



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



**FERNANDO VIANA BARREIROS MOUTINHO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOCATALÍTICO DA  
MICROALGA *Dunaliella salina* NA REDUÇÃO  
ASSIMÉTRICA DA ACETOFENONA**

**SALVADOR, 2017**

**FERNANDO VIANA BARREIROS MOUTINHO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOCATALÍTICO DA  
MICROALGA *Dunaliella salina* NA REDUÇÃO  
ASSIMÉTRICA DA ACETOFENONA**

Dissertação a ser avaliada pelo Programa de Pós-graduação em Química,  
Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisito  
parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Valéria Belli Riatto

**SALVADOR, 2017**

**TERMO DE APROVAÇÃO**  
**FERNANDO VIANA BAREIROS MOUTINHO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOCATALÍTICO DA MICROALGA *Dunaliella salina*  
NA REDUÇÃO ASSIMÉTRICA DA ACETOFENONA**

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

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria Belli Riatto \_\_\_\_\_  
Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas  
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Sílvio do Desterro Cunha \_\_\_\_\_  
Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas  
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Ademir Evangelista do Vale \_\_\_\_\_  
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia  
Universidade Federal da Bahia

Salvador, 12 de maio de 2017.

*“...meu caminho pelo mundo,  
eu mesmo traço,  
a Bahia já me deu,  
régua e compasso,  
quem sabe de mim sou eu,  
aquele abraço!...”*

*(Gilberto Gil)*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço minha família, meu Pai Juraci, minha Mãe Janice, minhas irmãs Lena e Carol, e minha esposa Fernanda Gabriela, pela força, carinho, companheirismo, sobretudo pela energia que me proporcionam todos os dias em minha vida.

A minha orientadora, Profa. Dra. Valéria que me proporcionou realizar este sonho de trabalhar com pesquisa e aprender a rotina e os desafios de um pesquisador, fazendo muito além do papel de uma orientadora, onde soube ser rígida nos momentos necessários, mas foi humana nos momentos em que mais precisei.

Ao Prof. Maurício, que sempre se apresentou solícito nos momentos de pesquisa e discussão, muitas vezes ocupando o papel de co-orientador, sempre proporcionando ótimas provocações com relação ao desenvolvimento do trabalho.

Ao estudantes do Grupo de Pesquisa em Iniciação Científica Júnior do Sesi-Piatã em Tecnologias Verdes, pela grandiosa oportunidade de trabalhar e aprender com eles todos os dias um pouco mais de química, salientando os agradecimentos a Marcos e Bianca respectivamente, pelo auxílio na contagem das microalgas e revisão do Abstratc.

A Rede Sesi de Educação da Bahia, representado por Cléssia Lobo de Moraes (Gerente de Educação DR-BA), Cristina da Silva Andrade (Gerente da Unidade Piatã) e Analúcia Passos (Vice Direta da Unidade Sesi Piatã), pela oportunidade em desenvolver parte do presente trabalho no laboratório de pesquisa em iniciação científica do Sesi, além do apoio e incentivo ao longo de todo o trabalho.

A todos os amigos do grupo de pesquisa e companheiros de laboratório, não podendo deixar de citar, Maria Kuliakita, Uchôa, Jaque Rosa e Galber, não somente pelos momentos de aprendizado, mas pela parceria e atenção demonstrada comigo ao longo de todo período de trabalho no laboratório e fora dele.

À professora Profa. Dra. Suzana Telles da Cunha Lima, coordenadora do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LaBBiotec) que gentilmente realizou a coleta e doação das cepas do Banco de Microalgas Iracema Nascimento (BMIN) do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

E por último a todas as pessoas que diretamente ou indiretamente me ajudaram para que o presente trabalho fosse desenvolvido.

MOUTINHO, Fernando Viana Barreiros. **Avaliação do potencial biocatalítico da microalga *Dunaliella salina* na redução assimétrica da acetofenona**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2017.

## RESUMO

No presente trabalho, microalgas marinhas da espécie *Dunaliella salina* foram utilizadas para estudo de bioprospecção, sobre seu potencial emprego como biocatalisadores em reações de redução assimétrica, utilizando como substrato padrão, a cetona pró-quiral acetofenona na produção do álcool quiral (*R*)-1-fenil-etanol. A etapa inicial do trabalho consistiu em desenvolver uma metodologia que proporcionasse um controle dos parâmetros de síntese, a partir de aparatos tecnológicos simples e passíveis de serem reproduzidos em laboratório, apresentando resultados relevantes de enantiosseletividade. Neste sentido, foram realizados estudos sobre as condições de adaptabilidade das microalgas frente a presença do substrato acetofenona em meio de cultura algal, como parâmetros de ordem de adição, relação entre a quantidade de massa do substrato versus volume de solução de microalgas, agitação e aeração do meio, resultando em uma metodologia reproduzível e sistematizada das reações de biocatálise do substrato acetofenona, obtendo assim, um processo biotecnológico controlado. No desenvolvimento da metodologia com as microalgas *D. salina*, as reações de biocatálise foram realizadas utilizando somente H<sub>2</sub>O como solvente, portanto não fazendo uso de solvente orgânico no processo de biorredução, evitando assim a formação de subprodutos e consequente geração de resíduos para tratamento. As microalgas *D. salina* apresentaram excelentes resultados de excesso enantiomérico, 96,7 ee% (Entrada 9) e 99,4 ee% (Entrada 10), com respectivos tempos reacionais de 72 horas e 120 horas. Além disso, as mesmas apresentaram rápida adaptabilidade a presença do substrato acetofenona e ação biocatalítica com valores de conversão de 100% (Entrada 10), utilizando massas consideráveis de substrato (200mg). Os produtos de biocatálise foram analisados e caracterizados por cromatografia gasosa em coluna quiral e espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier, comparando os resultados obtidos com informações em literatura (YADAV et al., 2002) e (BISPO, 2016). Logo a aplicação de microalgas marinhas da espécie

*Dunaliella salina*, através de suas células íntegras, demonstrou ser promissora como biocatalisadores assimétricos, possibilitando o avanço em pesquisas, além de cetonas pró-quirais, com outros grupos funcionais de interesse, como aldeídos e  $\alpha,\beta$ -cetoésteres na produção de álcoois quirais enantiomericamente puros.

**Palavras chave:** Microalgas, *Dunaliella salina*, biocatálise, biotecnologia, química verde, acetofenona.

MOUTINHO, Fernando Viana Barreiros. **Evaluation of the biocatalytic potential of the *Dunaliella salina* microalgae in the asymmetric reduction of acetophenone.** Dissertation (Masters) - Chemistry Institute, Federal University of Bahia, Salvador, 2016.

