáticas ocorrem através da interação do sítio ativo da enzima com os ligantes ou moléculas do substrato. Esses sítios ativos encontram-se normalmente encrustados dentro da enzima e são acessíveis apenas através de um pequeno canal chamado cavidade. O tamanho e a forma dessas cavidades desempenham um papel crucial na especificidade da ligação (HU; XU, 2006). Para que a cetona seja reduzida, é necessário que ocorra primeiramente a sua chegada até o sítio ativo, por intermédio da cavidade, e só então o grupo carbonila da cetona deve se ligar ao sítio da ADH através de um complexo ternário com a coenzima NADH (MANETSCH et al., 2004). Durante essa complexação, um dos hidrogênios situados no carbono  $sp^3$  do grupo nicotinamida do NADH, será adicionado à carbonila na forma de hidreto. A adição se dá majoritariamente (seletivamente) por uma das faces, justamente pelo encaixe do substrato à cavidade do sítio ativo ser favorecida apenas para uma das faces, resultando num maior excesso de um dos enantiômeros. Após esse processo, o complexo enzima-cofator-substrato é desfeito, liberando o íon alcóxido no meio que pode ser protonado pela molécula de água - solvente prótico - da reação. O cofator que agora se encontra na sua forma oxidada (NAD<sup>+</sup>), é regenerado pela ação da enzima formiato desidrogenase (FDH). O esquema 11 demonstra os processos mecânicos da redução estereosseletiva de carbonilas pró-quirais, bem como a regeneração do cofator.

Esquema 11: Mecanismo de ação da álcool desidrogenase em cetonas pró-quirais utilizando o co-fator NADH; (b) Mecanismo da regeneração do cofator NADH pela enzima formiato desidrogenase (FDH).



Na redução da carbonila, em um primeiro momento ocorre a aproximação entre o cofator NADH e o substrato, os elétrons da ligação  $C_{sp^3}\text{-H}$  (orbital  $\sigma$ ) são utilizados para se ligar ao orbital  $\pi^*_{\text{C=O}}$  ao mesmo tempo em que a ligação dupla  $\text{C=O}$  é rompida, gerando uma carga negativa sobre o oxigênio e a aromaticidade do anel é reestabelecida pelo par de elétrons não ligantes do átomo de nitrogênio (heteroátomo do anel aromático).

Após a reação, o cofator é regenerado pela ação da enzima formiato desidrogenase (FDH). Uma molécula de ácido fórmico tem seu hidrogênio ácido abstraído por uma molécula de água ou um íon hidróxido presente, formando o ânion formiato ( $\text{HCOO}^-$ ), ao passo que, o orbital  $\sigma_{\text{C-H}}$  do formiato

interage com o orbital  $\pi^*_{\text{C-H}}$  do  $\text{NAD}^+$ , uma ligação dupla C-O é formada, gerando  $\text{CO}_2$  regenerando a coenzima NADH.

Durante a biorredução da acetofenona, bem como nos seus derivados *para*-substituídos, a adição do hidreto pela face *Re* leva ao enantiômero *S*, e a adição pela face *Si* resulta no enantiômero *R*. Já nos derivados com substituição de um dos hidrogênios do carbono  $\alpha$ -carbonílico por halogênio, ocorre o mesmo processo, entretanto, tem-se uma mudança de ordem de prioridade dos substituintes da carbonila passando da fenila pro grupo alquila. Dessa forma, o raciocínio descrito acima é o mesmo invertendo apenas as faces *Re* e *Si*.



## 5. CONCLUSÕES

As análises dos resultados obtidos nesse trabalho permitiram concluir que:

- ✓ Os fungos endofíticos isolados das folhas da *Handroanthus impetiginosus* mostraram-se eficientes na biorredução estereosseletiva da acetofenona ao álcool quiral 1-feniletanol, enriquecido enantiomericamente com a configuração absoluta S;
- ✓ Dentre as cepas testadas, o *Talaromyces purpurogenus* H4 (previamente codificado por H4), foi selecionado como a fonte enzimática mais promissora, decorrente das taxas de conversão e excesso enantiomérico, >99,9 e 82,8%, respectivamente;
- ✓ A otimização da biotransformação da acetofenona revelou os parâmetros velocidade de agitação, quantidade de substrato e tempo de reação como parâmetros de maior influência na taxa de conversão da acetofenona;
- ✓ Por outro lado, os parâmetros pH do meio, quantidade de fungo, temperatura e quantidade de substrato mostraram-se como grandes influenciadores na estereosseletividade da redução;
- ✓ Entre os parâmetros utilizados, o co-solvente apresentou mudanças significativas em relação às taxas de conversão e excesso enantiomérico quando os solventes butanol e cicloexanol foram utilizados;
- ✓ Dentre aos derivados da acetofenona biotransformados nas condições otimizadas, a 4'-nitro-acetofenona apresentou a melhor taxa de conversão, 52,2%, e o maior excesso enantiomérico foi obtido para o substrato 4'-MeO-acetofenona, 90,0%. Como esperado, a presença de um grupo retirador de densidade eletrônica (NO<sub>2</sub>) contribuiu positivamente para a redução da carbonila;
- ✓ Todos os substratos testados foram biotransformados estereosseletivamente levando à formação majoritária do enantiômero S, com exceção da 2-cloro e 2-bromo-acetofenona;

- ✓ A acetofenona apresentou as melhores taxas de conversão e e.e. em comparação aos seus derivados, 97 e 96%, respectivamente;
- ✓ Foi possível realizar um scale-up, com produção de quantidades significativas do álcool S (~400 mg);
- ✓ Os fungos endofítico obtidos das folhas da *Handroanthus impetiginosus* com destaque para o endófito *Talaromyces purpurogenus H4* são potenciais fontes enzimáticas na obtenção de blocos construtores quirais.

## 6. REFERÊNCIAS

AGUIRRE-PRANZONI, C. et al. Lyophilized *Rhodotorula* yeast as all-in-one redox biocatalyst: Access to enantiopure building blocks by simple chemoenzymatic one-pot procedures. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 114, p. 19–24, 2014.

AIMAR, M. L. et al. Fruits of the glossy privet (*Ligustrum lucidum*-Oleaceae) as biocatalysts for producing chiral aromatic alcohols. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, n. 6, p. 348–357, 2014.

ALVES, P. B.; VICTOR, M. M. Reação da cânfora com borohidreto de sódio: Uma estratégia para o estudo da estereoquímica da reação de redução. **Química Nova**, v.33, n. 10, p. 2274-2278, 2010.

ANDRADE, L. H. et al. Edible catalysts for clean chemical reactions: Bioreduction of aromatic ketones and biooxidation of secondary alcohols using plants. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 38, n. 2, p. 84–90, 2006.

ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2–3, p. 51–66, 2007.

BAI, D. L.; TANG, X. C.; HE, X. C. Huperzine A, A Potential Therapeutic Agent for Treatment of Alzheimer's Disease. **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 3, p. 355–374, 2000.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

BARY, A. **Morphologie und physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten**. Leipzig: Engelamn, 1866.

BASAVIAH, D.; REDDY, G. J.; CHANDRASHEKAR, V. (2S,5S)-1,3-Diaza-2-phospha-2-oxo-2-chloro-3-phenylbicyclo[3.3.0]octane: A novel chiral source for borane-mediated catalytic chiral reductions. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 13, n. 11, p. 1125–1128, 2002.

BENJAMIN, C. R. Ascocarps of *Aspergillus* and *Penicillium*. **Mycologia Society of America**, v. 47, n. 5, p. 669–687, 1955.

BETTELHEIM, F. A. et al. **Introdução a Bioquímica**, 9ª ed. Trad. Azzellini, G. C.; SILVA, M. de C. São Paulo: Cengage Learning, 2012.

BÜRGI, H. B.; DUNITZ, J. D.; LEHN, J. M.; WIPFF, G. Stereochemistry of reaction paths at carbonyl centres. **Pergamon Press**, v. 30, p. 1563-1572, 1974.

CHANYCHEVA, A. R.; VOROBYOVA, T. E.; ZORIN, V. V. Relative reactivity of substituted acetophenones in enantioselective biocatalytic reduction catalyzed by plant cells of *Daucus carota* and *Petroselinum crispum*. **Tetrahedron**, v. 75, n. 36, p. 130494, 2019.

CLAYDEN, J. et al. **Organic Chemistry**. 1st ed. New York: Oxford, 2000.

COSTA, P.; PILLI, R.; PINHEIRO, S. **Substâncias Carboniladas e derivados**. 2ª ed. São Paulo: EditSBQ, 2019.

DA SILVA, B. F.; RODRIGUES-FO, E. Production of a benzylated flavonoid from 5,7,3',4',5'- pentamethoxyflavanone by *Penicillium griseoroseum*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 7, p. 184–188, 2010.

DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; DOS SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146–156, 2004.

DE WILDEMAN, S. M. A. et al. Biocatalytic reductions: From lab curiosity to “first choice”. **Accounts of Chemical Research**, v. 40, n. 12, p. 1260–1266, 2007.

DECARLINI, M. F. et al. Fungi isolated from food samples for an efficient stereoselective production of phenylethanols. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, p. 275–285, 2017.

DEMAIN, A. L.; Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. 41, p. 185-201, 2014.

DESIRAJU, G. R.; STEINER, T. **The Weak Hydrogen Bond: In Structural Chemistry and Biology**. Oxford: Oxford University Press, 1999.

DO NASCIMENTO, J. S. et al. Mapping the Biotransformation of Coumarins. **Molecules**, v. 24, p. 1–9, 2019.

DO NASCIMENTO, J. S.; CONCEIÇÃO, J. C. S.; SILVA, E. DE O. Biotransformation of Coumarins by Filamentous Fungi: An Alternative Way for Achievement of Bioactive Analogs. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 568–577, 2018.

DOS SANTOS, V. H. P.; SILVA, E. DE O. Endophytic fungi from the Brazilian flora and their employment in biotransformation reactions. **Quimica Nova**, v. 42, n. 7, p. 784–791, 2019.

DRAUZ, K.; GRÖGER, H.; MAY, O. **Enzyme Catalysis in Organic Synthesis**. 3<sup>rd</sup> ed. Weinheim: Wiley-vch, 2012.

DU, D. M. et al. Structurally well-defined, recoverable C<sub>3</sub>-symmetric tris( $\beta$ -hydroxy phosphoramidate)-catalyzed enantioselective borane reduction of ketones. **Organic Letters**, v. 8, n. 7, p. 1327–1330, 2006.

DU, P. X. et al. Biocatalytic anti-Prelog reduction of prochiral ketones with whole cells of *Acetobacter pasteurianus* GIM1.158. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2014.

FARBOOD, M.I. et al. **Mixtures of optical isomers of styralyl alcohol or styralyl acetate, processes for preparing same and organoleptic uses thereof**. Patent US6511686B1. Deposit: May. 19, 2000. Concession: Jan. 28, 2003.

FARDELONE, L. C.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. Bioreduction of  $\alpha$ -haloacetophenones by *Rhodotorula glutinis* and *Geotrichum candidum*. **Arkivoc**, n. 10, p. 404–410, 2003.

FORREST, G. L.; GONZALEZ, B. Carbonyl reductase. **Chemico-Biological Interactions**, v. 129, n. 1–2, p. 21–40, 2000.

GILMORE, N. J.; JONES, S.; MULDOWNNEY, M. P. Synthetic applicability and in situ recycling of a B-methoxy oxazaborolidine catalyst derived from *cis*-1-amino-indan-2-ol. **Organic Letters**, v. 6, n. 16, p. 2805–2808, 2004.

GIRI, A. et al. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: Current trends and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 3, p. 175–199, 2001.

HALLMANN, J.; SIKORA, R. A. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, v. 102, n. 2, p. 155–162, 1996.

HANSON, J. R. **An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry**, 1st ed.; W.H. Freeman Spektrum: Oxford, UK, 1995.

HARDOIM, P. R. et al. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 293–320, 2015.

HARMS, H.; SCHLOSSER, D.; WICK, L. Y. Untapped potential: Exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 177–192, 2011.

HEGAZY, M. E. F. et al. Microbial biotransformation as a tool for drug development based on natural products from mevalonic acid pathway: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 1, p. 17–33, 2015.

HOMOLA, P. et al. Cultivation of *Pichia capsulata* as a whole-cell biocatalyst with NADH-dependent alcohol dehydrogenase activity for *R*-1-phenylethanol production. **Food and Bioproducts Processing**, v. 96, p. 126–132, 2015.

HOMOLA, P. et al. Kinetics of acetophenone reduction to (*R*)-1-phenylethanol by a whole-cell *Pichia capsulata* biocatalyst. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 33, n. 5, p. 1–11, 2016.

HU, J.; XU, Y. Anti-Prelog reduction of prochiral carbonyl compounds by *Oenococcus oeni* in a biphasic system. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 14, p. 1115–1119, 2006.

JALGAONWALA, R. E.; MOHITE, B. V.; MAHAJAN, R. T. A review : Natural products from plant associated endophytic fungi. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 1, n. 2, p. 21–32, 2011.

JAYESHKUMAR, J. S. . S. J. Microbial and Biological Conversions of Bioactive Natural Products- a Review. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 11, p. 3502–3506, 2015.



JEFFREY, G. A., **An Introduction to Hydrogen Bonding**, Oxford University Press: Oxford, 1997.

JIA, M. et al. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: A systematic review. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–14, 2016.

KAUSHIK, N.; BISWAS, S.; SINGH, J. Biocatalysis and Biotransformation Processes – An Insight. **The Scitech Journal**, v. 01, n. 08, p. 15–22, 2014.

KIRK PM; CANNON P. F.; MINTER D. W; STALPERS J. A. **Dictionary of the Fungi**. 10th ed. CAB International: Wallingford, UK. 2008.

KULIG, J. et al. Stereoselective synthesis of bulky 1,2-diols with alcohol dehydrogenases. **Catalysis Science and Technology**, v. 2, n. 8, p. 1580–1589, 2012.

LI, H. et al. Asymmetric reduction of acetophenone into *R*-(+)-1-phenylethanol by endophytic fungus *Neofusicoccum parvum* BYEF07 isolated from *Illicium verum*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 473, n. 4, p. 1–5, 2016.

MA, M. F. P. et al. New chiral phosphorus catalysts derived from (*S*)-binaphthol for highly enantioselective reduction of acetophenone by borane. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 10, n. 17, p. 3259–3261, 1999.

MA, X.; GANG, D. R. The Lycopodium alkaloids. **Natural Product Reports**, v. 21, n. 6, p. 752–772, 2004.

MANETSCH, R. et al. In situ click chemistry: Enzyme inhibitors made to their own specifications. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 40, p. 12809–12818, 2004.

MATHRE, D. J. et al. A practical process for the preparation of tetrahydro-1-methyl-3,3-diphenyl-1H,3H-pyrrolo[1,2-c]-[1,3,2]oxazaborole-borane. A highly enantioselective stoichiometric and catalytic reducing agent. **Journal of Organic Chemistry**, v. 58, n. 10, p. 2880–2888, 1993.

MOORE, J. C. et al. Advances in the enzymatic reduction of ketones. **Accounts of Chemical Research**, v. 40, n. 12, p. 1412–1419, 2007.

MUSA, M. M. et al. Asymmetric reduction and oxidation of aromatic ketones and alcohols using W110A secondary alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 72, n. 1, p. 30–34, 2007.

NAGANTHRAN, A. et al. Improving the efficiency of new automatic dishwashing detergent formulation by addition of thermostable lipase, protease and amylase. **Molecules**, v. 22, n. 9, p. 1–18, 2017.

NAIK, H. G. et al. Investigation of asymmetric alcohol dehydrogenase (ADH) reduction of acetophenone derivatives: Effect of charge density. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 10, n. 25, p. 4961–4967, 2012.

NAKAMURA, K. et al. Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 14, n. 18, p. 2659–2681, 2003.

NAKAMURA, K.; MATSUDA, T. Asymmetric reduction of ketones by the acetone powder of *Geotrichum candidum*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 63, n. 24, p. 8957–8964, 1998.

NELSON, D. L, COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 7<sup>a</sup> Ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

NIE, Y.; XU, Y.; MU, X. Q. Highly enantioselective conversion of racemic 1-phenyl-1,2-ethanediol by stereoinversion involving a novel cofactor-dependent oxidoreduction system of *Candida parapsilosis* CCTCC M203011. **Organic Process Research and Development**, v. 8, n. 2, p. 246–251, 2004.

OLIVEIRA, L. G. DE; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: Contribuições e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 742–756, 2009.

OMORI, Á. T.; PORTAS, V. B.; DE OLIVEIRA, C. D. S. Redução enzimática do 4-(dimetilamino)-benzaldeído com pedaços de cenoura (*Daucus carota*): Um experimento simples na compreensão da biocatálise. **Química Nova**, v. 35, n. 2, p. 435–437, 2012.

ORDEN, A. A. et al. Anti-Prelog reduction of ketones by hairy root cultures. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 61, n. 4, p. 216–220, 2009.

PAL, M. et al. Biocatalyzed asymmetric reduction of benzils to either benzoin or hydrobenzoin: pH dependent switch. **Catalysis Science and Technology**,

v. 5, n. 2, p. 4017–4028, 2015.

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

PAULA, M. A.; REIS, V. M.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biology and Fertility of Soils**, v. 11, n. 2, p. 111–115, 1991.

PEREIRA, R. D. S. Projeto e construção de um bioreator para síntese orgânica assimétrica catalisada por *Saccharomyces cerevisiae* (Fermento Biológico de Padaria). **Quimica Nova**, v. 20, n. 5, p. 551–554, 1997.

PHAM, V. T.; PHILLIPS, R. S.; LJUNGDAHL, L. G. Temperature-Dependent Enantiospecificity of Secondary Alcohol Dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 5, p. 1935–1936, 1989.

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

PRELOG, V. Specification of the stereospecificity of some oxido-reductases by diamond lattice sections. **Pure and Applied Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 119–130, 1964.

REID, M. F.; FEWSON, C. A. Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 13–56, 1994.

RÍSQUEZ-CUADRO, R. et al. Fullerene-sp<sup>2</sup>-iminosugar balls as multimodal ligands for lectins and glycosidases: A mechanistic hypothesis for the inhibitory multivalent effect. **Chemistry - A European Journal**, v. 19, n. 49, p. 16791–16803, 2013.

ROUSH, W. R. et al. Studies on the synthesis of aureolic acid antibiotics: Acyloin glycosidation studies. **Journal of Organic Chemistry**, v. 61, n. 18, p. 6098–6099, 1996.

SCALVENZI, L. Biotransformations by endophytic fungi isolated from traditional Ecuadorian medicinal plants: Connecting ethnomedicine with biotechnology. **Revista Amazónica: Ciencia y tecnología**, v. 1, n. 3, p. 248–270, 2012.

STOKES, P. E.; HOLTZ, A. Fluoxetine tenth anniversary update: The progress continues. **Clinical Therapeutics**, v. 19, n. 5, p. 1135–1250, 1997.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491–502, 2003.

SUAN, C. L.; SARMIDI, M. R. Immobilised lipase-catalysed resolution of (*R,S*)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 28, n. 2–3, p. 111–119, 2004.

TAKAHASHI, J. A. et al. Fungos Filamentosos e Química: Velhos Conhecidos, Novos Aliados. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 6, p. 2351–2382, 2017.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015.

UWAI, K. et al. Electronic effects of para-substitution on acetophenones in the reaction of rat liver 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 1084–1089, 2008.

VERZA, M. et al. Biotransformation of a Tetrahydrofuran Lignan by the Endophytic Fungus *Phomopsis* Sp. **Jornal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 1, p. 195–200, 2009.

VOGEL, A. I. **A Text-Book of Practical Organic Chemistry**. 3 rd. London: Longman, 1974.

WANG, R.; TANG, X. C. Neuroprotective effects of huperzine A: A natural cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. **NeuroSignals**, v. 14, n. 1–2, p. 71–82, 2005.

WEBSTER, J.; WEBER, R. W. S. **Introduction to Fungi**. 3 rd. Cambridge. 2007.

WONG, D. T. et al. Chronic effects of fluoxetine, a selective inhibitor of serotonin uptake, on neurotransmitter receptors. **Journal of Neural Transmission**, v. 64, n. 4, p. 251–269, 1985.