## ABSTRACT

In this work, marine microalgae from the species *Dunaliella salina* was using for the bio prospecting study, about their potential employment as biocatalysts reducing reactions using standard substrate, the pro-chiral ketone acetophenone in the production of chiral alcohol (R) -1-phenyl-ethanol. The initial stage of the work consisted in developing a methodology that would provide a control of the synthesis parameters, from simple technological devices that can be reproduced in laboratories, presenting relevant results of enantioselectivity. In this meaning, research was carried out on the conditions of adaptability of microalgae against the presence of the substrate acetophenone in algal growth, as a parameter of the addition order, relation between the amount of substrate mass versus volume of microalgae solution and shaking and aeration of the medium, resulting in a reproducible and systematized methodology of the biocatalysts reactions of the acetophenone substrate thus obtaining a controlled biotechnological process. In the development of the methodology with the microalgae *D. salina*, the biocatalysts reactions were performed using only H<sub>2</sub>O as the solvent, therefore not making use of organic solvent in the bio reduction process, thus avoiding the formation of by-products and consequent generation of waste for treatment. The *D. salina* microalgae presented excellent results of enantiomeric excess, 96,7 ee% (Input 9) e 99,4 ee% (Input 10), with respective reaction times of 72 hours and 120 hours. In addition they showed a fast adaptability to the presence of acetophenone substrate and biocatalytic action with 100% conversion values (Input 10), using considerable substrate masses (200mg). The biocatalysis products were analyzed and characterized by chiral column gas chromatography and spectroscopy in the infrared region with Fourier transform, comparing the results obtained with information in literature (YADAV et al., 2002) and (BISPO, 2016). Therefore, the application of marine microalgae of the species *Dunaliella salina*, through its intact cells, has been shown to be promising as asymmetric biocatalysts, enabling the advance in research, in addition

to prochiral ketones, with others functional groups of interest, such as aldehydes and  $\alpha,\beta$ -ketoesters in the production of enantiomerically pure chiral alcohols.

**Keywords:** Microalgae, *Dunaliella salina*, biocatalysis, biotechnology, green chemistry, acetophenone.

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b> - Mecanismo de ação enzimática chave-fechadura proposta por Fisher (1894) adaptado.....	31
<b>Esquema 2</b> - Mecanismo de ação enzimática de ajuste induzido, proposta por Koshland et al. (1968).....	32
<b>Esquema 3</b> - Representação esquemática referente ao mecanismo de ação enzimática de ajuste induzido, proposta por Koshland et al. (1968).....	33
<b>Esquema 4</b> - Biocatálise do composto acetaldeído em etanol via redução enzimática com oxirredutases (álcool desidrogenase) e cofator NAD(P)H.....	35
<b>Esquema 5</b> - Obtenção do álcool quiral (S)-2-hidroxi-4-fenila via redução enzimática assimétrica com fungos <i>Leifsonia</i> sp.....	42
<b>Esquema 6</b> - Biocatálise assimétrica do composto pentafluoracetofenona por microorganismo marinho <i>Synechococcus</i> sp.....	48
<b>Esquema 7</b> - Biocatálise assimétrica do composto 5 $\alpha$ -androstano-3,17-diona por algas marinhas <i>Cyanidioschyzon merolae</i> e <i>Cyanidium caldarium</i> .....	48
<b>Esquema 8</b> - Representação esquemática do processo enzimático de redução de cetonas pró-quirais via enzimas álcool desidrogenases, juntamente com seu sistemas de reciclagem do cofator através de fotossíntese.....	49
<b>Esquema 9</b> - Representação esquemática do processo de fotossíntese oxigênica realizado pelas microalgas.....	52
<b>Esquema 10</b> - Representação esquemática da vista superior de um tanque de cultivo de microalgas no formato de pista "raceway".....	57
<b>Esquema 11</b> - Representação esquemática de fotobiorreator em regime de processo de cultivo contínuo.....	59
<b>Esquema 12</b> - Representação esquemática do processo de repicagem de microalgas em sistema fechado.....	60
<b>Esquema 13</b> - Representação esquemática de fotobiorreator em regime de processo contínuo de cultura algal.....	61
<b>Esquema 14</b> - Manutenção do meio de cultivo das microalgas a partir do processo de repicagem.....	76

<b>Esquema 15</b> - Área de contagem da câmara de Neubauer com seus quadrantes.....	82
<b>Esquema 16</b> - Equação para síntese do álcool ( <i>R/S</i> )-1-fenil-etanol, a partir da redução química da acetofenona.....	96
<b>Esquema 17</b> - Mecanismo de reação da redução química do substrato acetofenona com borohidreto de sódio.....	97
<b>Esquema 18</b> - Biorredução assimétrica da acetofenona utilizando como biocatalizador, microalgas marinhas da espécie <i>Dunaliella salina</i> .....	103
<b>Esquema 19</b> - Representação esquemática da Regra de Prelog, referente a face enantiotópica preferencial de ataque a carbonila, considerando a posição e volume dos substituintes.....	123

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Diagrama comparativo entre as energias de ativação de uma reação não catalisada e outra catalisada por enzimas.....	28
<b>Figura 2</b> - Representação esquemática de uma cadeia polipeptídica formada por blocos de aminoácidos <i>Serina (Ser)</i> , <i>Glicina (Gly)</i> , <i>Tirosina (Tyr)</i> , <i>Alanina (Ala)</i> e <i>Leucina (Leu)</i> respectivamente.....	30
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática da estrutura molecular das coenzimas NADH e NADPH.....	34
<b>Figura 4</b> - Representação da estrutura molecular dos enantiômeros do fármaco <i>Etambutol</i> .....	41
<b>Figura 5</b> - Representação da estrutura molecular dos enantiômeros (1 <i>R</i> , 2 <i>S</i> , 5 <i>R</i> )-(-)-mentol, 1-octen-1-ol, (1 <i>R</i> , 2 <i>S</i> , 5 <i>R</i> )-(-)-mentol, ( <i>R</i> )-lavanduol e ( <i>R</i> )-1-octen-3-ol.....	43
<b>Figura 6</b> - Representação das estruturas químicas dos álcoois quirais 1-(4-fluorofenil) etanol e 1-(4-trifluorofenil), juntamente com suas ações como bloco de construção quiral.....	43
<b>Figura 7</b> - Biocatálises de cetonas via espécie <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	46
<b>Figura 8</b> - Fotobiorreator em sistema fechado sob regime autotrófico de culturas de microalgas da espécie <i>Dunaliella salina</i> .....	57
<b>Figura 9</b> - Imagem microscópica de células de microalgas da espécie <i>Dunaliella salina</i> obtidas por meio de microscópio óptico.....	66
<b>Figura 10</b> - Fotobiorreator utilizado para o cultivo em sistema fechado em laboratório para o cultivo das microalgas <i>Dunaliella salina</i> .....	74
<b>Figura 11</b> - Fotobiorreator com microalgas <i>Dunaliella salina</i> em diferentes fases de crescimento.....	75
<b>Figura 12</b> - Equipamento de espectroscopia de infravermelho SHIMADZU IRAffinity-1 FT-IR (Fourier Transform Infrared).....	76
<b>Figura 13</b> - Espectro de IR-FT (Infravermelho com Transformada de Fourier) realizada em filme líquido com janela de NaCl do composto acetofenona.....	77
<b>Figura 14</b> - Espectro de IR-FT (Infravermelho com Transformada de Fourier) realizada em filme líquido com janela de NaCl do composto ( <i>R</i> )-1-fenil-etanol.....	77

<b>Figura 15</b> - Espectro de IR-FT (Infravermelho com Transformada de Fourier) realizada em filme líquido com janela de NaCl do composto ( <i>R</i> )-1-fenil-etanol.....	78
<b>Figura 16</b> - Equipamento espectrofotômetro LOGEN Scientific SFG25NM.....	78
<b>Figura 17</b> - Equipamento microscópio óptico OPTON modelo TNB-01B.....	80
<b>Figura 18</b> - Imagem microscópica das células de microalgas <i>Dunaliella salina</i> obtida a partir da captura de imagem em equipamento microscópio óptico OPTON modelo TNB-01B com aumento de 400x.....	81
<b>Figura 19</b> - Imagem vista de cima da Câmara de Neubauer.....	82
<b>Figura 20</b> - Imagem da câmara de Neubauer com os quadrantes de contagem.....	83
<b>Figura 21</b> - Equipamento cromatógrafo gasoso Agilent Technologies 7820A GC System e injetor automático 7693A com capacidade para 16 frascos de amostra.....	86
<b>Figura 22</b> - Equipamento polarímetro Perkin Elmer modelo 343.....	89
<b>Figura 23</b> - Etapas 1 e 2 de preparo do meio reacional da síntese de biorredução da acetofenona com microalgas <i>Dunaliella salina</i> .....	92
<b>Figura 24</b> - Etapas 3 e 4, repicagem e preparação do fotobiorreator para síntese de biorredução da acetofenona com microalgas <i>Dunaliella salina</i> .....	93
<b>Figura 25</b> - Equipamento centrífuga CENTRIBIO, modelo 80-2B com faixa de rotação de 1000 a 4000rpm.....	94
<b>Figura 26</b> - Processo de centrifugação das amostras de biocatálise e sedimentação da biomassa algal sob rotação de 3.000 rpm durante 30 minutos.....	95
<b>Figura 27</b> - Espectro de infravermelho da acetofenona realizado em equipamento SHIMADZU IRAffinity-1 FT-IR (Fourier Transform Infrared).....	97
<b>Figura 28</b> - Espectro de infravermelho da mistura racêmica ( <i>R/S</i> )-1-fenil-etanol realizado em equipamento SHIMADZU IRAffinity-1 FT-IR (Fourier Transform Infrared).....	98
<b>Figura 29</b> - Cromatograma do substrato acetofenona com a identificação do solvente acetato de etila, utilizando metodologia 1 em CG-Quiral conforme item 4.6.4 (p.0)...	99
<b>Figura 30</b> - Cromatograma do produto sintético referente a mistura racêmica ( <i>R/S</i> )-1-fenil etanol, utilizando metodologia 1 em CG-Quiral conforme item 4.6.4 (p.0).....	99
<b>Figura 31</b> - Cromatograma do produto biocatalítico ( <i>R</i> )-1-fenil etanol referente a reação de 48 horas, utilizando metodologia 2 em CG-Quiral conforme item 4.6.4 (p.0).....	101

<b>Figura 32</b> - Cromatograma do produto obtido via biocatálise com pedaços de cenoura ( <i>Daucus carota</i> ) em coluna quiral Cyclo Sil-B.....	102
<b>Figura 33</b> - Cromatograma dos produtos obtidos via biocatálise com microalgas marinhas ( <i>Dunaliella salina</i> ) e pedaços de cenoura ( <i>Daucus carota</i> ) respectivamente em coluna quiral Cyclo Sil-B.....	102
<b>Figura 34</b> - Relação do grau de saturação de microalgas no meio de cultivo com a intensidade colorimétrica e quantidade de células observadas em microscópio óptico.....	105
<b>Figura 35</b> - Teste de tolerância do substrato acetofenona com as microalgas <i>Dunaliella salina</i> em meio de cultura saturado, enriquecido com solução principal e de vitaminas, sob aeração e fotoperíodo constante durante 72 horas.....	106
<b>Figura 36</b> - Resultados referente ao ensaio de tolerância após período de 72 horas.....	107
<b>Figura 37</b> - Cromatograma referente ao ensaio de tolerância da Entrada 1 com 100mg de substrato acetofenona biocatalizado em meio de cultura algal saturado.....	108
<b>Figura 38</b> - Cromatograma referente ao ensaio de tolerância da Entrada 5 com 1000mg de substrato acetofenona biocatalizado em meio de cultura algal saturado.....	108
<b>Figura 39</b> - Biocatálise do substrato acetofenona realizada por microalgas <i>Dunaliella salina</i> no período de 72 horas em solução AMA, enriquecida com meio Conway (WALNE 1979).....	110
<b>Figura 40</b> - Cromatograma referente ao produto ( <i>R</i> )-1-fenil-etanol obtido da biocatálise do substrato acetofenona por microalgas <i>Dunaliella salina</i> no período de 72 horas.....	111
<b>Figura 41</b> - Cromatograma referente aos produtos obtidos dos ensaios de biocatálise em períodos de 24, 48, 72, 120 e 192 horas respectivamente.....	112
<b>Figura 42</b> - Microalgas <i>Dunaliella salina</i> liofilizadas em pó.....	115
<b>Figura 43</b> - Imagem microscópica de microalgas liofilizadas, A - dissolvida em solução AMA; B- dissolvida em solução AMA, enriquecida com meio Conway (WALNE, 1979) e mantida sob aeração e fotoperíodo constante ao longo de 24 horas.....	116
<b>Figura 44</b> - Produto de biocatálise da acetofenona com microalgas <i>Dunaliella salina</i> liofilizadas após 120 horas de reação.....	117

<b>Figura 45</b> - Imagem referente a biocatálise da acetofenona com microalgas liofilizadas, A - aparência inicial do meio reacional e B - aparência do meio reacional após 120 horas.....	117
<b>Figura 46</b> - Cromatogramas referentes aos produtos quirais obtidos dos ensaios com diferentes volumes de adição 0,1mL, 0,5mL e 1,0mL respectivamente de solução de vitaminas.....	119
<b>Figura 47</b> - Sistema de produção de CO <sub>2</sub> e adição do mesmo no meio de cultura algal.....	120
<b>Figura 48</b> - Cromatograma do produto obtido da biocatálise da acetofenona com microalgas em meio de cultura algal com adição de CO <sub>2</sub> e tempo reacional de 72 horas.....	121
<b>Figura 49</b> - Cromatograma referente ao álcool padrão racêmico ( <i>R/S</i> ) 1-fenil-etanol obtido via reação sintética realizado por cromatografia gasosa em equipamento Agilent 7820A CG System em coluna quiral Cyclo Sil-B.....	137
<b>Figura 50</b> - Cromatograma referente ao álcool ( <i>R</i> ) 1-fenil-etanol obtido via reação de biocatálise com microalgas em período de 72 horas realizado por cromatografia gasosa em equipamento Agilent 7820A CG System em coluna quiral Cyclo Sil-B CG-Quiral.....	137
<b>Figura 51</b> - Cromatograma referente ao álcool ( <i>R</i> ) 1-fenil-etanol obtido via reação de biocatálise com microalgas em período de 24 horas realizado por cromatografia gasosa em equipamento Agilent 7820A CG System em coluna quiral Cyclo Sil-B CG-Quiral.....	138
<b>Figura 52</b> - Cromatograma referente ao álcool ( <i>R</i> ) 1-fenil-etanol obtido via reação de biocatálise com microalgas em período de 48 horas realizado por cromatografia gasosa em equipamento Agilent 7820A CG System em coluna quiral Cyclo Sil-B....	138
<b>Figura 53</b> - Cromatograma referente ao álcool ( <i>R</i> ) 1-fenil-etanol obtido via reação de biocatálise com microalgas em período de 72 horas realizado por cromatografia gasosa em equipamento Agilent 7820A CG System em coluna quiral Cyclo Sil-B....	139
<b>Figura 54</b> - Cromatograma referente ao álcool ( <i>R</i> ) 1-fenil-etanol obtido via reação de biocatálise com microalgas em período de 120 horas realizado por cromatografia gasosa em equipamento Agilent 7820A CG System em coluna quiral Cyclo Sil-B....	139