ZHAN, Z. J. et al. Biotransformation of Huperzine B by a Fungal Endophyte of *Huperzia serrata*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 16, n. 8, p. 1–6, 2019.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 5, p. 753–771, 2006.

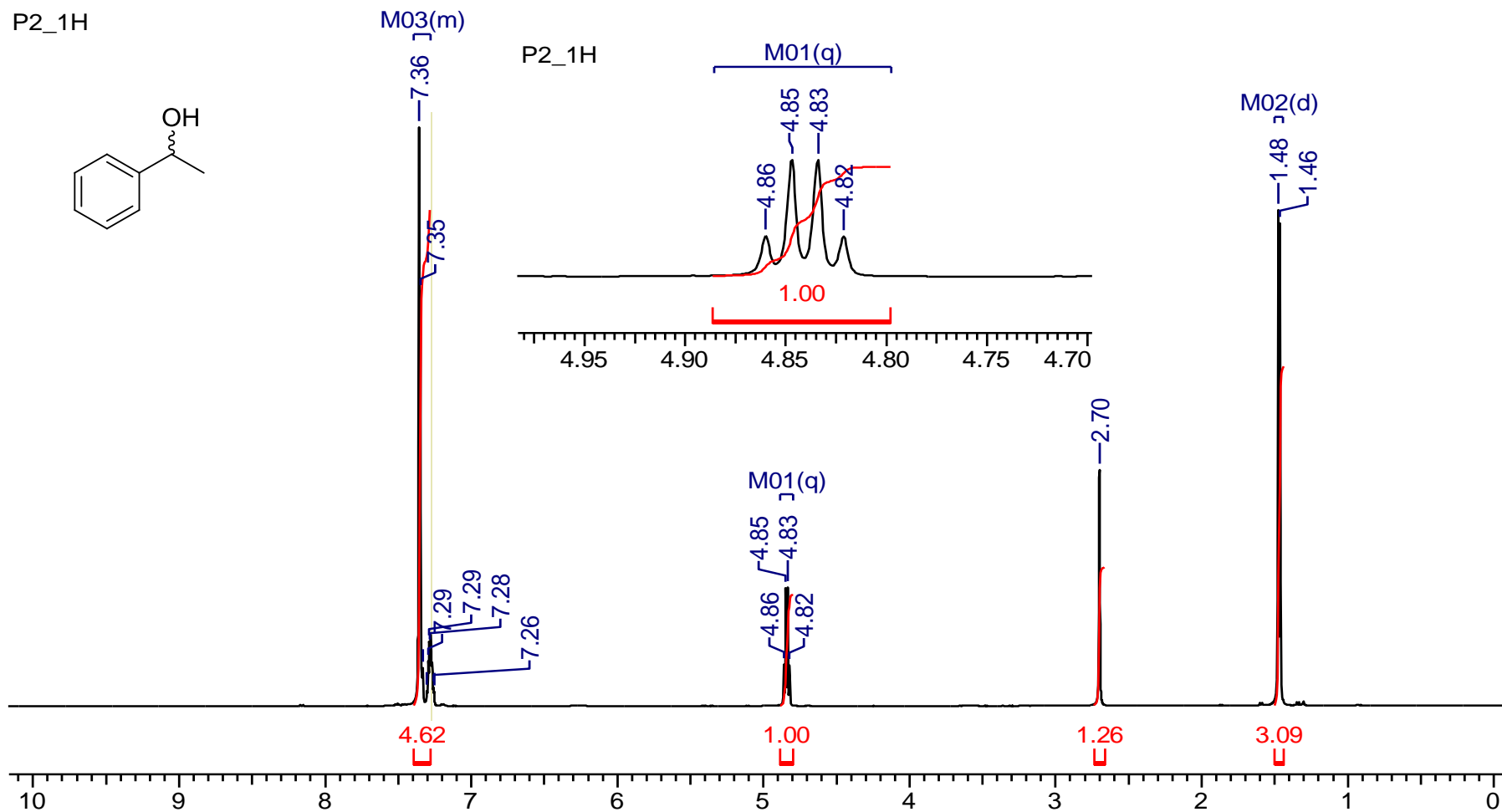
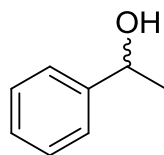
ZHU, D.; MALIK, H. T.; HUA, L. Asymmetric ketone reduction by a hyperthermophilic alcohol dehydrogenase. The substrate specificity, enantioselectivity and tolerance of organic solvents. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 17, n. 21, p. 3010–3014, 2006.

ZHU, D.; YANG, Y.; HUA, L. Stereoselective enzymatic synthesis of chiral alcohols with the use of a carbonyl reductase from *Candida magnoliae* with anti-prelog enantioselectivity. **Journal of Organic Chemistry**, v. 71, n. 11, p. 4202–4205, 2006.

# APÊNDICE A

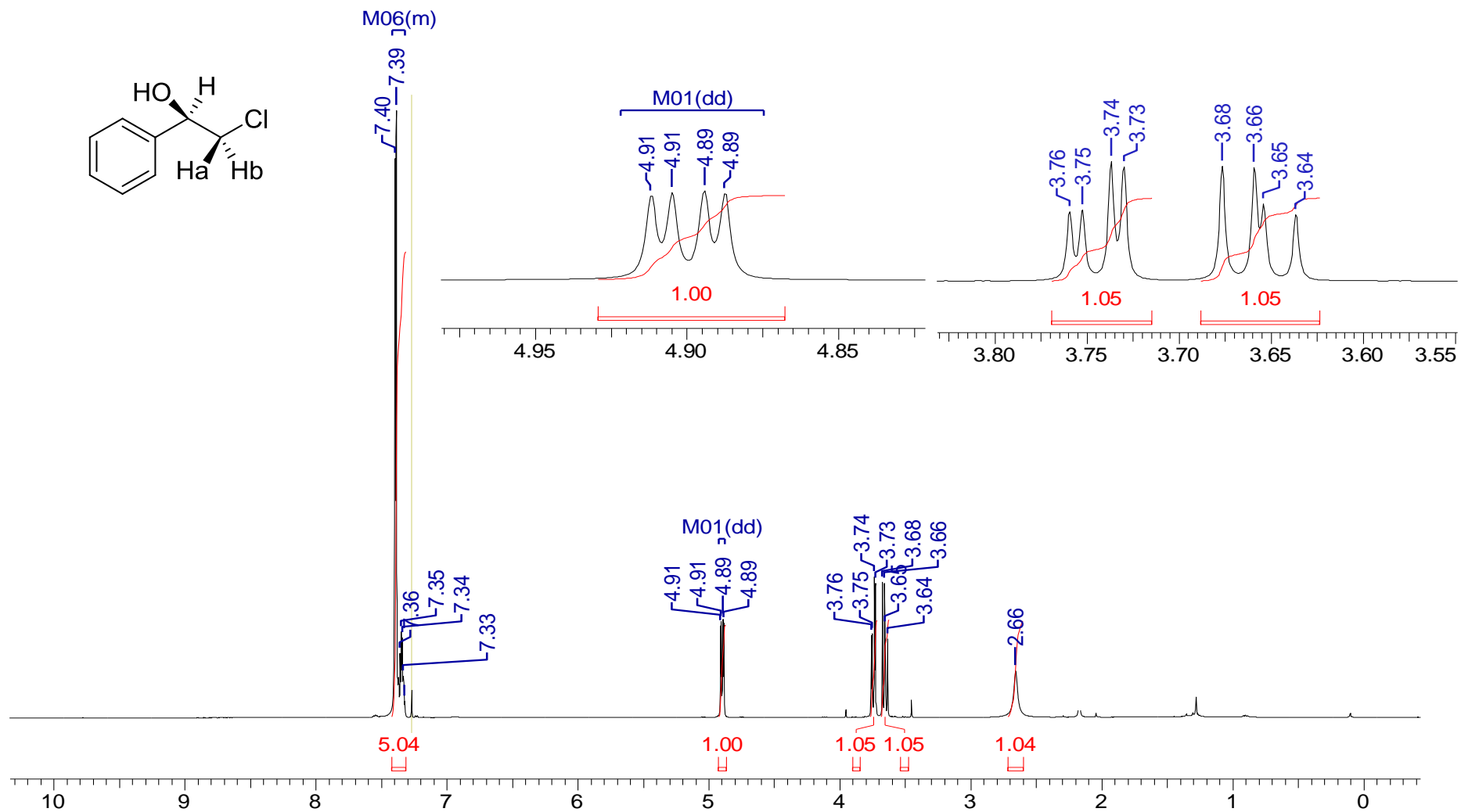
## Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) - 1-feniletanol (21a)

P2\_1H

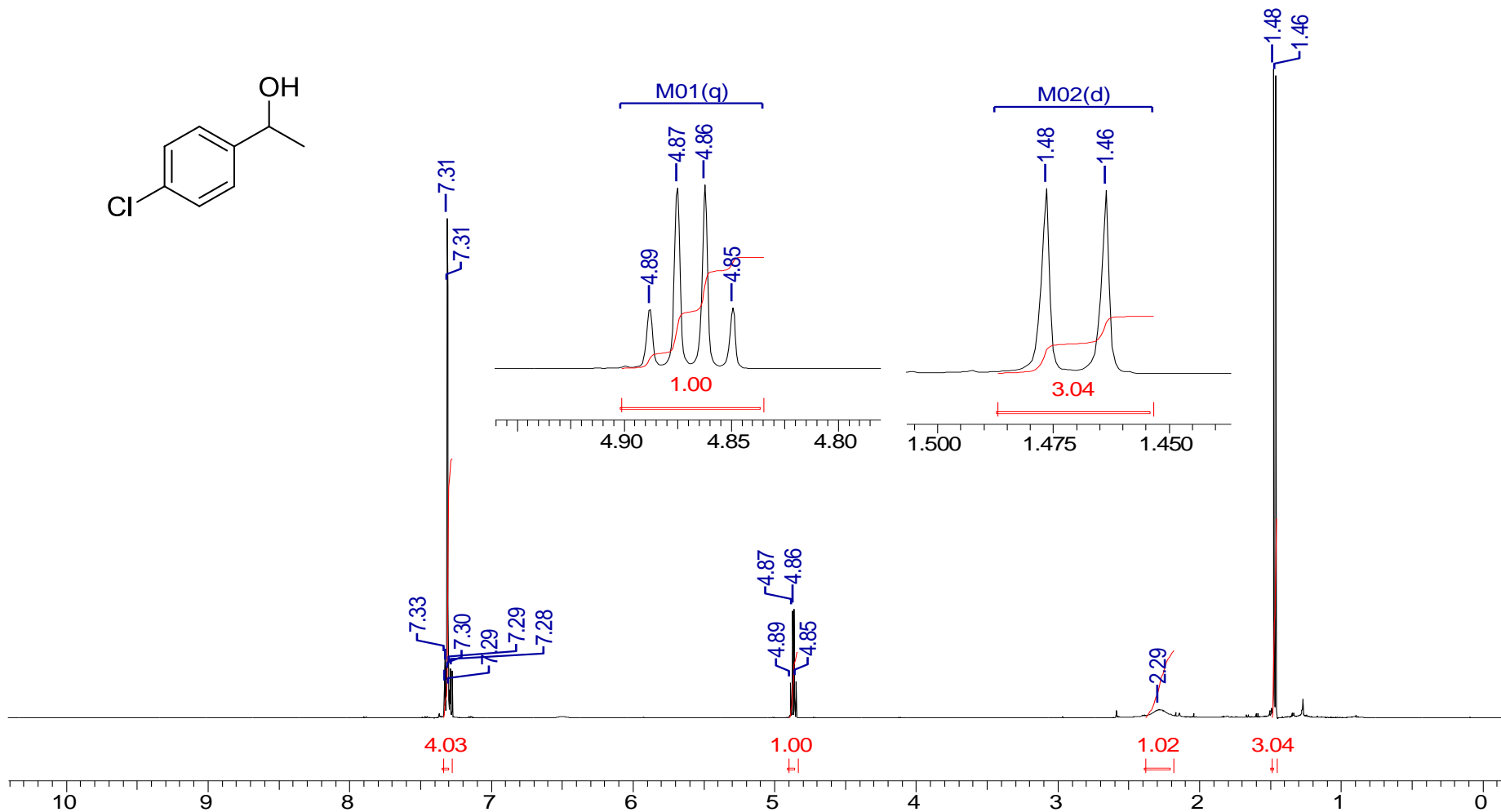
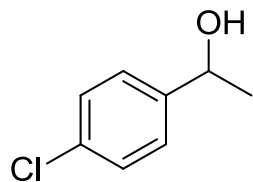




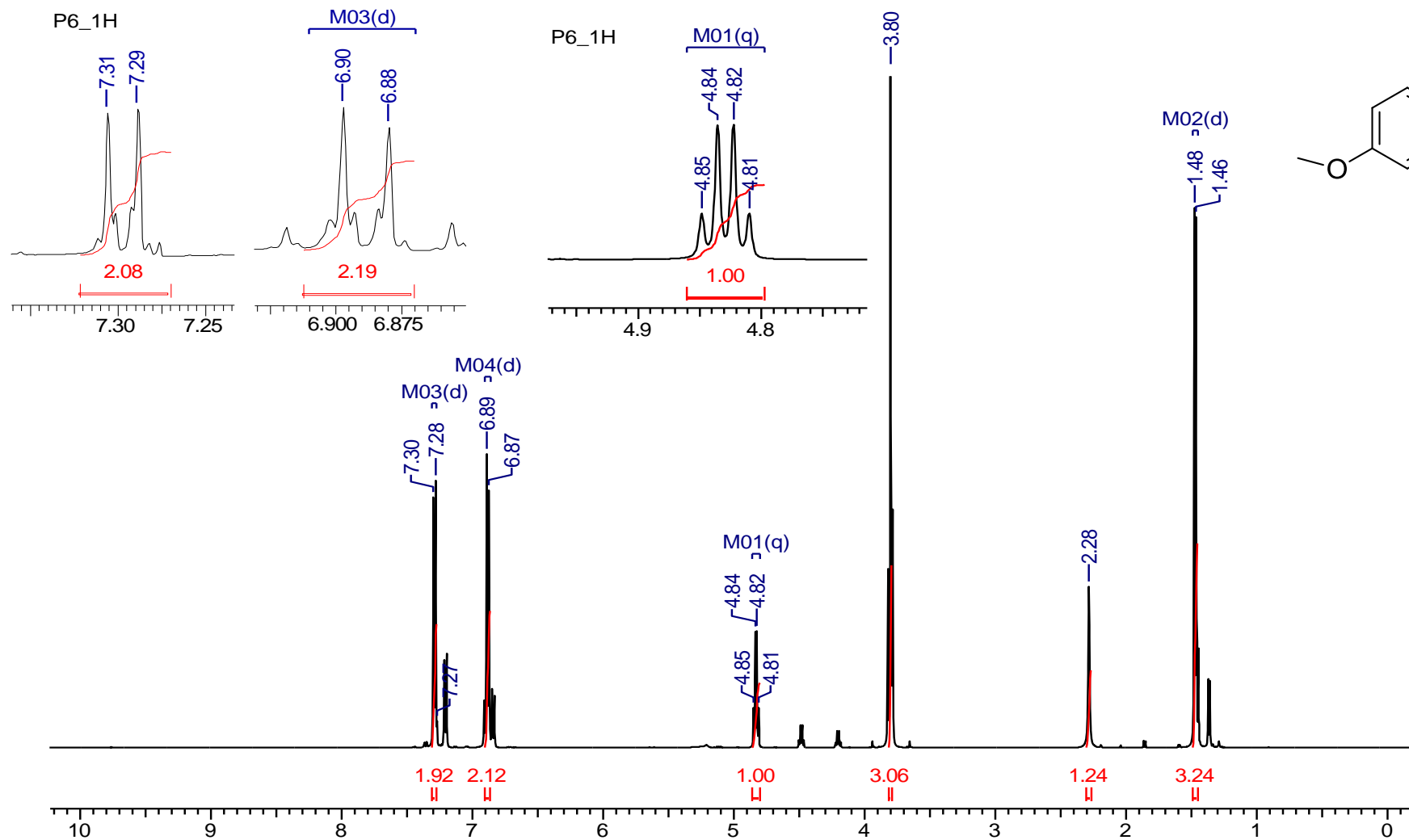
- Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) - 2-cloro-1-feniletanol (22a)



- Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – 4'-cloro-1-feniletanol (23a)

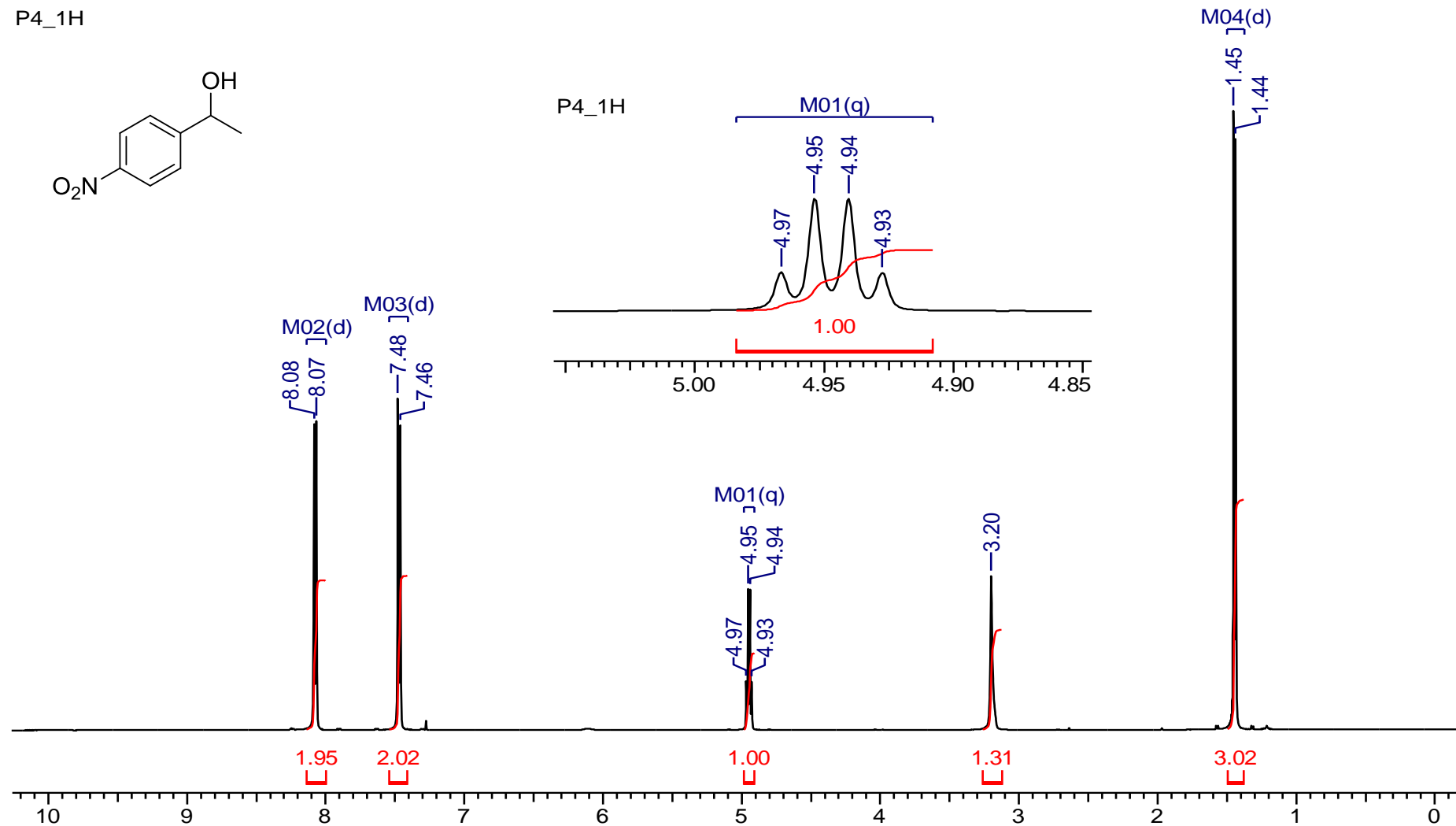
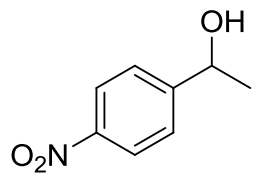


- Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – 4'-metóxi-1-feniletanol (24a)

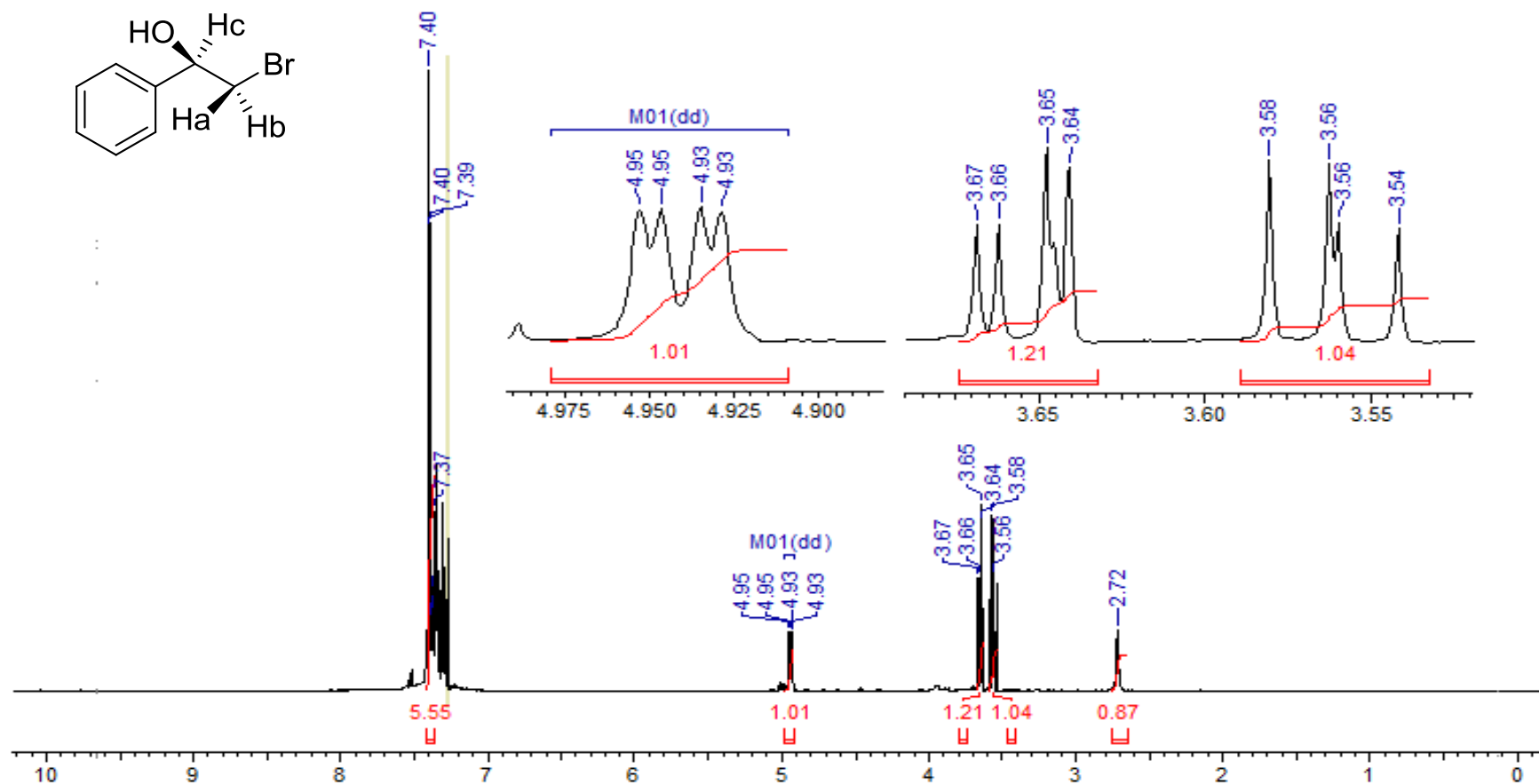


- Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – 4'-nitro-1-feniletanol (24a)

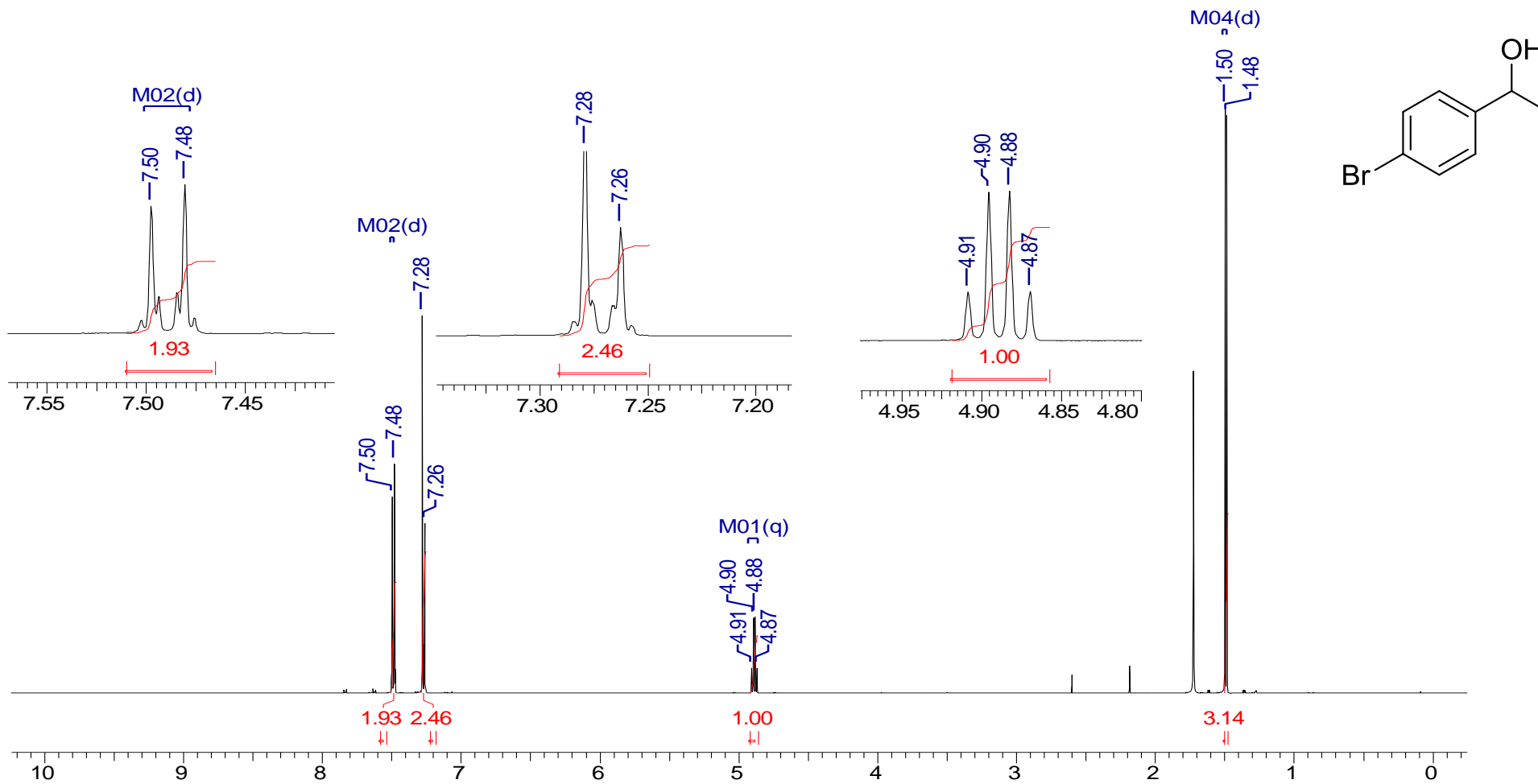
P4\_1H



- Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – 2-bromo-1-feniletanol (26a)

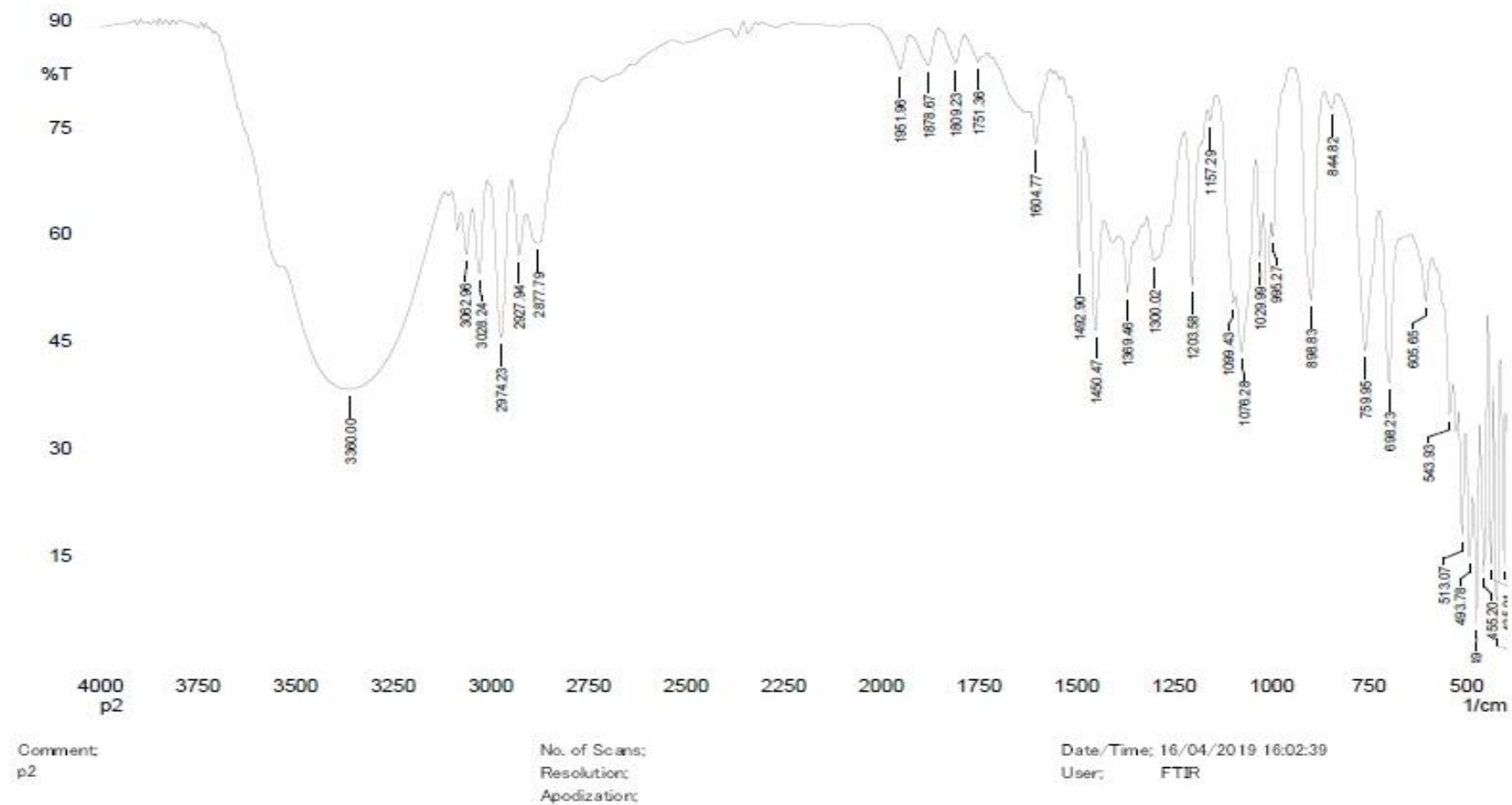


- Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – 4'-bromo-1-feniletanol (27a)