<b>Figura 55</b> - Cromatograma referente ao álcool ( <i>R</i> ) 1-fenil-etanol obtido via reação de biocatálise com microalgas em período de 192 horas realizado por cromatografia gasosa em equipamento Agilent 7820A CG System em coluna quiral Cyclo Sil-B....	140
<b>Figura 56</b> - Cromatograma referente ao álcool ( <i>R</i> ) 1-fenil-etanol obtido via reação de biocatálise com microalgas liofilizadas em período de 120 horas realizado por cromatografia gasosa em equipamento Agilent 7820A CG System em coluna quiral Cyclo Sil-B.....	140
<b>Figura 57</b> - Cromatograma referente ao álcool ( <i>R</i> ) 1-fenil-etanol obtido via reação de biocatálise com microalgas com adição de 0,1 mL solução de vitaminas ao meio reacional em período de 24 horas realizado por cromatografia gasosa em equipamento Agilent 7820A CG System em coluna quiral Cyclo Sil-B.....	141
<b>Figura 58</b> - Cromatograma referente ao álcool ( <i>R</i> ) 1-fenil-etanol obtido via reação de biocatálise com microalgas com adição de 0,5 mL solução de vitaminas ao meio reacional em período de 24 horas realizado por cromatografia gasosa em equipamento Agilent 7820A CG System em coluna quiral Cyclo Sil-B.....	141
<b>Figura 59</b> - Cromatograma referente ao álcool ( <i>R</i> ) 1-fenil-etanol obtido via reação de biocatálise com microalgas com adição de 1,0 mL solução de vitaminas ao meio reacional em período de 24 horas realizado por cromatografia gasosa em equipamento Agilent 7820A CG System em coluna quiral Cyclo Sil-B.....	142
<b>Figura 60</b> - Cromatograma referente ao álcool ( <i>R</i> ) 1-fenil-etanol obtido via reação de biocatálise com microalgas com adição de CO <sub>2</sub> ao meio reacional em período de 72 horas realizado por cromatografia gasosa em equipamento Agilent 7820A CG System em coluna quiral Cyclo Sil-B.....	142
<b>Figura 61</b> - Espectro de infravermelho do álcool ( <i>R</i> ) 1-fenil-etanol obtido via reação de biocatálise com microalgas em período de 72 horas, realizado em equipamento SHIMADZU IRAffinity-1 IR-FT (Infravermelho com Transformada de Fourier) em filme líquido com janela de NaCl.....	143
<b>Figura 62</b> - Espectro de infravermelho do álcool ( <i>R</i> ) 1-fenil-etanol obtido via reação de biocatálise com microalgas em período de 24 horas, realizado em equipamento SHIMADZU IRAffinity-1 IR-FT (Infravermelho com Transformada de Fourier) em filme líquido com janela de NaCl.....	144
<b>Figura 63</b> - Espectro de infravermelho do álcool ( <i>R</i> ) 1-fenil-etanol obtido via reação de biocatálise com microalgas em período de 48 horas, realizado em equipamento	

SHIMADZU IRAffinity-1 IR-FT (Infravermelho com Transformada de Fourier) em filme líquido com janela de NaCl.....145

**Figura 64** - Espectro de infravermelho do álcool (*R*) 1-fenil-etanol obtido via reação de biocatálise com microalgas em período de 72 horas, realizado em equipamento SHIMADZU IRAffinity-1 IR-FT (Infravermelho com Transformada de Fourier) em filme líquido com janela de NaCl.....146

**Figura 65** - Espectro de infravermelho do álcool (*R*) 1-fenil-etanol obtido via reação de biocatálise com microalgas em período de 120 horas, realizado em equipamento SHIMADZU IRAffinity-1 IR-FT (Infravermelho com Transformada de Fourier) em filme líquido com janela de NaCl.....147

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - Curva de crescimento da microalga clorófito <i>Neochloris oleoabundans</i> em sistema fechado a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12h, durante 28 dias com agitação.....	54
<b>Gráfico 2</b> - Valores da medida de absorvância das soluções de microalgas em diferentes fases de crescimento.....	80
<b>Gráfico 3</b> - Curva de crescimento das microalgas ao longo de 73 dias, em fotoperíodo e aeração constante e temperatura de aproximadamente $25^{\circ}\text{C}$ .....	85
<b>Gráfico 4</b> - Relação entre os resultados de contagem do nº células de microalgas e valor da absorvância do meio de cultivo algal ao longo de 30 dias.....	105
<b>Gráfico 5</b> - Análise das fases de desenvolvimento das microalgas com as reações de biocatálise de 120 e 192 horas.....	113
<b>Gráfico 6</b> - Comparativo das taxas de conversão e excesso enantiomérico entre as reações de biocatálise com microalgas vivas e microalgas liofilizadas com tempo reacional de 120 horas.....	118

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Classificação das enzimas segundo União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM).....	29
<b>Tabela 2</b> - Comparativo entre as massas moleculares dos compostos acetaldeído e a enzima álcool desidrogenase.....	31
<b>Tabela 3</b> - Coenzimas utilizadas em biocatálises de acordo com o tipo de reação.....	35
<b>Tabela 4</b> - Compostos intermediários quirais produzidos em larga escala por indústrias químicas.....	37
<b>Tabela 5</b> - Parâmetros de comparação entre células em repouso e fase de crescimento em reações de biocatálise.....	39
<b>Tabela 6</b> - Parâmetros de comparação entre células em repouso e fase de crescimento em reações de biocatálise.....	40
<b>Tabela 7</b> - Resultados de biocatálise assimétrica via raízes da espécie <i>Daucus carota</i> com diferentes composições químicas da acetofenona (YADAV et al., 2002).....	44
<b>Tabela 8</b> - Principais grupos de microalgas dos domínios <i>Bacteria</i> e <i>Eucarya</i> .....	52
<b>Tabela 9</b> - Descrição das principais características referente a cada fase de crescimento exponencial em cultivos de microalgas.....	54
<b>Tabela 10</b> - Variabilidade metabólica das microalgas em relação à fonte de energia e carbono (ANDRADE et al., 2014).....	55
<b>Tabela 11</b> - Comparativo entre as características dos processos fotoautotrófico e heterotrófico na produção de microalgas da espécie <i>Chlorella vulgaris</i> .....	56
<b>Tabela 12</b> - Sistemas e regime de cultivo referente a diversas espécies de microalgas com seus respectivos produtos e aplicações.....	58
<b>Tabela 13</b> - Produtos obtidos da cultura de microalgas, com suas áreas de aplicação e respectivas utilizações.....	62
<b>Tabela 14</b> - Empresas que cultivam microalgas com suas respectivas localidades, gênero produzido e produto obtido com a relativa atividade biológica.....	63
<b>Tabela 15</b> - Teor de metabólitos em microalgas da espécie <i>Dunaliella salina</i> e raízes da espécie <i>Daucus carota</i> (cenoura).....	65
<b>Tabela 16</b> - Aplicações para cultura algal de espécies <i>Dunaliella salina</i> .....	67
<b>Tabela 17</b> - Resultados de biotransformações de aldeídos e cetonas com emprego de microalgas da espécie <i>Dunaliella tertiolecta</i> e <i>Dunaliella parva</i> .....	68

<b>Tabela 18</b> - Descrição do grau de pureza e fornecedor dos reagentes utilizados.....	69
<b>Tabela 19</b> - Descrição das espécies químicas e suas respectivas massas utilizadas no preparo de 1L de solução AMA.....	71
<b>Tabela 20</b> - Descrição das espécies químicas e suas respectivas massas utilizadas no preparo de 1L de solução principal.....	72
<b>Tabela 21</b> - Descrição das espécies químicas e suas respectivas massas utilizadas no preparo de 10 mL de solução de metais traço.....	72
<b>Tabela 22</b> - Descrição das espécies químicas e suas respectivas massas utilizadas no preparo de 100 mL de solução de vitaminas.....	73
<b>Tabela 23</b> - Características ópticas do espectrofotômetro LOGEN Scientific.....	78
<b>Tabela 24</b> - Valores da medida de absorvância das soluções de microalgas em diferentes fases de crescimento.....	78
<b>Tabela 25</b> - Descrição técnica do microscópio OPTON TNB-01B.....	81
<b>Tabela 26</b> - Valores de contagem de microalgas durante fase de crescimento em temperatura de aproximadamente 25°C sob fotoperíodo constante.....	85
<b>Tabela 27</b> - Descrição dos gases utilizados e grau de pureza.....	86
<b>Tabela 28</b> - Parâmetros do detector, injetor, coluna e rampa de aquecimento referente a metodologia utilizada nas análises cromatográficas.....	87
<b>Tabela 29</b> - Valor de rotação específica da literatura comparado ao valor medido em equipamento polarímetro do produto de biocatálise 120 horas.....	89
<b>Tabela 30</b> - Descrição correspondente a banda de vibração com os números de onda e seus respectivos grupos funcionais.....	97
<b>Tabela 31</b> - Descrição química dos compostos e de seus respectivos tempos de retenção obtidos por análise cromatográfica gasosa com coluna quiral.....	99
<b>Tabela 32</b> - Valores de rotação específica, excesso enantiomérico e configuração absoluta referentes ao composto ( <i>R</i> )-1-fenil-etanol e produto de biocatálise 48 horas, obtidos respectivamente da literatura e experimentalmente em equipamento polarímetro e CG-Quiral.....	100
<b>Tabela 33</b> - Valores de rotação específica, excesso enantiomérico e configuração absoluta referentes a biorredução com cenoura ( <i>Daucus carota</i> ) da acetofenona com tempo reacional de 40 horas (YADAV 2002).....	101
<b>Tabela 34</b> - Resultados referente ao ensaio de tolerância das microalgas frente ao substrato acetofenona em meio de cultura algal saturado.....	107

<b>Tabela 35</b> - Resultados de conversão e excesso enantiomérico referente as reações de biocatálise com 100mg e 1000mg de acetofenona.....	107
<b>Tabela 36</b> - Resultados de conversão e excesso enantiomérico referente as reações de biocatálise da acetofenona em solução AMA enriquecido com meio Conway (WALNE, 1979) com tempo reacional de 72 horas.....	111
<b>Tabela 37</b> - Resultados de biocatálises com diferentes tempos de reação, rendimento bruto, taxa de conversão, configuração absoluta e excesso enantiomérico.....	112
<b>Tabela 38</b> - Resultado da biocatálise com microalgas <i>Dunaliella salina</i> liofilizadas em pó com tempo reacional de 120 horas.....	117
<b>Tabela 39</b> - Resultados das reações de biorredução da acetofenona com diferentes quantidades de adição de solução de vitaminas.....	119
<b>Tabela 40</b> - Resultado da reação de biorredução da acetofenona com adição de CO <sub>2</sub> .....	121
<b>Tabela 41</b> - Comparação entre os produtos obtidos da biocatálise com emprego de células íntegras de raízes <i>Daucus carota</i> e Microalgas da espécie <i>Dunaliella salina</i> .....	124
<b>Tabela 42</b> - Comparação entre os resultados da <i>Dunaliella salina</i> com <i>Dunaliella parva</i> e <i>Chlorella minutissima</i> na biorredução assimétrica da acetofenona.....	124

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$[\alpha]_D$  Rotação Específica

ATP Adenosina Trifosfato

AMA Água do Mar Artificial

CG Cromatografia Gasosa

IV Infravermelho

NADH Dinucleotídeo de nicotinamida adenina fosfato

NADPH Dinucleotídeo de nicotinamida adenina

## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	22
1. INTRODUÇÃO.....	23
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 GERAL.....	27
2.2 ESPECÍFICOS.....	27
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	28
3.1 BIOCATALISADORES.....	28
3.2 BIOCATALISE E QUÍMICA VERDE.....	37
3.3 ALCOÓIS QUIRAIS A PARTIR DE CETONAS PRÓ-QUIRAIS VIA BIOCATALISE ENZIMÁTICA.....	41
3.4 MICRO-ORGANISMOS DE ORIGEM MARINHA COMO BIOCATALISADORES.....	46
3.5 MICROALGAS.....	51
3.6 MICROALGAS DA ESPÉCIE <i>Dunaliella salina</i> .....	65
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	69
4.1 MATERIAIS UTILIZADOS.....	69
4.2 COLETA DE CEPAS DA MICROALGA <i>Dunaliella salina</i> .....	70
4.3 PREPARO DO MEIO DE CULTIVO DAS MICROALGAS.....	70
4.3.1 PREPARO DA SOLUÇÃO DE ÁGUA DO MAR ARTIFICIAL (AMA).....	71
4.3.2 PREPARO DO MEIO CONWAY.....	71
4.4 CULTIVO DAS MICROALGAS.....	73
4.5 MANUTENÇÃO DAS CULTURAS DE MICROALGAS.....	74
4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	76
4.6.1 ESPETROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (IV).....	76
4.6.2 ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS).....	78
4.6.3 MICROSCOPIA ÓPTICA.....	80
4.6.3.1 CONTAGEM DE CÉLULAS EM CÂMARA DE NEUBAUER.....	81
4.6.4 CROMATOGRAFIA A GÁS COM DETECTOR POR IONIZAÇÃO DE CHAMA (CG-QUIRAL).....	86
4.6.5 CÁLCULO DE CONVERSÃO DO SUBSTRATO E EXCESSO ENANTIOMÉRICO.....	88