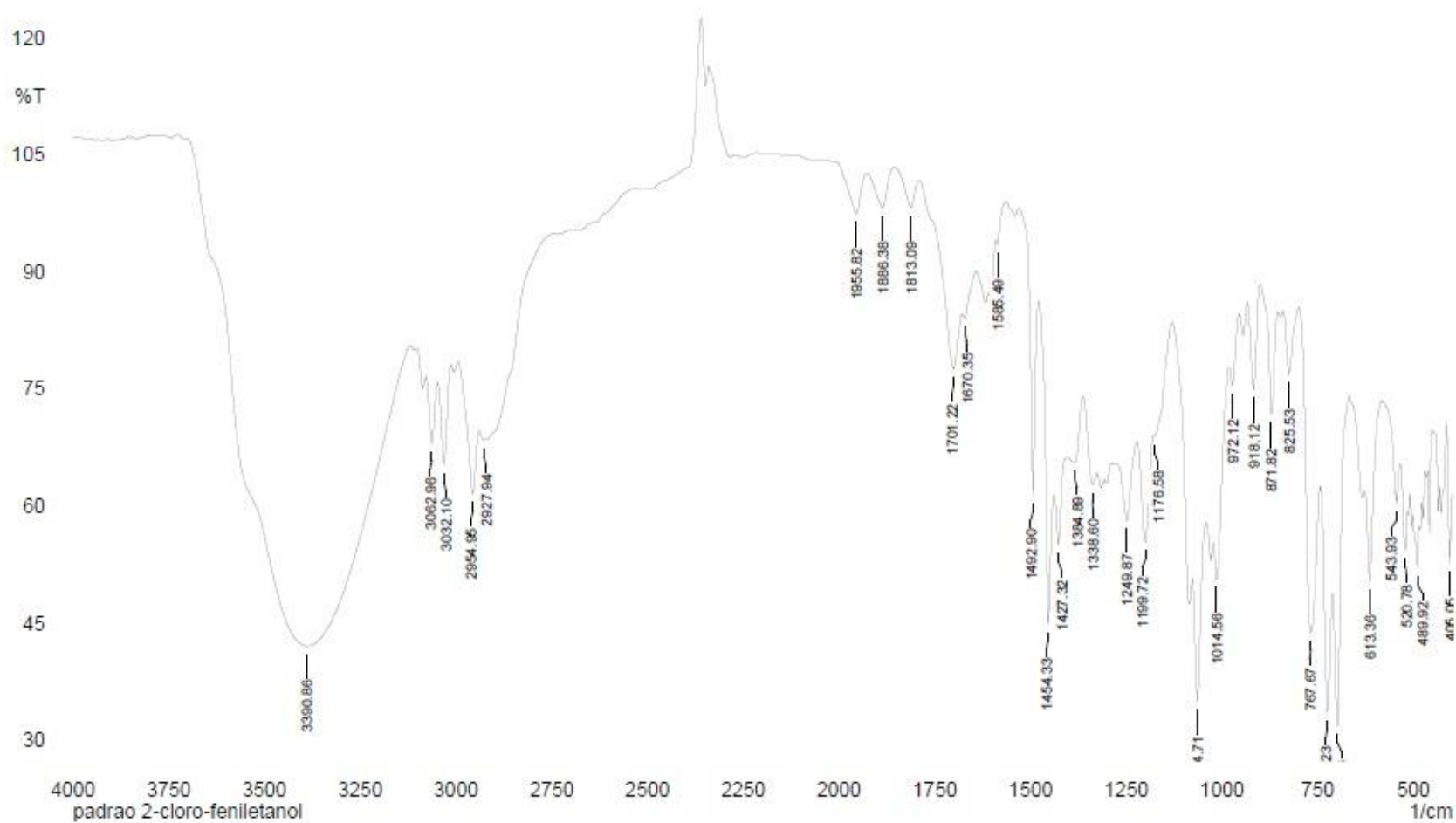


## Apêndice B – Espectros de Infravermelho dos produtos obtidos

### ➤ 1-feniletanol (21a) – filme NaCl

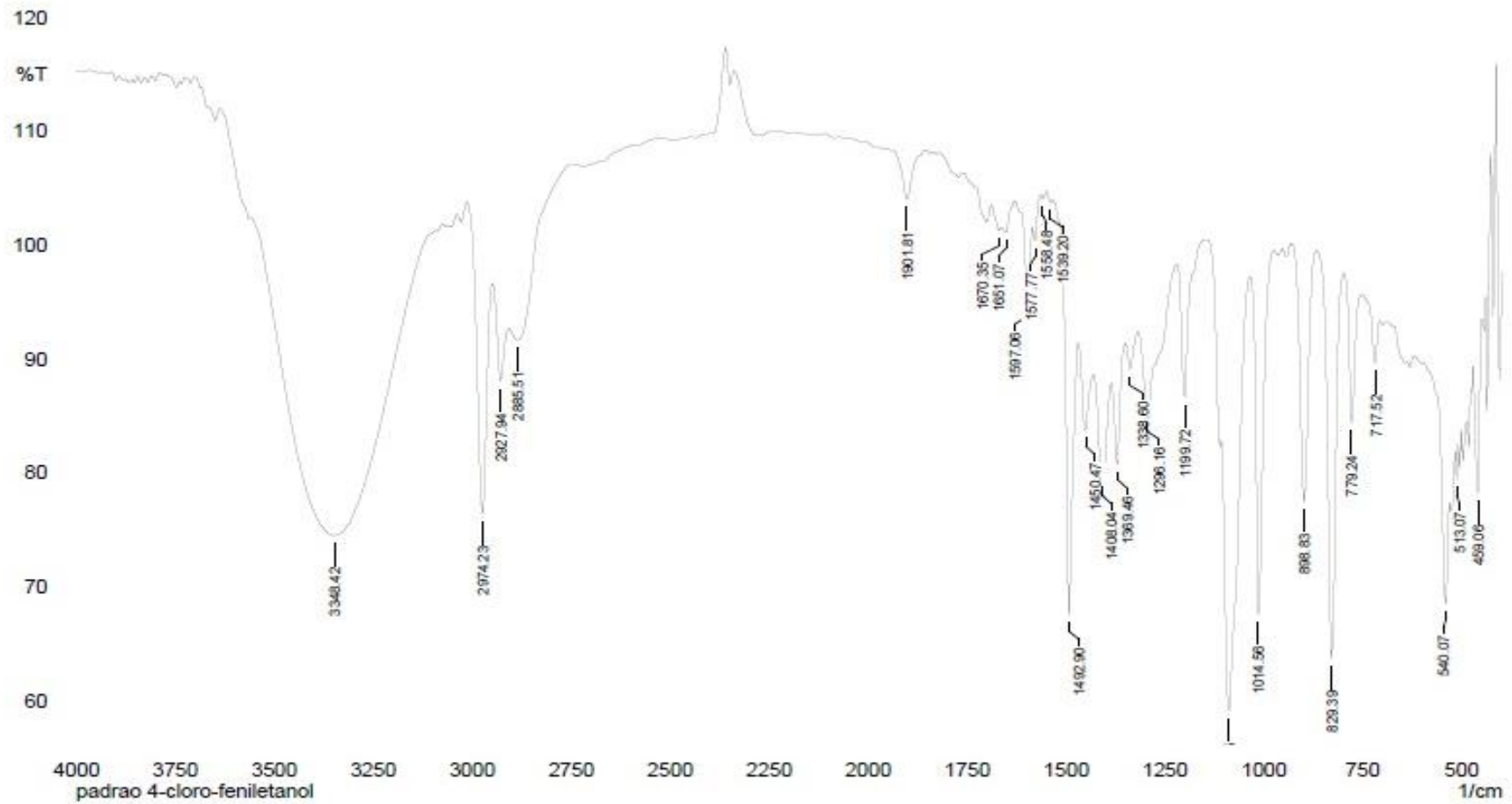


➤ 2-cloro-1-feniletanol (22a) – filme NaCl





➤ 4'-cloro-1-feniletanol (23a) – filme NaCl

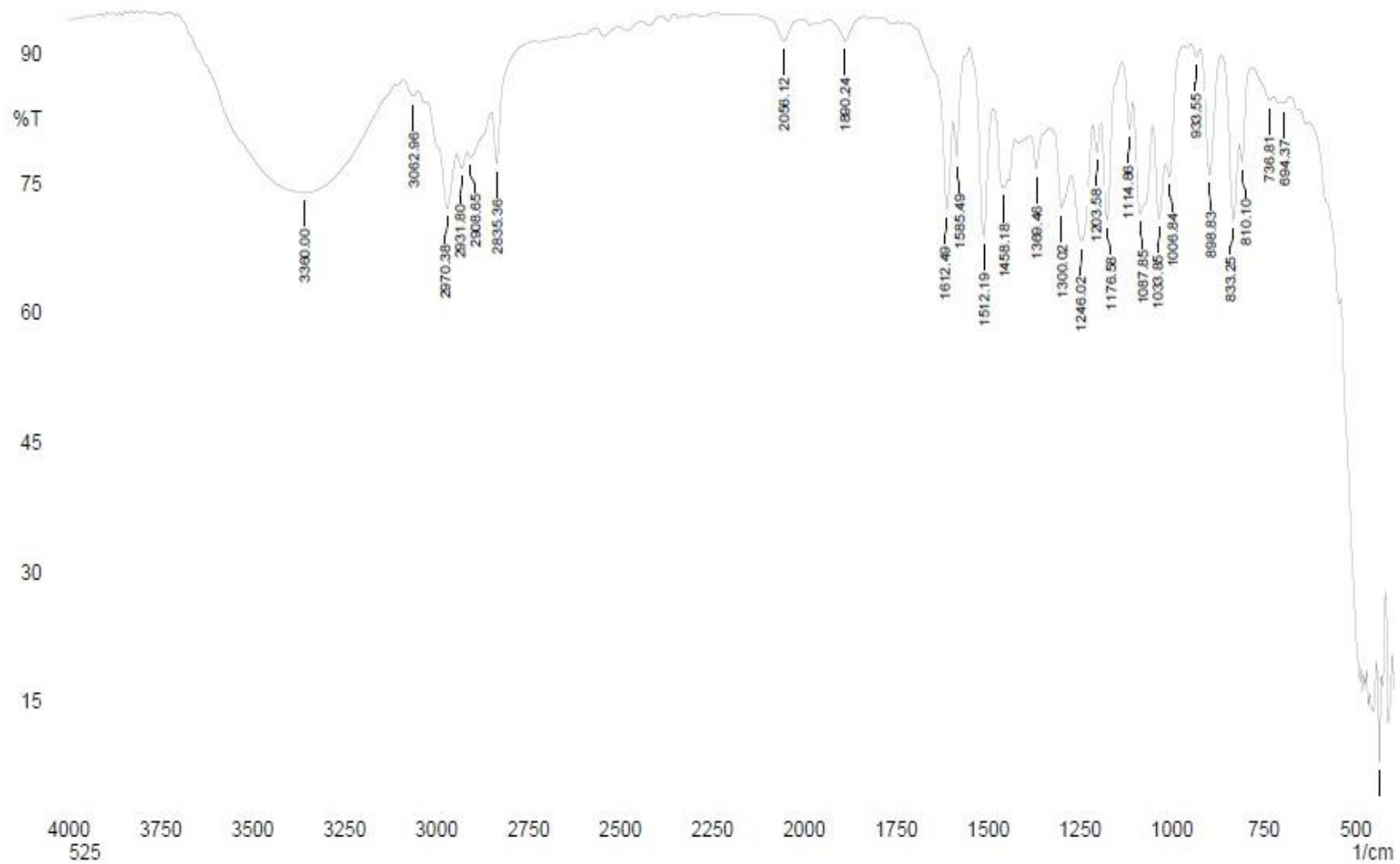


Comment:  
padrao 4-cloro-feniletanol

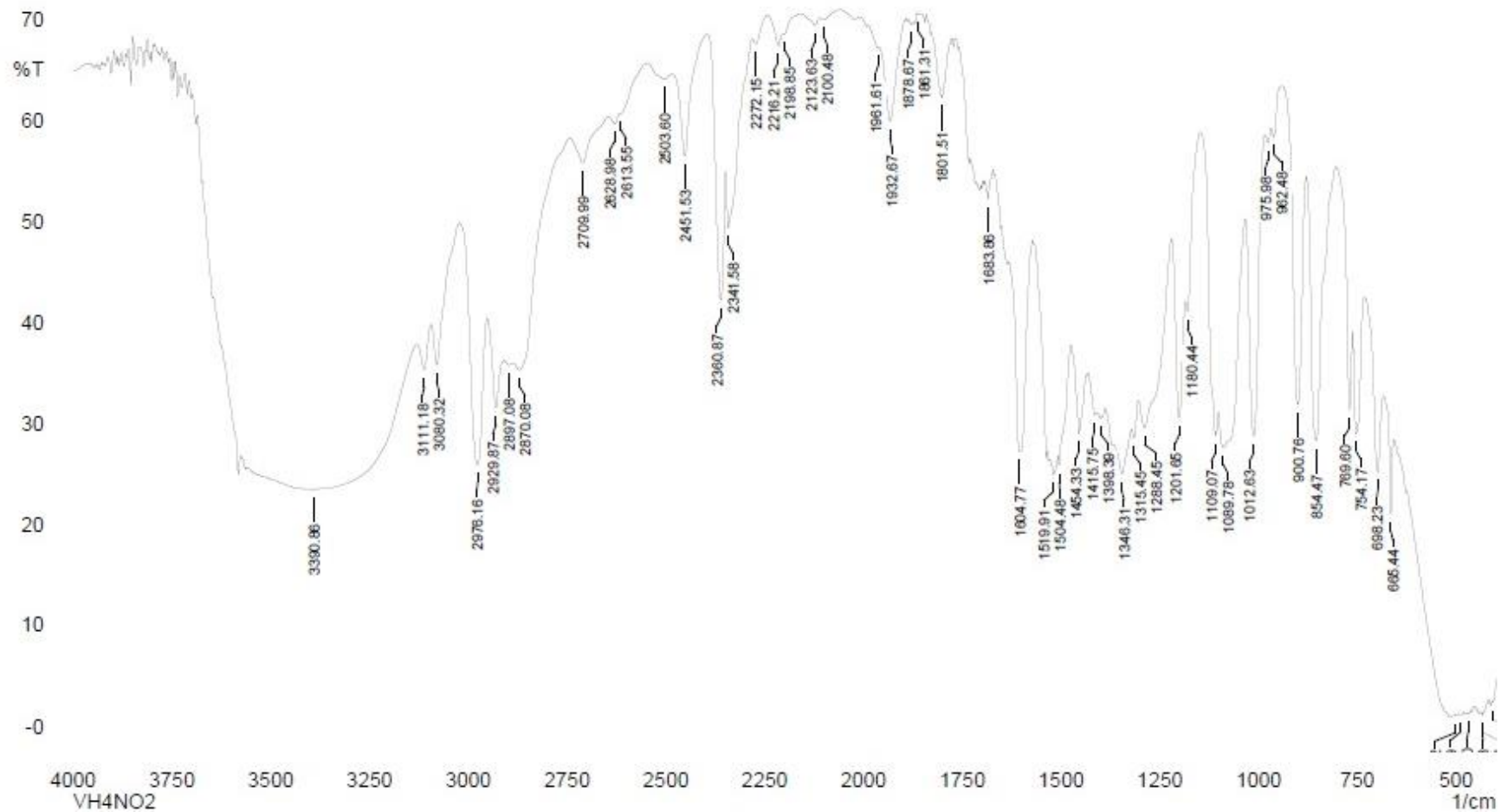
No. of Scans: 15  
Resolution: 8 [1/cm]  
Apodization: Happ-Genzel

Date/Time: 17/04/2019 14:09:07  
User: FTIR

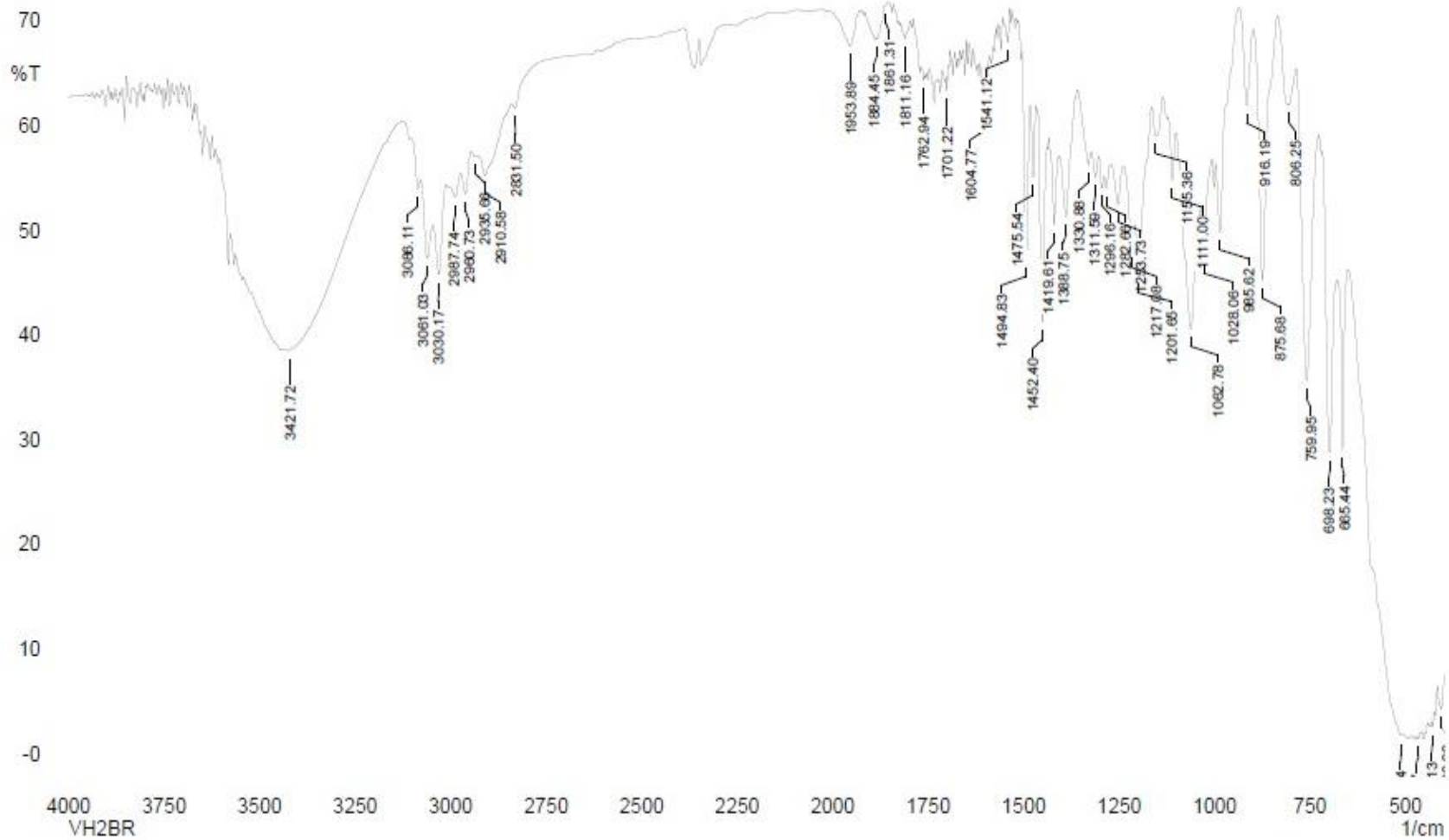
➤ 4'-metóxi-1-feniletanol (24a) – filme NaCl



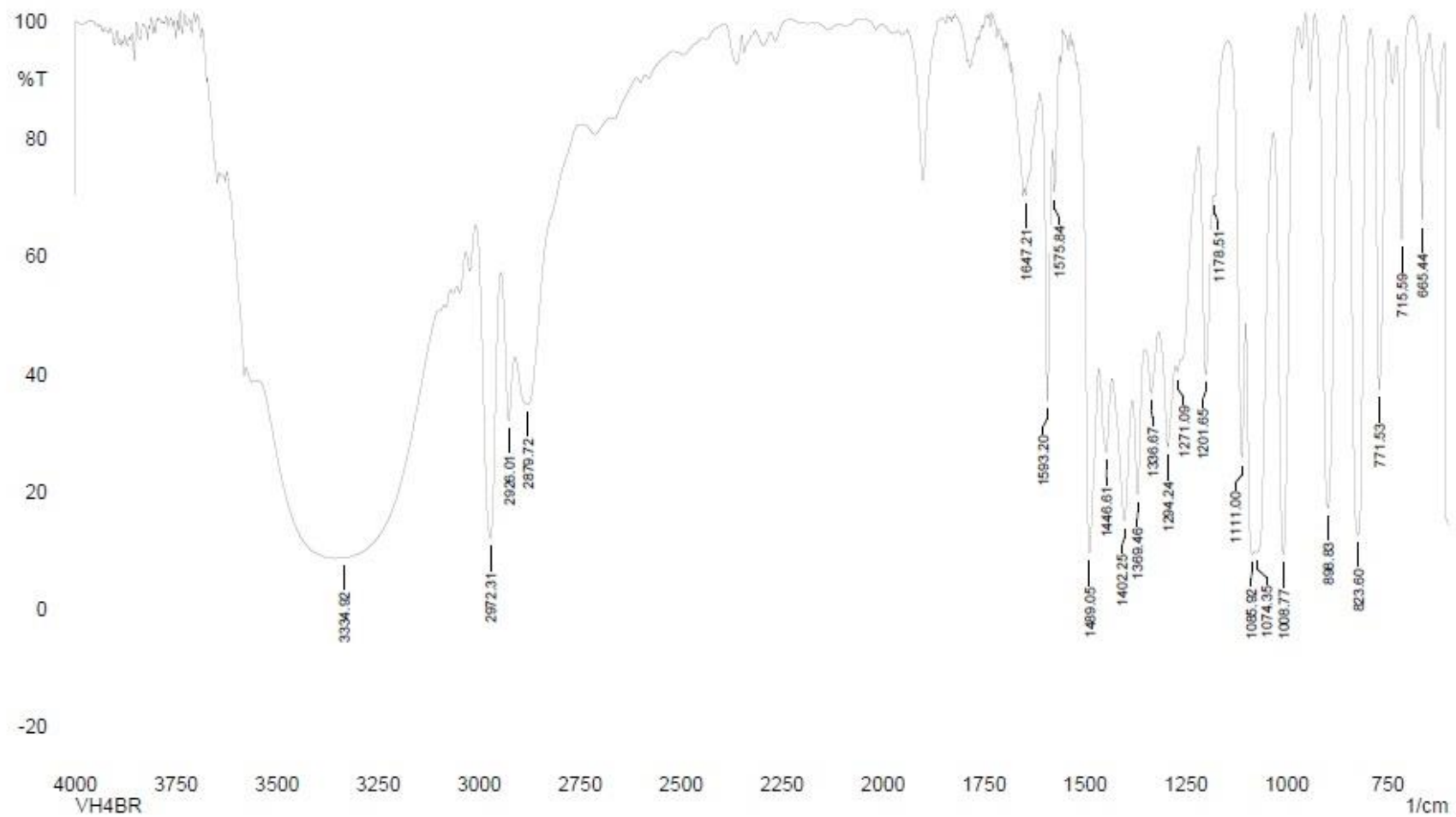
➤ 4'-nitro-1-feniletanol (25a) – filme NaCl



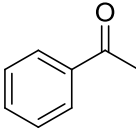
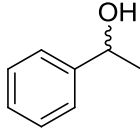
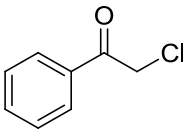
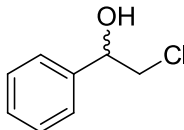
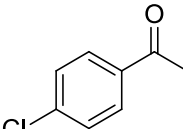
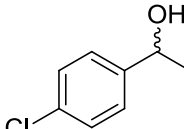
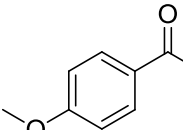
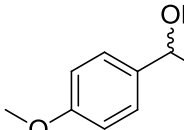
➤ 2-bromo-1-feniletanol (26a) – filme NaCl

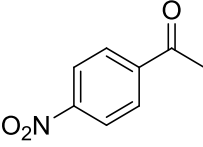
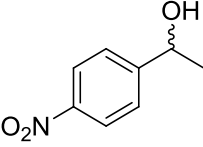
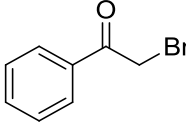
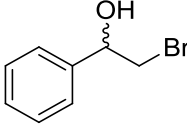
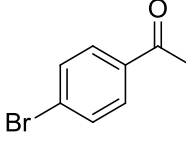
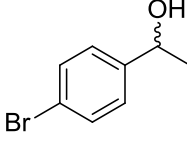


➤ 4'-bromo-1-feniletanol (27a) - filme NaCl



## Apêndice C – Métodos Cromatográficos para CG com coluna quiral

Método de CG		Estrutura química	
Nome	Parâmetro varável da coluna	Substrato	Produto
Padrão acetofenona/1-feniletanol	Ti = 80°C por 5 min. txa <sub>1</sub> = 2°C/min – (80-100)°C txa <sub>2</sub> = 5°C/min – (110-220)°C t <sub>c</sub> = 39 min	 <p><b>21</b></p> <p>t<sub>r</sub> = 12,01 min</p>	 <p><b>21a</b></p> <p>t<sub>r</sub> (R) = 18,21 min t<sub>r</sub> (S) = 18,70 min</p>
Padrão 2-cloro-acetofenona/2-cloro-1-feniletanol	Ti = 80°C por 2 min txa <sub>1</sub> = 5°C/min – (80-100)°C txa <sub>2</sub> = 0,5°C/min - (100-130)°C txa <sub>3</sub> = 45°C/min – (130-220)°C t <sub>c</sub> = 68 min	 <p><b>22</b></p> <p>t<sub>r</sub> = 30,02 min</p>	 <p><b>22a</b></p> <p>t<sub>r</sub> (S) = 41,14 min t<sub>r</sub> (R) = 43,17 min</p>
Padrão 4'-cloro-acetofenona/4'-cloro-1-feniletanol	Ti = 80°C por 2 min txa <sub>1</sub> = 5°C/min – (80-100)°C txa <sub>2</sub> = 0,5°C/min - (100-130)°C txa <sub>3</sub> = 45°C/min – (130-220)°C t <sub>c</sub> = 68 min	 <p><b>23</b></p> <p>t<sub>r</sub> = 20,64 min</p>	 <p><b>23a</b></p> <p>t<sub>r</sub> (R) = 37,77 min t<sub>r</sub> (S) = 39,74 min</p>
Padrão 4'-metóxi-acetofenona/4'-metóxi-1-feniletanol	Ti = 80°C por 2 min txa <sub>1</sub> = 5°C/min – (80-100)°C txa <sub>2</sub> = 0,5°C/min - (100-130)°C txa <sub>3</sub> = 45°C/min – (130-220)°C t <sub>c</sub> = 68 min	 <p><b>24</b></p> <p>t<sub>r</sub> = 33,81 min</p>	 <p><b>24a</b></p> <p>t<sub>r</sub> (R) = 39,39 min t<sub>r</sub> (S) = 40,15 min</p>

<p>Padrão 4'-nitro-acetofenona/4'-nitro-1-feniletanol</p>	<p><math>T_i = 80^\circ\text{C}</math> por 5min;  <math>txa_1 = 1^\circ\text{C}/\text{min}</math> (80 –185)<math>^\circ\text{C}</math>;  <math>T_f = 185^\circ\text{C}</math>  <math>t_c = 110\text{min}</math></p>	 <p><b>25</b></p> <p><math>t_r = 63,84 \text{ min}</math></p>	 <p><b>25a</b></p> <p><math>t_r (R) = 85,34 \text{ min}</math>  <math>t_r (S) = 86,26 \text{ min}</math></p>
<p>Padrão 2-bromo-acetofenona/2-bromo-1-feniletanol</p>	<p><math>T_i = 80^\circ\text{C}</math> por 2 min  <math>txa_1 = 5^\circ\text{C}/\text{min}</math> – (80-100)<math>^\circ\text{C}</math>  <math>txa_2 = 0,5^\circ\text{C}/\text{min}</math> - (100-130)<math>^\circ\text{C}</math>  <math>txa_3 = 45^\circ\text{C}/\text{min}</math> – (130-220)<math>^\circ\text{C}</math>  <math>t_c = 68 \text{ min}</math></p>	 <p><b>26</b></p> <p><math>t_r = 29,99 \text{ min}</math></p>	 <p><b>26a</b></p> <p><math>t_r (R) = 54,52 \text{ min}</math>  <math>t_r (S) = 56,50 \text{ min}</math></p>
<p>Padrão 4'-bromo-acetofenona/4'-bromo-1-feniletanol</p>	<p><math>T_i = 80^\circ\text{C}</math> por 2 min  <math>txa_1 = 5^\circ\text{C}/\text{min}</math> – (80-100)<math>^\circ\text{C}</math>  <math>txa_2 = 0,5^\circ\text{C}/\text{min}</math> - (100-130)<math>^\circ\text{C}</math>  <math>txa_3 = 45^\circ\text{C}/\text{min}</math> – (130-220)<math>^\circ\text{C}</math>  <math>t_c = 68 \text{ min}</math></p>	 <p><b>27</b></p> <p><math>t_r = 30,71 \text{ min}</math></p>	 <p><b>27a</b></p> <p><math>t_r (R) = 52,16 \text{ min}</math>  <math>t_r (S) = 53,89 \text{ min}</math></p>