4.6.6 DETERMINAÇÃO DA ROTAÇÃO ESPECÍFICA E CONFIGURAÇÃO ABSOLUTA.....	89
4.6.7 PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO DAS MICROALGAS.....	90
4.7 REDUÇÃO QUÍMICA DA ACETOFENONA.....	90
4.8 BIORREDUÇÃO ASSIMÉTRICA DA ACETOFENONA COM MICROALGAS MARINHAS <i>Dunaliella salina</i> .....	91
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	96
5.1 PREPARAÇÃO DO PADRÃO REDUZIDO 1-FENIL-ETANOL.....	96
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ABSOLUTA DOS PRODUTOS DE BIOCATÁLISE COM MICROALGAS <i>Dunaliella salina</i> .....	100
5.3 REAÇÕES DE BIOCATÁLISE EMPREGANDO MICROALGAS <i>Dunaliella salina</i> COMO BIOCATALISADOR.....	103
5.3.1 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE MICROALGAS E SUBSTRATO ACETOFENONA NA BIOCATÁLISE.....	104
5.3.2 INFLUÊNCIA DO METABOLISMO DAS MICROALGAS NA BIORREDUÇÃO DA ACETOFENONA.....	110
5.3.3 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE REAÇÃO NA REAÇÃO DE BIOCATÁLISE.....	111
5.3.4. BIORREDUÇÃO COM MICROALGAS LIOFILIZADAS.....	114
5.3.5. CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO DE VITAMINAS.....	119
5.3.6. ADIÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO.....	120
6. CONCLUSÃO.....	117
7. REFERÊNCIAS.....	122
8. APÊNDICE.....	137

## 1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade e as matérias primas naturais vêm sendo apontadas como elementos de grande importância estratégica em diversos setores acadêmicos e industriais, devido ao seu amplo e diversificado potencial como fornecedora de compostos para desenvolvimento de biocombustíveis, biotransformações, bioprodutos e bioprocessos. Existem diversos fatores que podem ser vistos como determinantes no crescente interesse pela utilização de matérias-primas renováveis, dentre elas podemos destacar o potencial da biotecnologia industrial, juntamente com as restrições ambientais ao uso de matérias primas fósseis, compostos sintéticos e orientação das estratégias empresariais em integrar os princípios de desenvolvimento sustentável em seu plano de negócios. Desta maneira, conciliando as dimensões econômica, social e ambiental, a perspectiva da inovação biotecnológica surge como alternativa em remodelar empreendimentos tecnocientíficos a fim de se alcançar uma produção industrial alinhada a uma gestão ambiental, com metodologias menos impactantes ao meio ambiente e mais sinérgicas ao ecossistema.

A biotecnologia está se tornando um poderoso vetor de dinamismo da economia mundial, como base para inovação no século XXI, onde a evolução de seu conhecimento vem contribuindo para maior utilização das biomassas e seus metabólitos, seja na preparação e produção de matérias primas ou nas tecnologias de conversão e biotransformação. É neste contexto que se inserem, por exemplo, as orientações estratégicas estabelecidas por importantes empresas químicas no desenvolvimento de tecnologias baseadas em química verde (*green chemistry*), como a Du Pont que estabeleceu desde 1998, princípios de sustentabilidade para sua trajetória de crescimento em que se baseiam fortemente na biotecnologia e na utilização de matérias primas renováveis, como também a BASF que passou a identificar em seus documentos estratégicos a biotecnologia e as matérias primas renováveis como uma das bases para o crescimento futuro da empresa, além de empresas como Dow, DSM e Novozymes que aderiram a orientações semelhantes.

Diante deste cenário, a biocatálise vem se consolidando como um dos campos mais promissores em tecnologias verdes para síntese de compostos com alto valor agregado, tal como fármacos, cosméticos e agroquímicos

(CARVALHO et al., 2005). Este motivo se deve ao fato de sua versatilidade no emprego de células íntegras de vegetais, animais, fontes microbianas, microorganismos marinhos, enzimas isoladas, ou ainda biomassa como fonte enzimática, em reações de biotransformações, como por exemplo, biocatálises assimétricas. Além de apresentarem maior eficiência do que os catalisadores sintéticos, devido as características de regioseletividade, quimiosseletividade e estereosseletividade como catalisador (MOUAD, 2014), os biocatalisadores apresentam vantagens como facilidade de execução, utilização de água como solvente em suas biotransformações, baixo custo quando comparado a catalisadores sintéticos e são ambientalmente sinérgicos, possibilitando integração com o meio ambiente (CHEN et al., 2012).

No âmbito acadêmico, especificamente em pesquisa sobre síntese orgânica assimétrica na produção de moléculas com atividade óptica, o emprego dos biocatalisadores em síntese orgânica, torna-se uma excelente alternativa na produção de compostos quirais com alta pureza enantiomérica, visto que ainda existem muitas rotas sintéticas que utilizam metodologias que envolvem auxiliares quirais ou resolução de misturas racêmicas com agentes opticamente puros, resultando em processos com reações químicas adicionais, quantidades estequiométricas de indutores quirais e geração de resíduos que necessitam de tratamento adequado (BRAGA et al., 2013). Logo, a utilização de biocatalisadores em catálise assimétrica vêm permitindo o desenvolvimento de processos catalíticos ambientalmente mais adequados, com maior especificidade e eficiência química, integrando a síntese assimétrica a biotecnologia e química verde (BRAGA et al., 2013).

Desse modo, reações biocatalíticas vêm sendo empregadas cada vez mais a partir de células íntegras, pois seu processo enzimático de biotransformação não necessita de cofatores, devido ao fato de sua constituição celular conter as enzimas álcool desidrogenases, os cofatores e os respectivos sistemas de regeneração, tornando o processo viável economicamente, sobretudo sustentável (ZILBEYAZ; KURBANOGLU, 2008). Em sua maioria, o emprego de células íntegras tem sido concentrado em espécies de vegetais, como tubérculos e raízes, como por exemplo, a utilização da raiz *Daucus carota* (cenoura) na redução enzimática assimétrica de cetonas pró-quirais em álcoois quirais enantiosseletivamente puros, com resultados expressivos,

principalmente de excesso enantiomérico, com valores acima de 98% (YADAV et al., 2002).

Embora os resultados apresentados em literatura (YADAV et al., 2002) para emprego de células íntegras a partir de raízes em reação de biocatálise sejam excelentes, o controle de parâmetros como sua composição química, reprodutibilidade de resultados com raízes de diferentes meios e localidades de cultivo, competição direta com fontes alimentícias, influência de fatores climatológicos e composição de solo em sua constituição celular e enzimática, além de longos ciclos de produção e necessidade de grandes extensões de área para cultivo e manejo, tornam o emprego de raízes e tubérculos limitados quando comparados a processos sintéticos.

Diante dessa perspectiva, buscou-se no presente trabalho estudar o emprego de biocatalisador que apresentasse além das propriedades de regioseletividade, quimiosseletividade e estereosseletividade, a capacidade de cultivo em pequenos espaços com alto rendimento por unidade de área e curtos períodos de crescimento, sem competitividade direta com fonte alimentícia e reprodutibilidade em sua composição celular e enzimática, possibilitando assim o controle de seus parâmetros bioquímicos.

Nesse contexto de oportunidade, as microalgas marinhas demonstraram grande potencial, pois se assemelham a plantas superiores fotossintetizantes, portanto possuem em sua constituição intracelular, enzimas capazes de realizar biotransformações com características regioseletivas, quimiosseletivas e estereosseletivas, descartando a necessidade de cofatores, além de dispor da capacidade de cultivo em pequenos espaços (laboratório), mediante processos simples com controle de seus parâmetros bioquímicos, conferindo reprodutibilidade e especialmente a rastreabilidade da espécie cultivada (ANDRADE et al., 2014). A microalga definida para estudo no emprego como biocatalisador em reações assimétricas, foi a espécie *Dunaliella salina*, em que a definição foi determinada por sua característica de resistência a variação nas condições de seu meio de cultura, como por exemplo, concentração salina, temperatura e pH (TINOCO et al., 2015).

O emprego de microalgas marinhas como biocatalisador representa uma grande possibilidade de bioprospecção referente a área de biotecnologia e fator de agregação com valor tecnológico a pesquisa em síntese orgânica assimétrica.

Pois apesar da bioprospecção da biodiversidade marinha oferecer uma multiplicidade de alternativas de micro-organismos com ações enzimáticas, capazes de realizar reações de biotransformação de variados substratos de interesse, com grande potencial para síntese química orgânica (DA MATA et al., 2011), são poucos os trabalhos encontrados em literatura, como por exemplo, Noma et al. (1992), Hook et al. (1999), Hatanaka (1999), Hook et al. (2003) e Mouad (2014).

Também podemos observar a escassez de trabalhos no Brasil, sobretudo no que diz respeito ao emprego de micro-organismos marinhos como biocatalisadores, onde geralmente o que se encontra em literatura, tem como uso micro-organismos provenientes de macroalgas, tal como fungos (MOUAD, 2014). Até o presente trabalho, não foi encontrado pesquisas com células íntegras em biocatálise referente a microalgas marinhas, especialmente no emprego da espécie *Dunaliella salina*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Estudar a viabilidade e o conseqüente potencial de microalgas marinhas da espécie *Dunaliella salina*, como biocatalisador quimiosseletivo, regiosseletivo e estereosseletivo em reação de síntese orgânica assimétrica, utilizando como substrato padrão, a cetona pró-quiral, acetofenona.

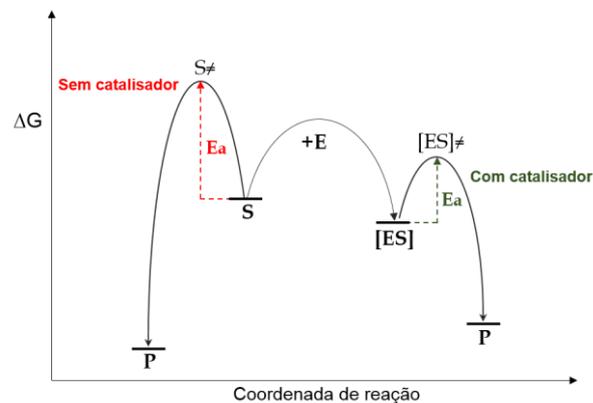
### 2.2 ESPECÍFICOS

- Desenvolver metodologia reprodutível para biorredução assimétrica da acetofenona;
- Determinar a relação entre a quantidade de substrato acetofenona e solução de microalgas a fim de possibilitar a ação enzimática das mesmas;
- Estudar a influência enzimática do metabolismo das microalgas nas reações de biocatálise do substrato acetofenona;
- Avaliar influência do tempo reacional nos processos de biocatálise do substrato acetofenona;
- Avaliar o potencial enzimático da biomassa liofilizada das microalgas na reação de biocatálise do substrato acetofenona;
- Avaliar incrementos no processo de biocatálise da acetofenona, como variação na quantidade de vitaminas e adição de CO<sub>2</sub>;
- Determinar os excessos enantioméricos do produto obtido por análise de CG-Quiral e realizar comparativo com valor de rotação específica por polarímetro;
- Identificar a configuração absoluta do produto quiral obtido mediante biocatálise.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 BIOCATALISADORES

Biocatalisadores são catalisadores naturais presentes nos organismos vivos, sendo o principal agente nas reações bioquímicas que ocorrem nos sistemas biológicos, assumindo o importante papel de promover sínteses de incontáveis moléculas, desde as mais simples até as mais complexas, catalisando a interconversão de inúmeras estruturas moleculares (OLIVEIRA; MATOVANI, 2001). Desta forma, como todo catalisador, sua função elementar é atuar na barreira imposta pela energia de ativação, agindo na cinética das reações bioquímicas a partir da aceleração das mesmas, tendo como resultado a diminuição em sua energia de ativação e consequente estabilização do estado de transição (MARZZOCO; TORRES, 1999). A Figura 1, ilustra a atuação do catalisador na obtenção de um novo “caminho” para a reação, possibilitando um novo estado de transição a partir da diminuição na energia de ativação.



**Figura 1.** Diagrama comparativo entre as energias de ativação de uma reação não catalisada e outra catalisada por enzimas

**Nota.** E = enzima; S = substrato; [ES] = complexo substrato-enzima; P = produto;  $E_a$  = energia de ativação;  $S^\ddagger$  = estado de transição do substrato;  $[ES]^\ddagger$  = estado de transição do complexo enzima-substrato; +E = adição de enzima

**Fonte.** Adaptado de Faber (2004)

Em geral, os biocatalisadores são enzimas de origem proteica, ou seja, são proteínas especializadas encontradas em células vegetais e microbianas, fontes fúngicas, micro-organismos terrestres e marinhos. Embora alguns

biocatalisadores sejam extraídos de tecidos vegetais e animais, as enzimas industrializadas são geralmente obtidas de micro-organismos provenientes de bactérias, bolores e leveduras. Estima-se que existam cerca de aproximadamente 25.000 enzimas que podem ser encontradas na natureza, onde foram identificadas em torno de 3.200 pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM) (MOUAD, 2014). Segundo a UIBBM, as enzimas podem ser classificadas em seis grupos, sendo cada uma delas organizadas em subgrupos de acordo com os tipos de reações que catalisam no sistema biológico (SAID, 2004), conforme segue descrito na Tabela 1.