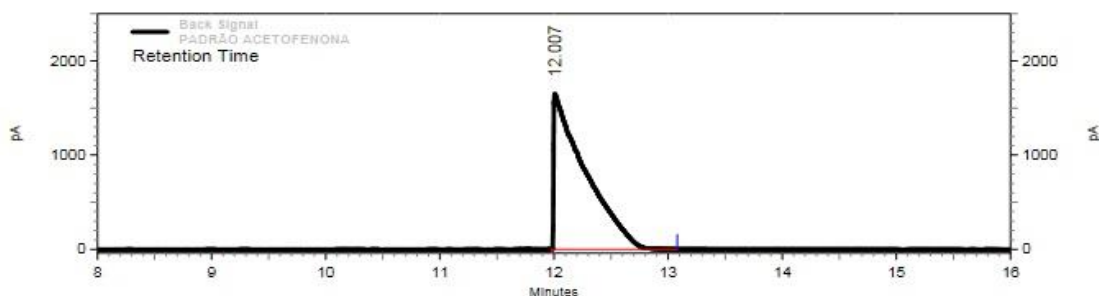
## Apêndice D – Cromatogramas obtidos de análise em CG com coluna quiral

### Padrão acetofenona (21)

Page 1 of 1

#### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Result\AMOSTRAS DO MESTRADO\COLUNA CYCLOSIL B\PADRÕES\ACETATO. FENIL E ACETOFENONA\PADRÃO ACETOFENONA Jaque REIS RESOLUÇÃO 3.met.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17 mestrado\TESTE PARA O ACETOACETATO DE ETILA E METILA 5.met  
 Acquired: 8/19/2016 10:39:15 AM (GMT -08:00)  
 Printed: 8/24/2018 9:34:36 AM (GMT -08:00)



#### Back Signal Results

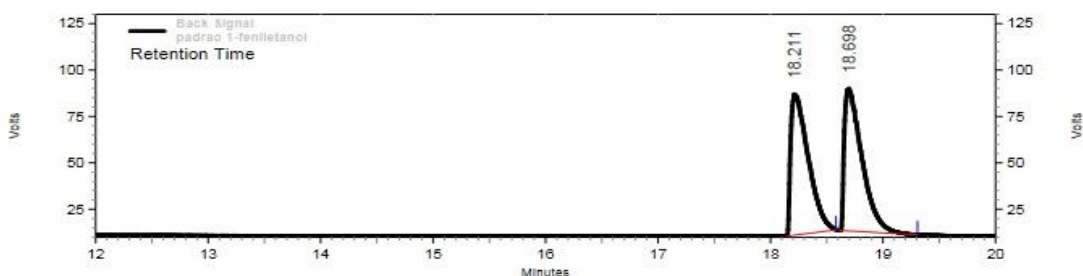
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.007	241611811	100.00	12671384	100.00
<b>Totals</b>	<b>241611811</b>	<b>100.00</b>	<b>12671384</b>	<b>100.00</b>

### Padrão 1-feniletanol (21a)

Page 1 of 1

#### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira Resultados\padrao 1-feniletanol.rsl\padrao 1-feniletanol.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Method\Novos metodos\teste.AF39min.met  
 Acquired: 4/2/2019 4:16:01 AM (GMT -03:00)  
 Printed: 4/2/2019 5:29:24 AM (GMT -03:00)



#### Back Signal Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
18.211	6332265	49.54	583429	49.75
18.698	6450850	50.46	589219	50.25
<b>Totals</b>	<b>12783115</b>	<b>100.00</b>	<b>1172648</b>	<b>100.00</b>

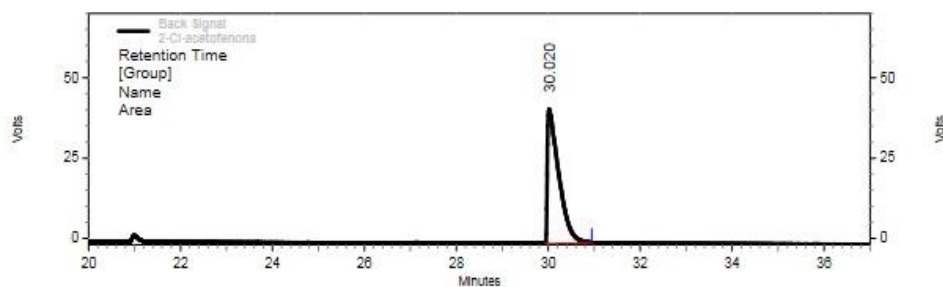


## Padrão 2-cloro-acetofenona (22)

Page 1 of 1

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\2-Cl-acetofenona  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Method\Novos metodos\PADRAO 14 FENIL E ACETOFENONA.met  
 Acquired: 11/20/2018 6:40:06 PM (GMT -03:00)  
 Printed: 12/10/2019 2:56:28 PM (GMT -03:00)



#### Back Signal Results

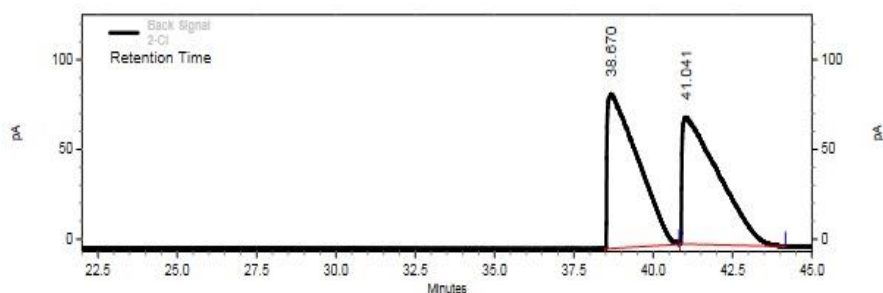
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
30.020	5558853	100.00	321521	100.00
<b>Totals</b>	<b>5558853</b>	<b>100.00</b>	<b>321521</b>	<b>100.00</b>

## Padrão 2-cloro-1-feniletanol (22a)

Page 1 of 1

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\2-Cl.rst\2-Cl  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaques REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\PADRAO 13 PARA O METOXI.met  
 Acquired: 11/12/2018 2:11:27 PM (GMT -08:00)  
 Printed: 11/12/2018 3:27:11 PM (GMT -08:00)



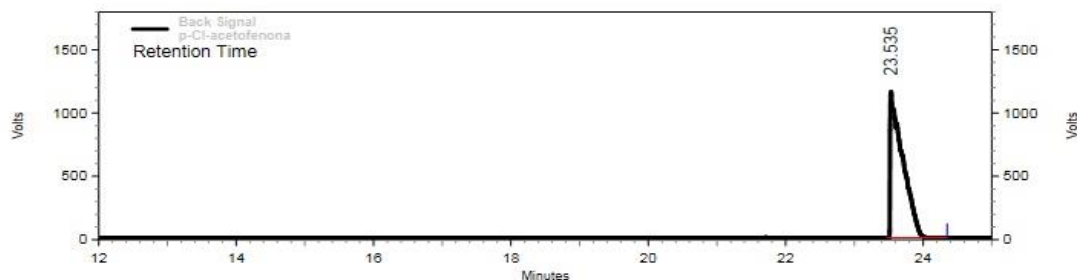
#### Back Signal Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
38.670	43932889	50.42	660969	54.90
41.041	43204615	49.58	542883	45.10
<b>Totals</b>	<b>87137504</b>	<b>100.00</b>	<b>1203852</b>	<b>100.00</b>

## Padrão 4'-cloro-acetofenona (23)

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\p-Cl-acetofenona.rslt\p-Cl-acetofenona.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\metodo teste 301018\teste de 15min\teste.AF39min.met  
 Acquired: 11/1/2018 1:58:31 PM (GMT -08:00)  
 Printed: 11/1/2018 3:35:11 PM (GMT -08:00)



### Back Signal Results

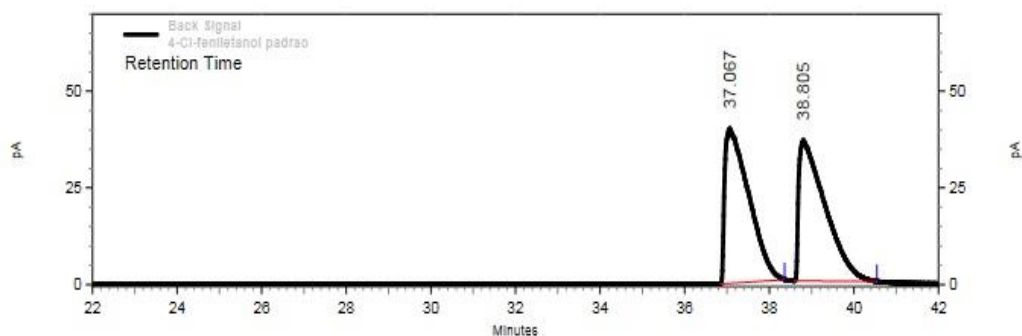
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
23.535	111607203	100.00	8857893	100.00
<b>Totals</b>	<b>111607203</b>	<b>100.00</b>	<b>8857893</b>	<b>100.00</b>

## Padrão 4'-cloro-1-feniletanol (23a)

Page 1 of 1

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\4-Cl-feniletanol padrao.rslt\4-Cl-feniletanol padrao.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\PADRAO 13 PARA O METOXI.met  
 Acquired: 11/12/2018 3:30:31 PM (GMT -08:00)  
 Printed: 11/12/2018 4:23:54 PM (GMT -08:00)



### Back Signal Results

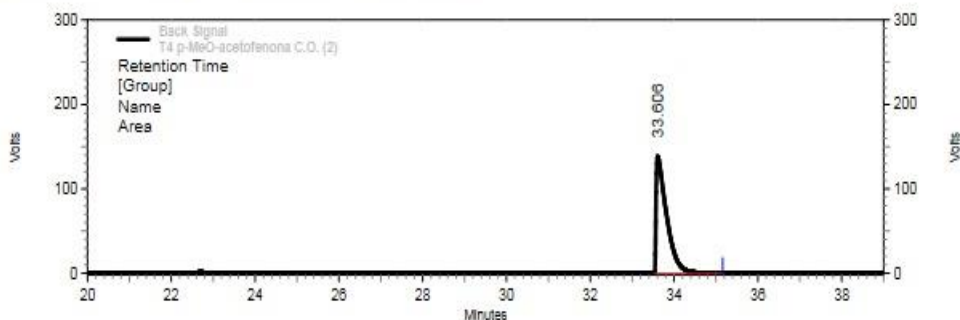
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
37.067	12140597	50.06	307597	52.38
38.805	12113455	49.94	279670	47.62
<b>Totals</b>	<b>24254052</b>	<b>100.00</b>	<b>587267</b>	<b>100.00</b>

## Padrão 4'-metóxi-acetofenona (24)

Page 1 of 1

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4  
 p-MeO-acetofenona  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Method\Novos metodos\PADRAO 14 FENIL E ACETOFENONA.met  
 Acquired: 10/19/2018 6:01:32 PM (GMT -03:00)  
 Printed: 12/10/2019 3:02:25 PM (GMT -03:00)



### Back Signal

#### Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
33.606	18722444	100.00	1066011	100.00

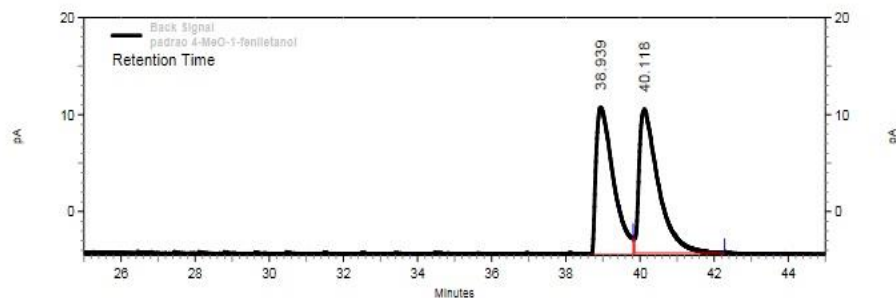
Totals	Area	Area %	Height	Height %
	18722444	100.00	1066011	100.00

## Padrão 4'-metóxi-1-feniletanol (24a)

Page 1 of 1

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\padrao  
 4-MeO-1-feniletanol.rslt\padrao 4-MeO-1-feniletanol.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Metodo\PADRAO 13 PARA O METOXI.met  
 Acquired: 4/3/2019 1:03:09 AM (GMT -03:00)  
 Printed: 4/3/2019 2:22:26 AM (GMT -03:00)



### Back Signal

#### Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
38.939	3809484	48.05	116530	50.57
40.118	4119015	51.95	113913	49.43

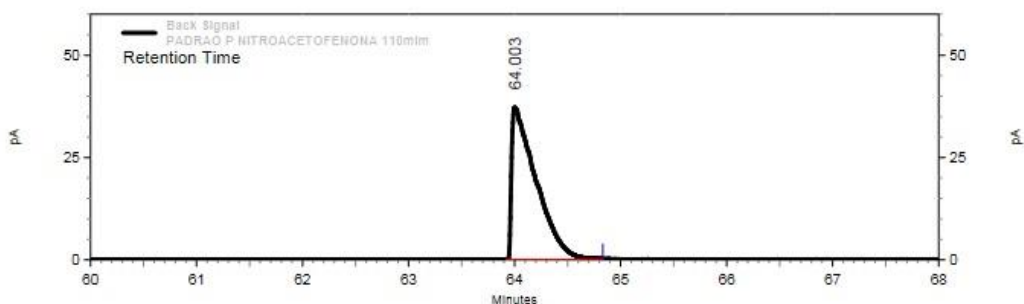
Totals	Area	Area %	Height	Height %
	7928499	100.00	230443	100.00

## Padrão 4'-nitro-acetofenona (25)

Page 1 of 1

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\PADRAO P NITROFENILETANOL.rslt\PADRAO P NITROACETOFENONA 110mim CETONA.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\PADRAO 14 FENIL E ACETOFENONA.met  
 Acquired: 7/20/2018 11:48:50 AM (GMT -08:00)  
 Printed: 10/16/2018 1:24:56 PM (GMT -08:00)



### Back Signal Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
64.003	4567507	100.00	285515	100.00

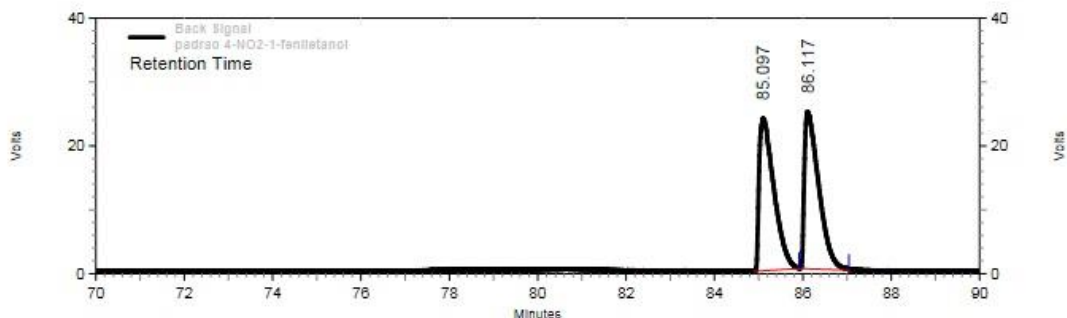
Totals	Area	Area %	Height	Height %
	4567507	100.00	285515	100.00

## Padrão 4'-nitro-1-feniletanol (25a)

Page 1 of 1

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\padrao 4-NO2-1-feniletanol.rslt\padrao 4-NO2-1-feniletanol.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Method\Novos metodos\teste.AF39min.met  
 Acquired: 4/3/2019 3:25:09 AM (GMT -03:00)  
 Printed: 4/4/2019 4:58:18 AM (GMT -03:00)



### Back Signal Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
85.097	4250295	49.85	183492	49.31
86.117	4276058	50.15	188653	50.69

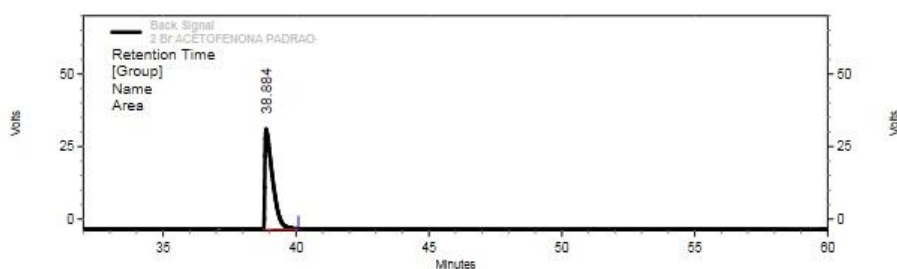
Totals	Area	Area %	Height	Height %
	8526353	100.00	372145	100.00

## Padrão 2-bromo-acetofenona (26)

Page 1 of 1

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\2 Br  
 ACETOFENONA PADRAO  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Method\Novos metodos\PADRAO 14 FENIL E ACETOFENONA.met  
 Acquired: 10/15/2019 11:06:43 AM (GMT -03:00)  
 Printed: 12/10/2019 2:43:23 PM (GMT -03:00)



### Back Signal

#### Results

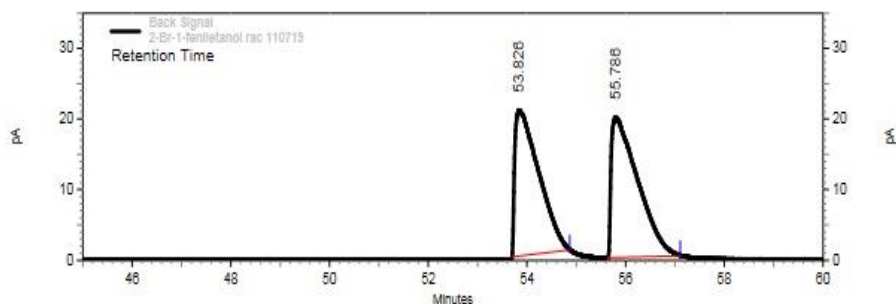
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
38.884	5310409	100.00	264660	100.00
Totals	5310409	100.00	264660	100.00

## Padrão 2-bromo-1-feniletanol (26a)

Page 1 of 1

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\2-Br-1-feniletanol rac  
 110719.rslt 2-Br-1-feniletanol rac 110719.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Metodos\PADRAO 14 FENIL E  
 ACETOFENONA.met  
 Acquired: 7/11/2019 11:39:43 PM (GMT -03:00)  
 Printed: 7/12/2019 1:00:48 AM (GMT -03:00)



### Back Signal

#### Results

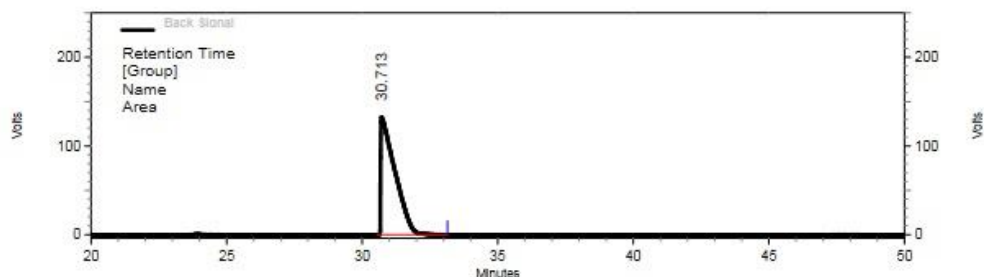
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
53.826	5352814	48.52	158786	50.98
55.786	5678896	51.48	152701	49.02
Totals	11031710	100.00	311487	100.00

## Padrão 4'-bromo-acetofenona (27)

Page 1 of 1

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\4-Br  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Method\Novos metodos\PADRAO 14 FENIL E ACETOFENONA.met  
 Acquired: 10/4/2019 1:56:41 PM (GMT -03:00)  
 Printed: 12/10/2019 2:48:15 PM (GMT -03:00)



### Back Signal

#### Results

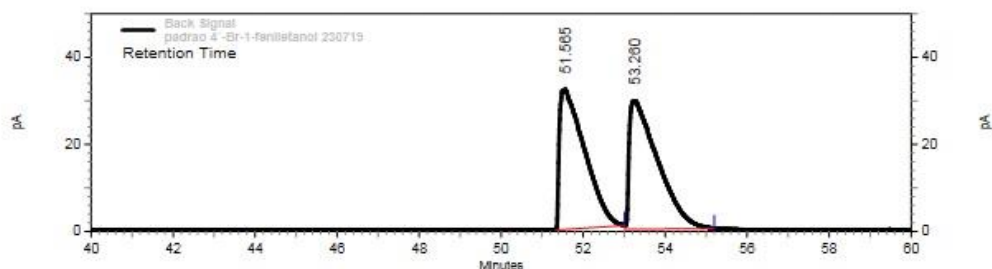
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
30.713	37007020	100.00	1019188	100.00
<b>Totals</b>	<b>37007020</b>	<b>100.00</b>	<b>1019188</b>	<b>100.00</b>

## Padrão 4'-bromo-1-feniletanol (27a)

Page 1 of 1

### Area % Report

Data File: C:\ProgramData\ChromatographySystem\Recovery  
 Data InstClient\_ON.46.9453EB58-A087-4117-B826-FDDB88E7E38B\padrao 4'-Br-1-feniletanol 230719  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaqueline REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\PADRAO 13 PARA O METOXI.met  
 Acquired: 7/24/2019 1:51:30 AM (GMT -03:00)  
 Printed: 7/24/2019 3:00:39 AM (GMT -03:00)



### Back Signal

#### Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
51.565	10564696	49.16	247518	52.15
53.260	10923555	50.84	227089	47.85
<b>Totals</b>	<b>21488251</b>	<b>100.00</b>	<b>474607</b>	<b>100.00</b>

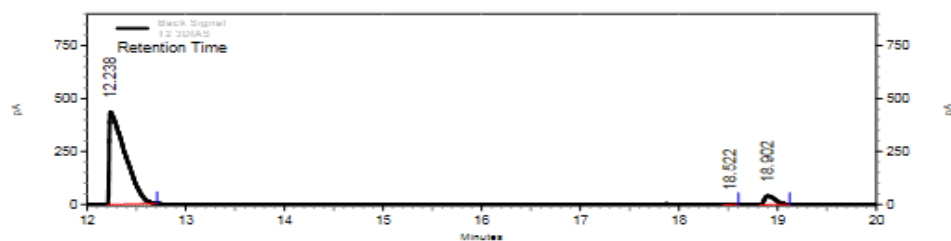
## Apêndice E - Cromatogramas das biorreduções por fungos endófitos

### Biotransformação da acetofenona (21) pelo endófito H2

Page 1 of 1

#### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Resultados\T2 T4 T5 e T7.1 3dias\T2 3DIAS.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\PADRAO 14 FENIL E ACETOFENONA.met  
 Acquired: 2/6/2018 12:08:09 PM (GMT -08:00)  
 Printed: 10/3/2018 10:23:07 AM (GMT -08:00)



#### Back Signal Results

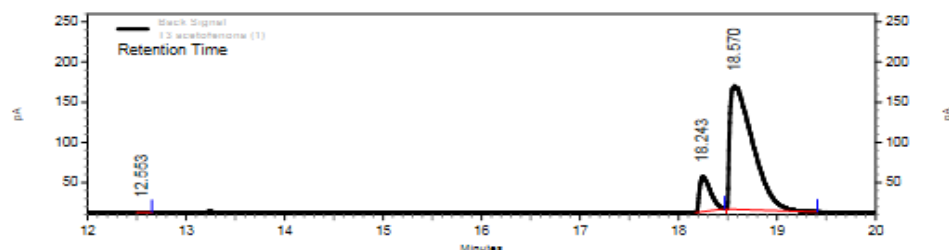
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.238	37739307	93.71	3363300	90.75
18.522	127704	0.32	25598	0.69
18.902	2403533	5.97	317307	8.56
Totals	40270544	100.00	3706205	100.00

### Biotransformação da acetofenona (21) pelo endófito H3

Page 1 of 1

#### Area % Report

Data File: C:\ProgramData\ChromatographySystem\Recovery  
 Data\InstClient\_ON.46\166FC406-EA4E-4F9F-B334-B90EB9EA871D\T3 acetofenona (1).dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\PADRAO 14 FENIL E ACETOFENONA.met  
 Acquired: 10/1/2018 5:04:18 PM (GMT -08:00)  
 Printed: 10/1/2018 5:49:14 PM (GMT -08:00)



#### Back Signal Results

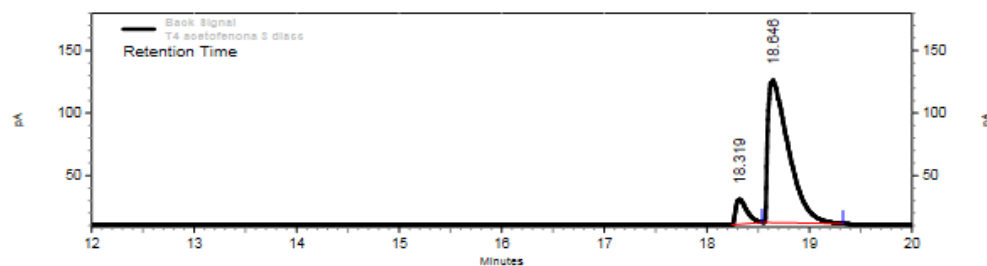
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.553	9563	0.04	2036	0.13
18.243	2581569	11.88	334395	22.03
18.570	19143482	88.08	1181442	77.84
Totals	21734614	100.00	1517873	100.00

## Biotransformação da acetofenona (21) pelo endófito H4

Page 1 of 1

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 acetofenona 3 diass.rslt\T4 acetofenona 3 diass.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\PADRAO 14 FENIL E ACETOFENOÑA.met  
 Acquired: 9/12/2018 11:25:42 AM (GMT -08:00)  
 Printed: 9/12/2018 12:03:52 PM (GMT -08:00)



### Back Signal Results

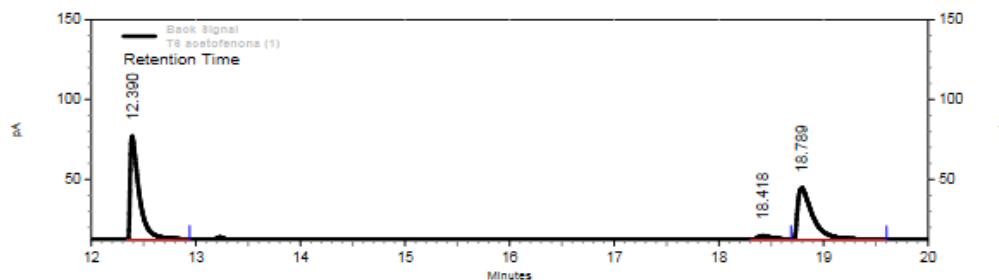
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
18.319	1145815	8.56	152575	14.84
18.646	12245560	91.44	875633	85.16
<b>Totals</b>	<b>13391375</b>	<b>100.00</b>	<b>1028208</b>	<b>100.00</b>

## Biotransformação da acetofenona (21) pelo endófito H6

Page 1 of 1

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Resultados\T6 acetofenona (1).rslt\T6 acetofenona (1).dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\PADRAO 14 FENIL E ACETOFENOÑA.met  
 Acquired: 10/2/2018 9:23:47 AM (GMT -08:00)  
 Printed: 10/2/2018 10:07:37 AM (GMT -08:00)



### Back Signal Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.390	2961308	52.98	496835	65.29
18.418	167589	3.00	18602	2.44
18.789	2460247	44.02	245486	32.26
<b>Totals</b>	<b>5589144</b>	<b>100.00</b>	<b>760923</b>	<b>100.00</b>

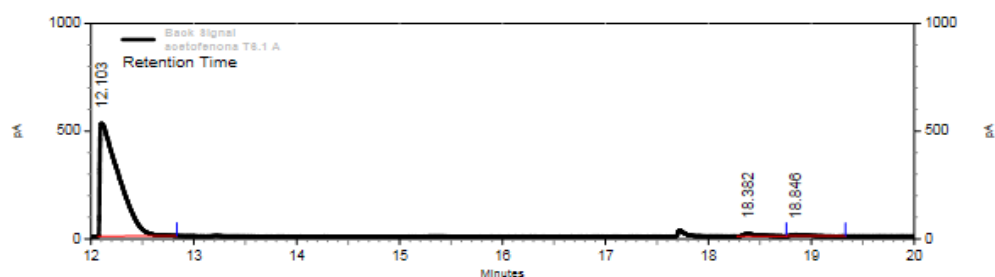


## Biotransformação da acetofenona (21) pelo endófito H6.1

Page 1 of 1

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\acetofenona T6.1  
 A.rslt\acetofenona T6.1 A.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\PADRAO 14 FENIL E ACETOFENONA.met  
 Acquired: 10/2/2018 11:43:11 AM (GMT -08:00)  
 Printed: 10/2/2018 1:08:20 PM (GMT -08:00)



### Back Signal Results

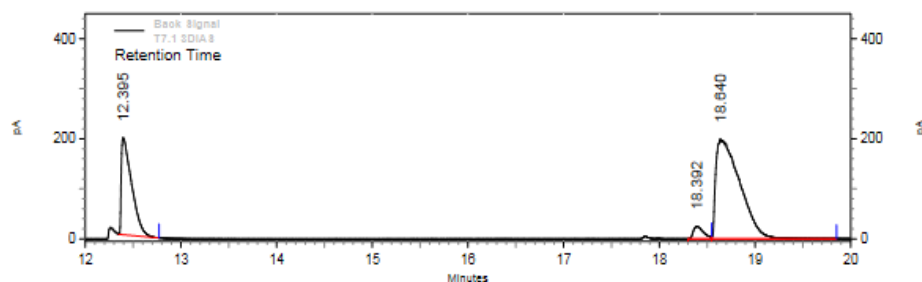
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.103	51440190	97.78	4010525	96.73
18.382	712177	1.35	80402	1.94
18.846	455629	0.87	55136	1.33
<b>Totals</b>	<b>52607996</b>	<b>100.00</b>	<b>4146063</b>	<b>100.00</b>

## Biotransformação da acetofenona (21) pelo endófito H7.1

Page 1 of 1

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Result\ELIANE\AMOSTRAS EM 6.2.18\SYSTEM.rslt\T7.1 3DIAS.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\TESTE BENZOIL E ISOFORONA (2).met  
 Acquired: 2/6/2018 2:15:40 PM (GMT -08:00)  
 Printed: 7/23/2018 12:53:37 PM (GMT -08:00)



### Back Signal Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.395	11259435	28.62	1484495	46.30
18.392	1405935	3.57	192056	5.99
18.640	26677103	67.81	1529597	47.71
<b>Totals</b>	<b>39342473</b>	<b>100.00</b>	<b>3206148</b>	<b>100.00</b>

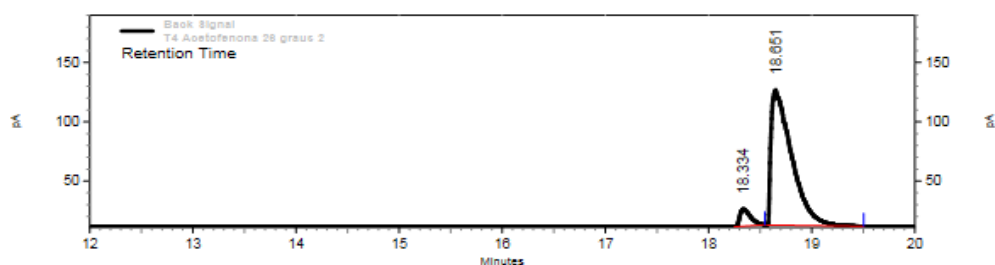
## Apêndice F: Cromatogramas da otimização da biotransformação da acetofenona pelo endófito *Talaromyces purpurogenus* H4

- Parâmetro – Temperatura: 26°C

Page 1 of 1

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 Acetofenona 26 graus 2.rslt\T4 Acetofenona 26 graus 2.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17 mestrado\PADRAO 14 FENIL E ACETOFENONA.met  
 Acquired: 9/14/2018 3:04:35 PM (GMT -08:00)  
 Printed: 9/14/2018 3:46:54 PM (GMT -08:00)



### Back Signal Results

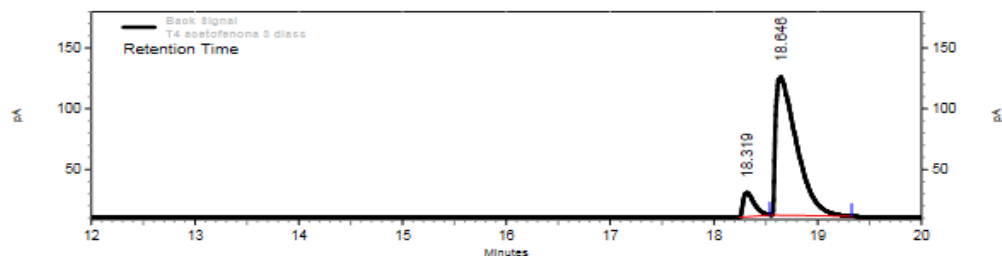
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
18.334	799944	6.21	111439	11.29
18.651	12079966	93.79	875385	88.71
Totals	12879910	100.00	986824	100.00

Parâmetro – Temperatura: 28°C

Page 1 of 1

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 acetofenona 3 diass.rslt\T4 acetofenona 3 diass.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17 mestrado\PADRAO 14 FENIL E ACETOFENONA.met  
 Acquired: 9/12/2018 11:25:42 AM (GMT -08:00)  
 Printed: 9/12/2018 12:03:52 PM (GMT -08:00)



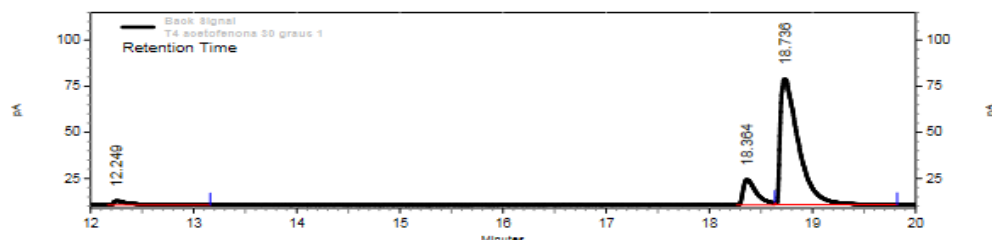
### Back Signal Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
18.319	1145815	8.56	152575	14.84
18.646	12245560	91.44	875633	85.16
Totals	13391375	100.00	1028208	100.00

Parâmetro – Temperatura: 30°C

**Area % Report**

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Resultados\T4 acetofenona 30 graus 1.rslt\T4 acetofenona 30 graus 1.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\PADRAO 14 FENIL E ACETOFENONA.met  
 Acquired: 9/12/2018 9:41:14 AM (GMT -08:00)  
 Printed: 9/12/2018 10:26:39 AM (GMT -08:00)



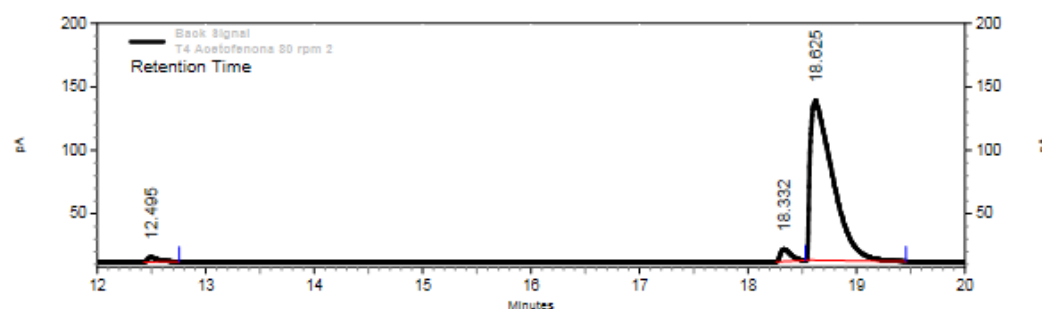
**Back Signal Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.249	223177	2.94	17460	2.70
18.364	962141	12.66	105692	16.32
18.736	6415648	84.41	524442	80.98
<b>Totals</b>	<b>7600966</b>	<b>100.00</b>	<b>647594</b>	<b>100.00</b>

Parâmetro – agitação: 80 rpm

**Area % Report**

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 Acetofenona 80 rpm 2.rslt\T4 Acetofenona 80 rpm 2.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\MT\LIMPEZA DA COLUNA COM SOLVENTE.met  
 Acquired: 9/4/2018 1:59:13 PM (GMT -08:00)  
 Printed: 9/4/2018 3:13:04 PM (GMT -08:00)



**Back Signal Results**

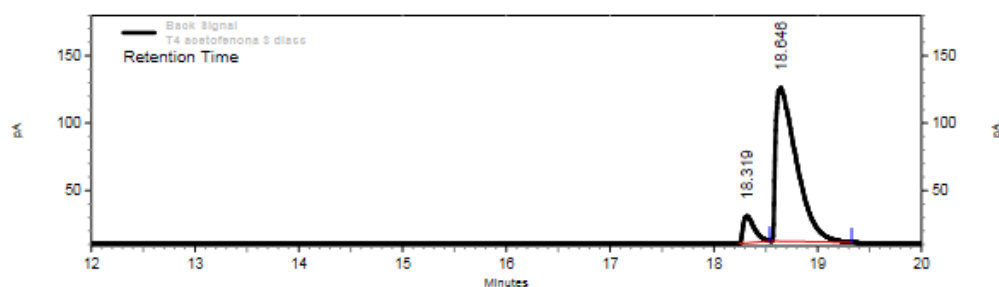
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.495	196448	1.34	28543	2.66
18.332	499241	3.41	74666	6.97
18.625	13932466	95.24	968568	90.37
<b>Totals</b>	<b>14628155</b>	<b>100.00</b>	<b>1071777</b>	<b>100.00</b>

Parâmetro – agitação: 120 rpm

Page 1 of 1

**Area % Report**

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 acetofenona 3 diass.rslt\T4 acetofenona 3 diass.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17 mestrado\PADRAO 14 FENIL E ACETOFENONA.met  
 Acquired: 9/12/2018 11:25:42 AM (GMT -08:00)  
 Printed: 9/12/2018 12:03:52 PM (GMT -08:00)



**Back Signal Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
18.319	1145815	8.56	152575	14.84
18.646	12245560	91.44	875633	85.16

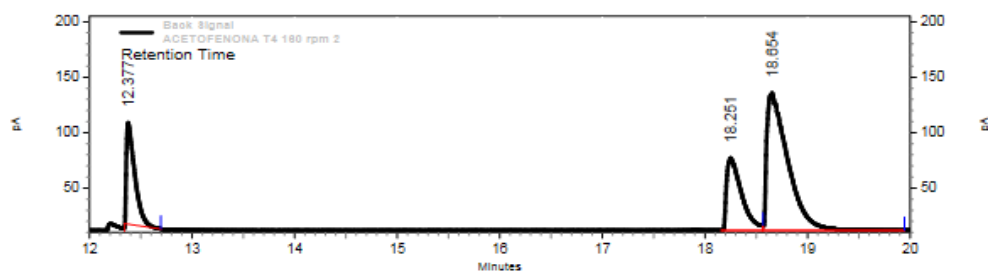
Totals	Area	Area %	Height	Height %
	13391375	100.00	1028208	100.00

Parâmetro – agitação: 160 rpm

Page 1 of 1

**Area % Report**

Data File: C:\Enterprise\Projects\Result\ELIANE\ACETOFENONA T4 160 rpm 2.rslt\ACETOFENONA T4 160 rpm 2.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17 mestrado\TESTE PARA O ACETOACETATO DE ETILA E METILA 5.met  
 Acquired: 7/23/2018 2:37:48 PM (GMT -08:00)  
 Printed: 8/24/2018 10:18:44 AM (GMT -08:00)



**Back Signal Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.377	3981600	17.66	703035	32.59
18.251	5068698	22.48	501899	23.27
18.654	13499173	59.86	952368	44.15

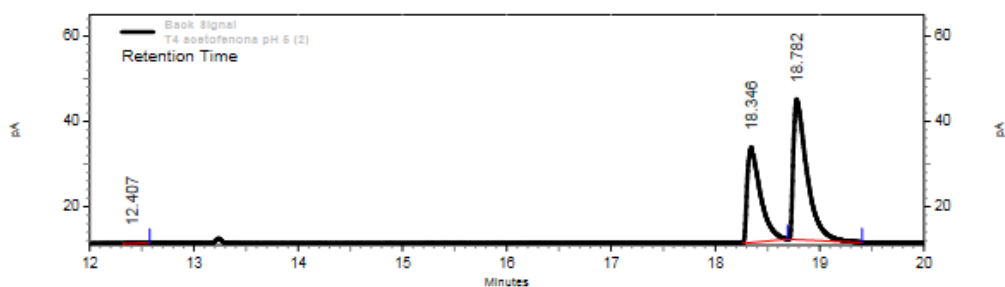
Totals	Area	Area %	Height	Height %
	22549471	100.00	2157302	100.00

## Parâmetro – pH 5,0

Page 1 of 1

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 acetofenona pH 5 (2).rslt\T4 acetofenona pH 5 (2).dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\PADRAO 14 FENIL E ACETOFENONA.met  
 Acquired: 9/24/2018 3:20:24 PM (GMT -08:00)  
 Printed: 9/24/2018 4:01:58 PM (GMT -08:00)



#### Back Signal Results

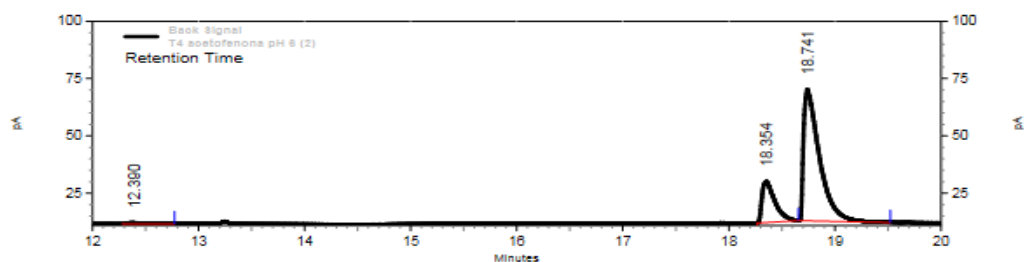
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.407	14577	0.38	2065	0.48
18.346	1509801	39.47	171976	40.30
18.782	2300676	60.15	252652	59.21
<b>Totals</b>	<b>3825054</b>	<b>100.00</b>	<b>426693</b>	<b>100.00</b>

## Parâmetro – pH 6,0

Page 1 of 1

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 acetofenona pH 6 (2).rslt\T4 acetofenona pH 6 (2).dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\PADRAO 14 FENIL E ACETOFENONA.met  
 Acquired: 9/24/2018 4:04:34 PM (GMT -08:00)  
 Printed: 9/24/2018 4:47:31 PM (GMT -08:00)



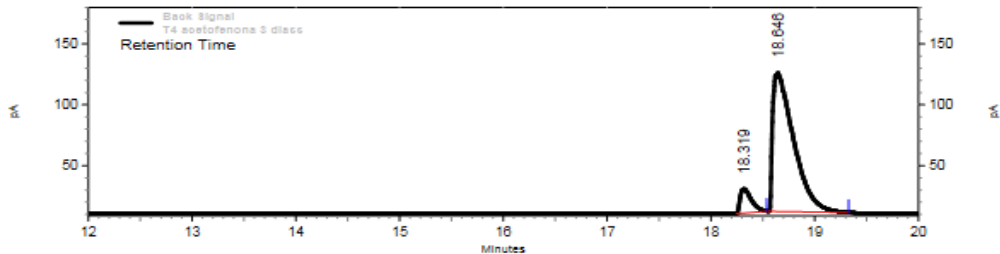
#### Back Signal Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.390	62709	1.08	4886	0.84
18.354	1159596	19.99	137885	23.62
18.741	4578849	78.93	441060	75.55
<b>Totals</b>	<b>5801154</b>	<b>100.00</b>	<b>583831</b>	<b>100.00</b>

## Parâmetro – pH 7,0

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 acetofenona 3 dias.rsl\T4 acetofenona 3 dias.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaqure REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\PADRAO 14 FENIL E ACETOFENOÑA.met  
 Acquired: 9/12/2018 11:25:42 AM (GMT -08:00)  
 Printed: 9/12/2018 12:03:52 PM (GMT -08:00)



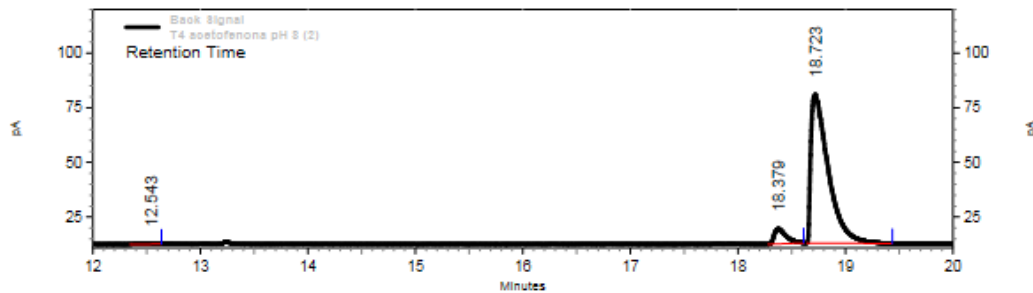
#### Back Signal Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
18.319	1145815	8.56	152575	14.84
18.646	12245560	91.44	875633	85.16
Totals	13391375	100.00	1028208	100.00

Parâmetro – pH 8,0

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 acetofenona pH 8 (2).rsl\T4 acetofenona pH 8 (2).dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaqure REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\PADRAO 14 FENIL E ACETOFENOÑA.met  
 Acquired: 9/24/2018 4:49:57 PM (GMT -08:00)  
 Printed: 9/24/2018 5:31:58 PM (GMT -08:00)



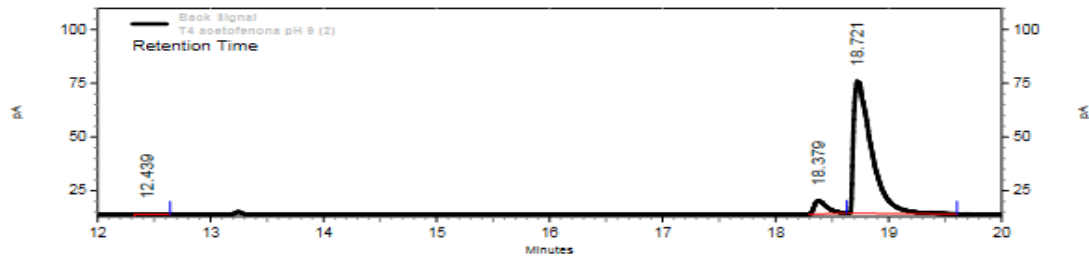
#### Back Signal Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.543	16253	0.26	1374	0.24
18.379	408650	6.48	53659	9.30
18.723	5877530	93.26	521749	90.46
Totals	6302433	100.00	576782	100.00

Parâmetro – pH 9,0

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 acetofenona pH 9 (2).rsl\T4 acetofenona pH 9 (2).dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17 mestrado\PADRAO 14 FENIL E ACETOFENONA.met  
 Acquired: 9/24/2018 5:33:00 PM (GMT -08:00)  
 Printed: 9/24/2018 6:15:31 PM (GMT -08:00)



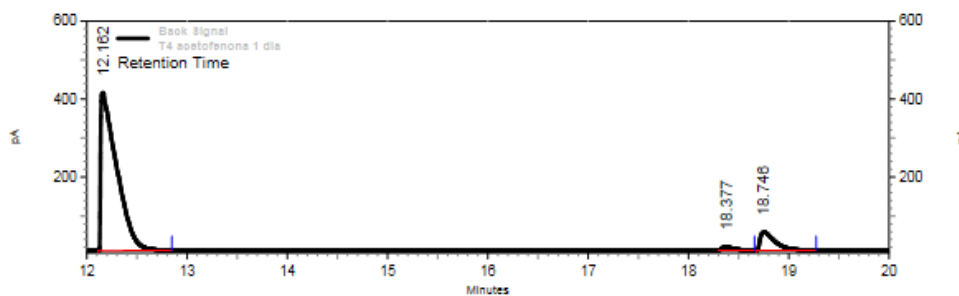
#### Back Signal Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.439	27033	0.48	2572	0.49
18.379	372751	6.68	48036	9.18
18.721	5184032	92.84	472876	90.33
<b>Totals</b>	<b>5583816</b>	<b>100.00</b>	<b>523484</b>	<b>100.00</b>

Parâmetro – Tempo: 1 dia

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 acetofenona 1 dia.rsl\T4 acetofenona 1 dia.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17 mestrado\PADRAO 14 FENIL E ACETOFENONA.met  
 Acquired: 9/12/2018 1:15:58 PM (GMT -08:00)  
 Printed: 9/12/2018 2:00:33 PM (GMT -08:00)



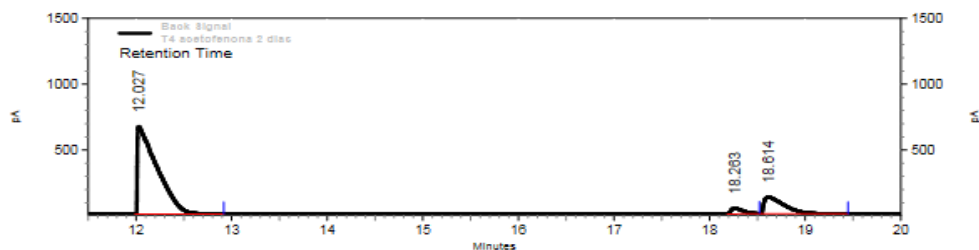
#### Back Signal Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.162	34420296	88.92	3106795	87.94
18.377	594347	1.54	71796	2.03
18.746	3695000	9.55	354252	10.03
<b>Totals</b>	<b>38709643</b>	<b>100.00</b>	<b>3532843</b>	<b>100.00</b>

Parâmetro – Tempo: 2 dias

**Area % Report**

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 acetofenona 2 dias.rsl\T4 acetofenona 2 dias.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\MTLIMPEZA DA COLUNA COM SOLVENTE.met  
 Acquired: 9/4/2018 4:11:28 PM (GMT -08:00)  
 Printed: 9/4/2018 5:04:14 PM (GMT -08:00)

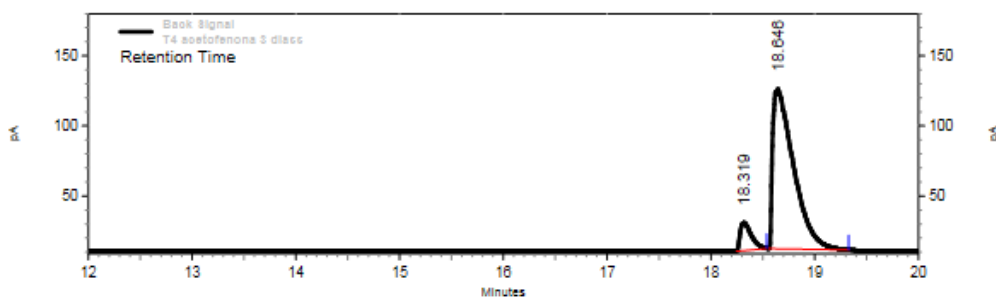
**Back Signal****Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.027	73168821	81.44	5107734	79.76
18.263	2761048	3.07	328129	5.12
18.614	13917306	15.49	967986	15.12
<b>Totals</b>	<b>89847175</b>	<b>100.00</b>	<b>6403849</b>	<b>100.00</b>

Parâmetro – Tempo: 3 dias

**Area % Report**

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 acetofenona 3 dias.rsl\T4 acetofenona 3 dias.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\PADRAO 14 FENIL E ACETOFENOÑA.met  
 Acquired: 9/12/2018 11:25:42 AM (GMT -08:00)  
 Printed: 9/12/2018 12:03:52 PM (GMT -08:00)

**Back Signal****Results**

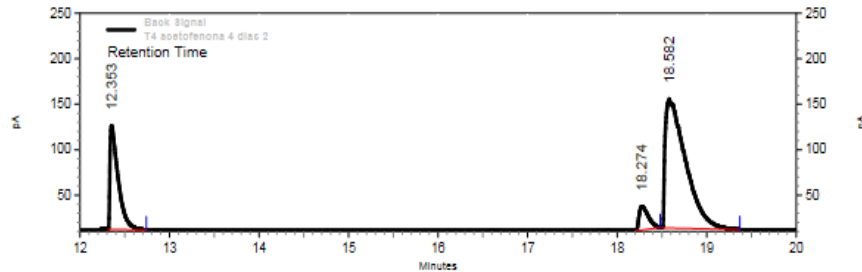
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
18.319	1145815	8.56	152575	14.84
18.646	12245560	91.44	875633	85.16
<b>Totals</b>	<b>13391375</b>	<b>100.00</b>	<b>1028208</b>	<b>100.00</b>

Parâmetro – Tempo: 4 dias



## Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Resultados\T4 acetofenona 4 dias 2.rslt\T4 acetofenona 4 dias 2.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\TESTE PARA O ACETOACETATO DE ETILA E METILA 5.met  
 Acquired: 9/6/2018 9:45:01 AM (GMT -08:00)  
 Printed: 9/6/2018 10:28:55 AM (GMT -08:00)



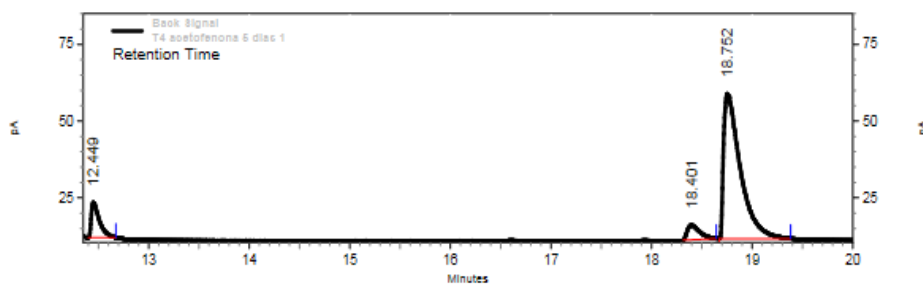
## Back Signal Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.353	5587248	23.04	875948	40.49
18.274	1440019	5.94	197519	9.13
18.582	17224012	71.02	1090008	50.38
Totals	24251279	100.00	2163475	100.00

Parâmetro – Tempo: 5 dias

## Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Resultados\T4 acetofenona 5 dias 1.rslt\T4 acetofenona 5 dias 1.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\TESTE PARA O ACETOACETATO DE ETILA E METILA 5.met  
 Acquired: 9/6/2018 8:53:12 AM (GMT -08:00)  
 Printed: 9/6/2018 9:38:28 AM (GMT -08:00)



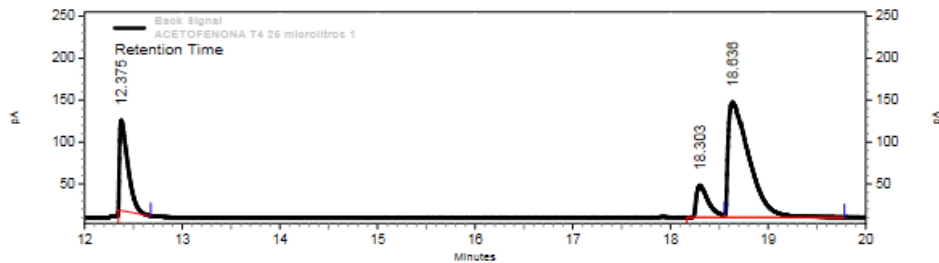
## Back Signal Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.449	501306	9.98	87924	18.04
18.401	317453	6.32	36667	7.52
18.752	4202236	83.69	362882	74.44
Totals	5020995	100.00	487473	100.00

Parâmetro – quantidade de substrato: 0,22 mmol

## Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Result\ELIANE\ACETOFENONA T4 25 microlitros  
 1.rsl\ACETOFENONA T4 25 microlitros 1.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaques REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\TESTE PARA O ACETOACETATO DE ETILA E METILA 5.met  
 Acquired: 7/23/2018 12:00:01 PM (GMT -08:00)  
 Printed: 8/23/2018 5:03:03 PM (GMT -08:00)

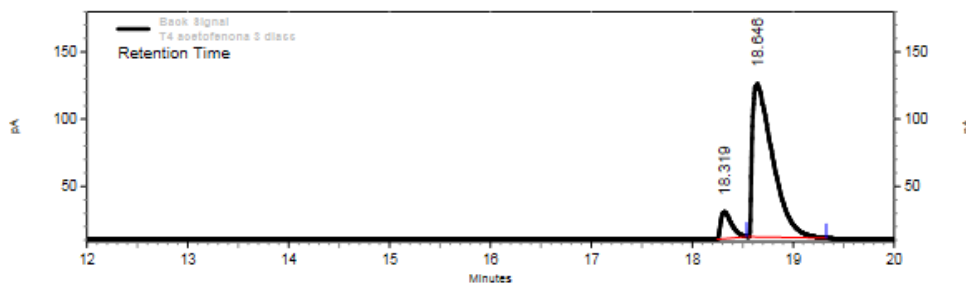
Back Signal  
Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.375	4895874	21.33	826650	38.06
18.303	2478537	10.80	291468	13.42
18.636	15583344	67.88	1053647	48.52
Totals	22957755	100.00	2171765	100.00

Parâmetro – quantidade de substrato: 0,44 mmol

## Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 acetofenona 3  
 diass.rsl\T4 acetofenona 3 diass.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaques REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\PADRAO 14 FENIL E ACETOFENONA.met  
 Acquired: 9/12/2018 11:25:42 AM (GMT -08:00)  
 Printed: 9/12/2018 12:03:52 PM (GMT -08:00)

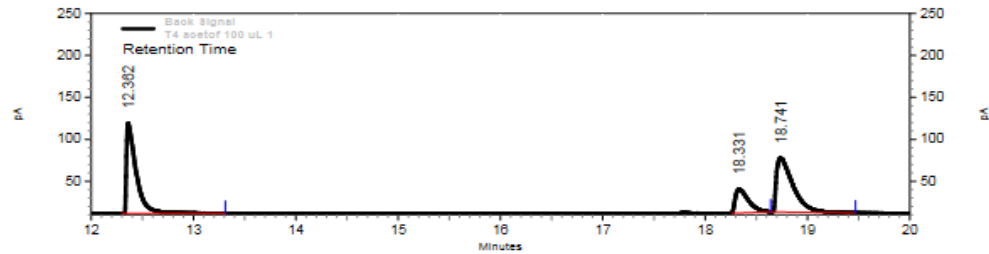
Back Signal  
Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
18.319	1145815	8.56	152575	14.84
18.646	12245560	91.44	875633	85.16
Totals	13391375	100.00	1028208	100.00

Parâmetro – quantidade de substrato: 0,88 mmol

## Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 acetof 100 uL 1.rslt\T4 acetof 100 uL 1.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\MT\LIMPEZA DA COLUNA COM SOLVENTE.met  
 Acquired: 9/4/2018 11:05:23 AM (GMT -08:00)  
 Printed: 9/4/2018 11:49:17 AM (GMT -08:00)



## Back Signal Results

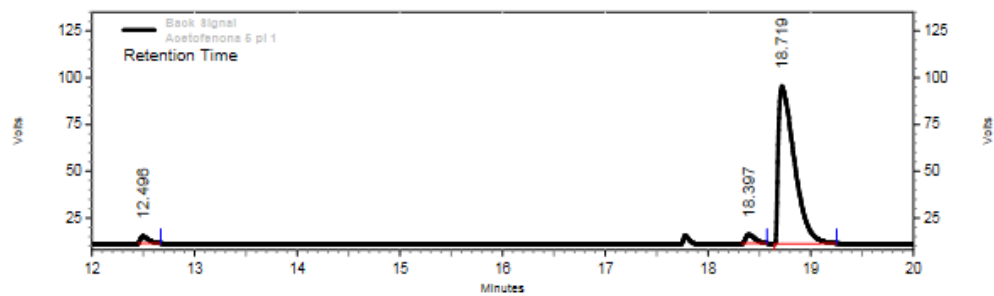
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.362	5358252	41.77	826958	53.67
18.331	1931254	15.06	218938	14.21
18.741	5537988	43.17	494906	32.12

Totals	Area	Area %	Height	Height %
	12827494	100.00	1540802	100.00

Parâmetro – quantidade de fungo: 266 mg

## Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\Acetofenona 5 pl 1.rslt\Acetofenona 5 pl 1.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Metodo\ACETOFENONA 14-05-18.met  
 Acquired: 8/6/2018 1:49:38 PM (GMT -08:00)  
 Printed: 8/23/2018 4:45:17 PM (GMT -08:00)



## Back Signal Results

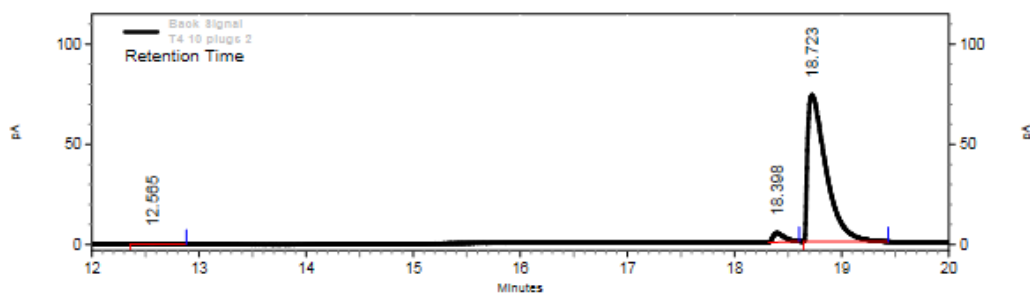
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.496	158565	2.14	29209	4.09
18.397	233751	3.15	36969	5.18
18.719	7017951	94.71	647477	90.73

Totals	Area	Area %	Height	Height %
	7410267	100.00	713655	100.00

Parâmetro – quantidade de fungo: 510 mg

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 10 plugs 2.rsl\T4 10 plugs 2.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaqueline REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\TESTE PARA O ACETOACETATO DE ETILA E METILA 5.met  
 Acquired: 8/22/2018 3:10:20 PM (GMT -08:00)  
 Printed: 8/23/2018 4:39:40 PM (GMT -08:00)



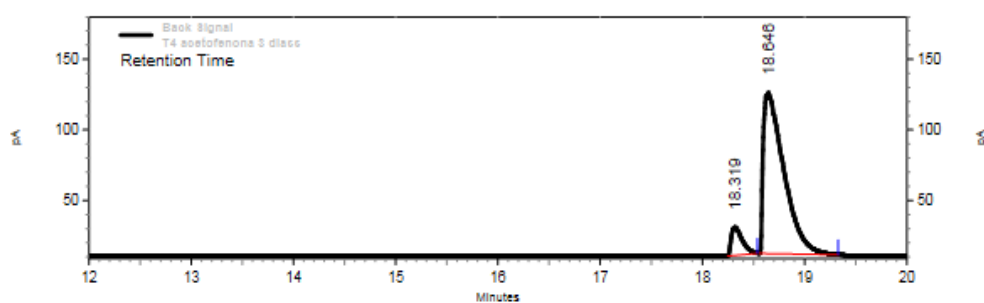
#### Back Signal Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.565	49655	0.70	3562	0.59
18.398	261749	3.71	36015	5.98
18.723	6743666	95.59	562682	93.43

Parâmetro – quantidade de fungo: 781 mg

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 acetofenona 3 diass.rsl\T4 acetofenona 3 diass.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaqueline REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\PADRAO 14 FENIL E ACETOFENOÑA.met  
 Acquired: 9/12/2018 11:25:42 AM (GMT -08:00)  
 Printed: 9/12/2018 12:03:52 PM (GMT -08:00)



#### Back Signal Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
18.319	1145815	8.56	152575	14.84
18.646	12245560	91.44	875633	85.16

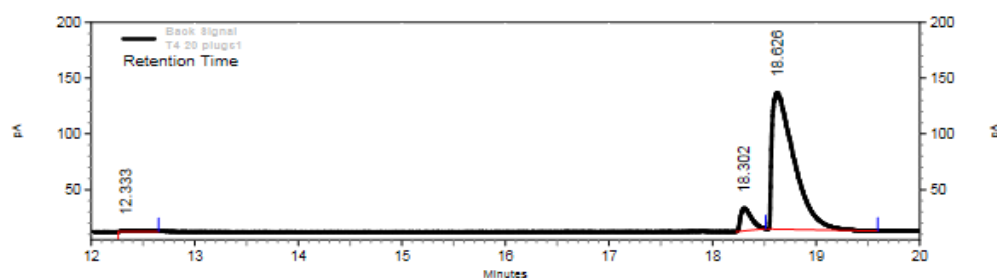
Totals	Area	Area %	Height	Height %
	13391375	100.00	1028208	100.00

Parâmetro – quantidade de fungo: 1175 mg

Page 1 of 1

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 20 plugs1.rsl\T4 20 plugs1.dat  
Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
mestrado\TESTE PARA O ACETOACETATO DE ETILA E METILA 5.met  
Acquired: 8/23/2018 5:18:46 PM (GMT -08:00)  
Printed: 8/23/2018 6:04:52 PM (GMT -08:00)



### Back Signal Results

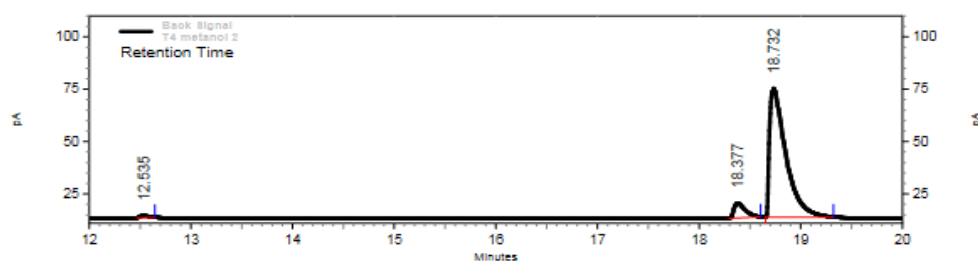
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.333	62966	0.41	5279	0.48
18.302	1146301	7.54	155931	14.16
18.626	13995469	92.05	940344	85.37
Totals	15204736	100.00	1101554	100.00

Parâmetro – co-solvente: Metanol

Page 1 of 1

### Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 metanol 2.rsl\T4 metanol 2.dat  
Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
mestrado\TESTE PARA O ACETOACETATO DE ETILA E METILA 5.met  
Acquired: 8/23/2018 3:41:23 PM (GMT -08:00)  
Printed: 8/23/2018 4:25:18 PM (GMT -08:00)



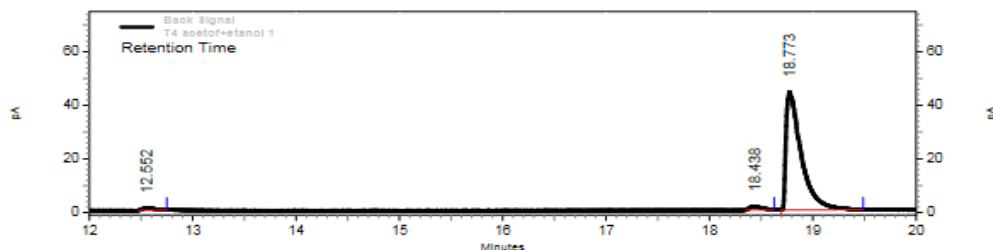
### Back Signal Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.535	51267	0.89	8780	1.64
18.377	421563	7.34	55052	10.26
18.732	5270361	91.77	472559	88.10
Totals	5743191	100.00	536391	100.00

Parâmetro – co-solvente: Etanol

## Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 acetof+etanol 1.rsl\T4 acetof+etanol 1.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\TESTE PARA O ACETOACETATO DE ETILA E METILA 5.met  
 Acquired: 8/22/2018 4:42:19 PM (GMT -08:00)  
 Printed: 8/23/2018 3:58:24 PM (GMT -08:00)

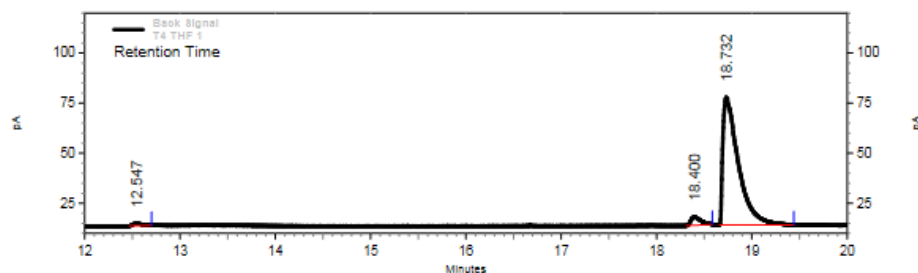
Back Signal  
Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.552	55070	1.53	7251	2.03
18.438	83002	2.31	10933	3.07
18.773	3459105	96.16	338396	94.90
<b>Totals</b>	<b>3597177</b>	<b>100.00</b>	<b>356580</b>	<b>100.00</b>

Parâmetro – co-solvente: THF

## Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 THF 1.rsl\T4 THF 1.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\TESTE PARA O ACETOACETATO DE ETILA E METILA 5.met  
 Acquired: 8/23/2018 1:25:16 PM (GMT -08:00)  
 Printed: 8/23/2018 4:15:36 PM (GMT -08:00)

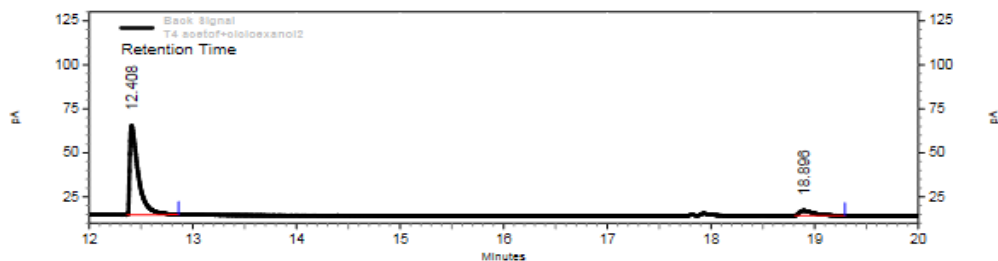
Back Signal  
Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.547	57185	0.98	8414	1.59
18.400	233657	4.02	31985	6.05
18.732	5514767	94.99	488631	92.36
<b>Totals</b>	<b>5805609</b>	<b>100.00</b>	<b>529030</b>	<b>100.00</b>

Parâmetro – co-solvente: Cicloexanol

## Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 acetof+cicloexano12.rsl\T4 acetof+cicloexano12.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaqure REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\TESTE PARA O ACETOACETATO DE ETILA E METILA 5.met  
 Acquired: 8/23/2018 11:09:35 AM (GMT -08:00)  
 Printed: 8/23/2018 4:08:20 PM (GMT -08:00)



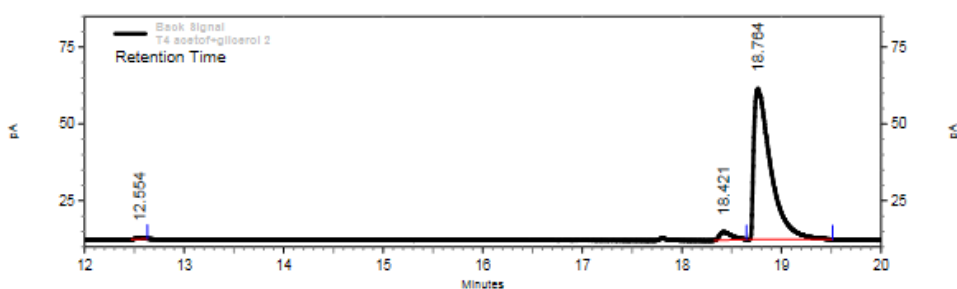
## Back Signal Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.408	2238941	90.94	389791	94.48
18.896	222966	9.06	22778	5.52
<b>Totals</b>	<b>2461907</b>	<b>100.00</b>	<b>412569</b>	<b>100.00</b>

Parâmetro – co-solvente: Glicerol

## Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 acetof+glicerol 2.rsl\T4 acetof+glicerol 2.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaqure REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\TESTE PARA O ACETOACETATO DE ETILA E METILA 5.met  
 Acquired: 8/24/2018 9:29:21 AM (GMT -08:00)  
 Printed: 8/24/2018 10:12:02 AM (GMT -08:00)



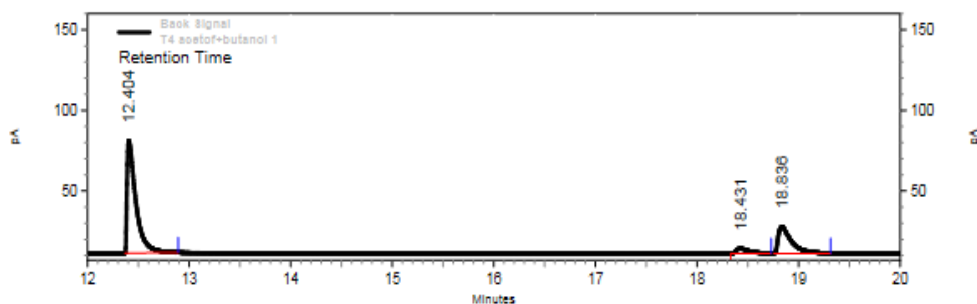
## Back Signal Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.554	13387	0.29	2549	0.64
18.421	174029	3.74	20607	5.15
18.764	4463700	95.97	376888	94.21
<b>Totals</b>	<b>4651116</b>	<b>100.00</b>	<b>400044</b>	<b>100.00</b>

Parâmetro – co-solvente: Butanol

## Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\Co-solvente\T4 acetof+butanol 1.rslt\T4 acetof+butanol 1.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17 mestrado\TESTE PARA O ACETOACETATO DE ETILA E METILA 5.met  
 Acquired: 8/24/2018 10:12:28 AM (GMT -08:00)  
 Printed: 8/24/2018 11:23:58 AM (GMT -08:00)



## Back Signal Results

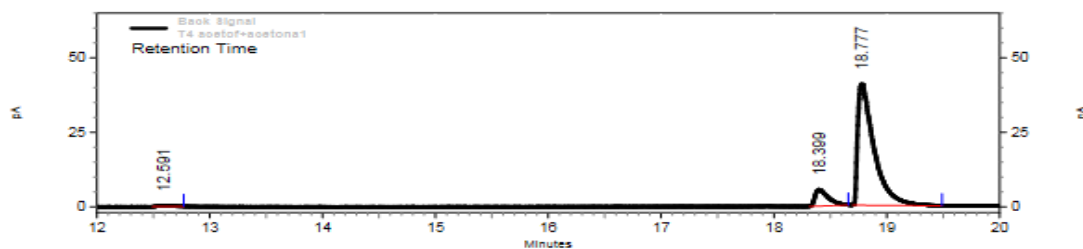
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.404	3241999	70.16	535035	77.79
18.431	227719	4.93	24962	3.63
18.836	1151249	24.91	127766	18.58

Totals	4620967	100.00	687763	100.00
--------	---------	--------	--------	--------

Parâmetro – co-solvente: acetona

## Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 acetof+acetona1.rslt\T4 acetof+acetona1.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaque REIS\Method\metodos criados em 13.12.17 mestrado\TESTE PARA O ACETOACETATO DE ETILA E METILA 5.met  
 Acquired: 8/22/2018 6:13:15 PM (GMT -08:00)  
 Printed: 8/23/2018 4:13:03 PM (GMT -08:00)



## Back Signal Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.591	17097	0.49	2749	0.77
18.399	347998	9.88	42993	11.99
18.777	3156159	89.63	312914	87.25

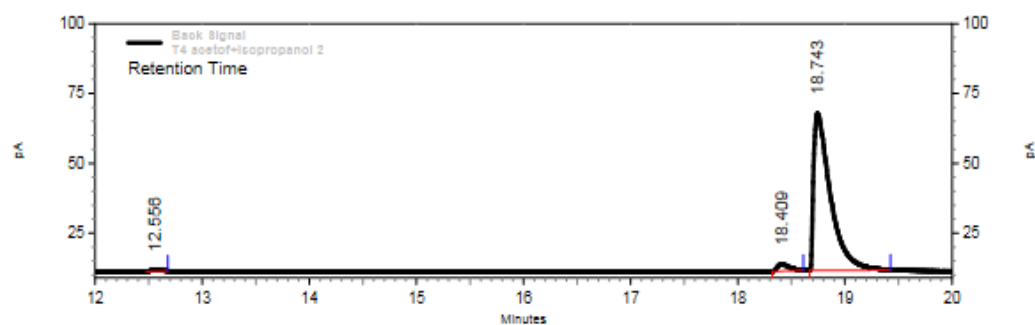
Totals	3521254	100.00	358656	100.00
--------	---------	--------	--------	--------

Parâmetro – co-solvente: isopropanol



## Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 acetof+isopropanol 2.rslt\T4 acetof+isopropanol 2.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaqu REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\TESTE PARA O ACETOACETATO DE ETILA E METILA 5.met  
 Acquired: 8/24/2018 12:27:06 PM (GMT -08:00)  
 Printed: 8/24/2018 1:09:49 PM (GMT -08:00)

Back Signal  
Results

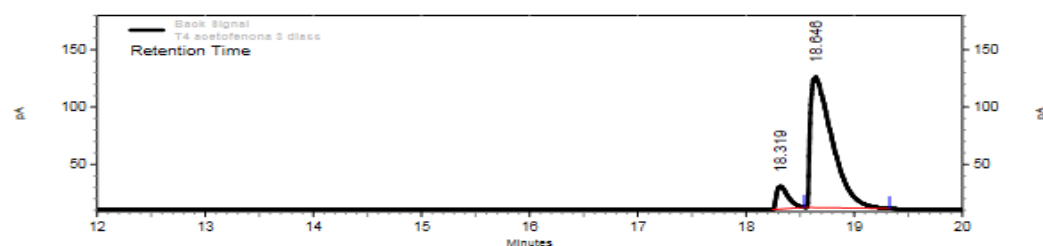
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
12.556	27087	0.55	4328	0.95
18.409	149698	3.05	19137	4.19
18.743	4723329	96.39	432947	94.86

Totals	Area	Area %	Height	Height %
	4900114	100.00	456412	100.00

Parâmetro – co-solvente: DMSO

## Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Eliane\Henrique Pereira\Resultados\T4 acetofenona 3 diass.rslt\T4 acetofenona 3 diass.dat  
 Method: C:\Enterprise\Projects\Projects\_backup\Jaqu REIS\Method\metodos criados em 13.12.17  
 mestrado\PADRAO 14 FENIL E ACETOFENOÑA.met  
 Acquired: 9/12/2018 11:25:42 AM (GMT -08:00)  
 Printed: 9/12/2018 12:03:52 PM (GMT -08:00)

Back Signal  
Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
18.319	1145815	8.56	152575	14.84
18.646	12245560	91.44	875633	85.16

Totals	Area	Area %	Height	Height %
	13391375	100.00	1028208	100.00