**Tabela 1.** Classificação das enzimas segundo União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM)

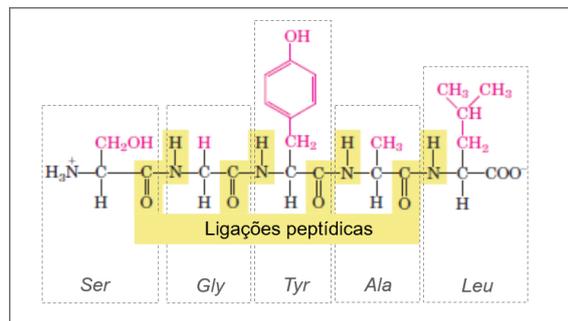
Número	Classes	Tipo de reação catalisada	Subclasse	Utilidade <sup>1</sup>
1	Oxirredutases	Oxidorredução, oxigenação de ligações C-H, C-C, C=C, ou remoção ou adição de átomos de hidrogênio equivalentes	Oxigenases, oxidases, desidrogenases e redutases	25%
2	Transferases	Reações de transferência de grupos aldeídos, cetonas, metil e fosforil	Transaldolases, transcetolases	5%
3	Hidrolases	Formação de ésteres, aminas, amidas, lactonas, epóxidos e nitrilas	Esterases, lipases, peptidases, fosfatases	60%
4	Liases	Adição-eliminação de pequenas moléculas em ligações C=C, C=N e C=O	Descarboxilases. fosfatases	7%
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro da molécula para produzir isômeros	Racemases, epimerases	2%

6	Ligases	Formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O, C-N e ésteres de fosfato	Sintetases	1%
---	---------	---	------------	----

**Fonte.** Adaptado de Faber (2004)

**Nota.** <sup>1</sup>Utilidade estimada da classe de enzimas em transformações de substratos xenobióticos (não naturais)

Por serem proteínas, as enzimas são macromoléculas orgânicas constituídas por longas cadeias de aminoácidos residuais, capazes de serem sintetizadas pelas próprias células (SAID; PIETRO, 2004). Os aminoácidos constituem blocos de construção em sua estrutura, sendo conectados através de ligações peptídicas, formadas da junção de um átomo de carbono do grupo carbonílico com um átomo de nitrogênio de um grupo  $\alpha$ -amino terminal de outro aminoácido, conforme ilustrado na representação esquemática da Figura 2 (LEHNINGER, 2000).



**Figura 2.** Representação esquemática de uma cadeia polipeptídica formada por blocos de aminoácidos *Serina (Ser)*, *Glicina (Gly)*, *Tirosina (Tyr)*, *Alanina (Ala)* e *Leucina (Leu)* respectivamente

**Fonte.** Adaptado de LEHNINGER (2000)

Assim, cada enzima (biocatalisador) contém uma sequência específica de aminoácidos, a qual constitui sua estrutura primária na forma de fita linear, e as estruturas secundárias e terciárias com formatos, respectivamente, de alfa hélices, folhas beta e globulares, altamente complexas e irregulares, conferindo às enzimas atividade biocatalítica específica (GRUNWALD 2009). Apesar da grande maioria das enzimas consistirem de origem proteica, existem certos catalisadores biológicos que são constituídos de moléculas de RNA, como o caso da enzima *ribozima* (MARZZOCO; TORRES, 1999). Geralmente há uma

enorme diferença de tamanho entre as enzimas e seus substratos, pois devido às enzimas serem macromoléculas proteicas, constituídas por centenas de aminoácidos com pesos moleculares variando entre 10.000 a alguns milhões, o peso molecular dos substratos é em sua maioria muitas vezes menor. Esta diferença pode ser observada na Tabela 2 (OLIVEIRA; MATOVANI, 2009).

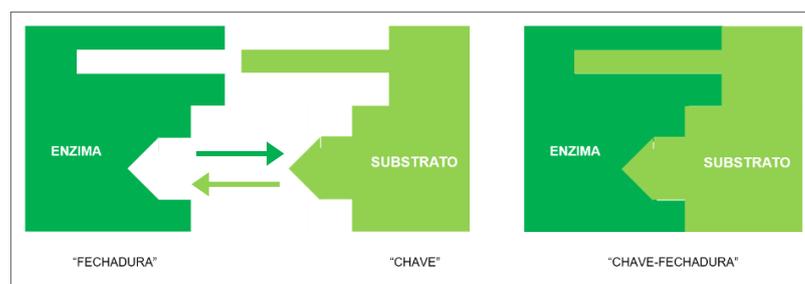
**Tabela 2.** Comparativo entre as massas moleculares dos compostos acetaldeído e a enzima álcool desidrogenase

Composto	Massa molecular
Acetaldeído	44 Da
Álcool desidrogenase	$150.10^3$ Da

**Fonte.** Oliveira e Mantovani (2009)

**Nota.** A unidade utilizada na massa molecular, corresponde a Dalton (Da) e equivale a unidade atômica (u)

Embora exista esta grande diferença de tamanho, a ligação enzima e substrato ocorre a partir de uma região bem pequena e específica da enzima, denominada de *centro ativo* ou *sítio ativo*. O centro ativo é formado por resíduos de aminoácidos que compreendem a estrutura terciária proteica da enzima com formato de cavidade, que permite através deste reconhecer o substrato. Apesar de, para um substrato ser aceito, o mesmo deva possuir a forma espacial adequada para alojar-se no centro ativo da enzima, esta relação não deve ser compreendida como um modelo rígido de encaixe, conforme proposto por Fisher (1894), onde o complexo substrato-enzima assume um mecanismo de chave-fechadura conforme ilustrado no Esquema 1.

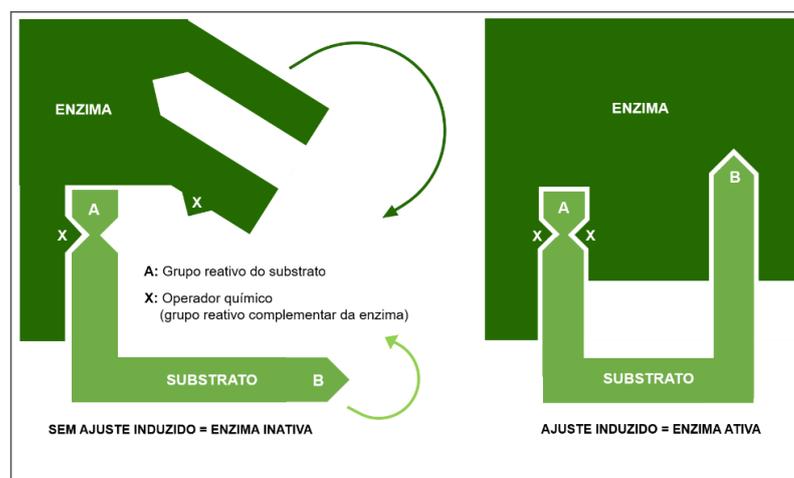


**Esquema 1.** Mecanismo de ação enzimática chave-fechadura proposta por Fisher (1894) adaptado

**Fonte.** Adaptado de Faber (2004)

Isto porque, embora este modelo seja utilizado até hoje, a interação proposta no esquema chave-fechadura, apresenta apenas a especificidade da enzima pelo substrato, mas não possibilita o entendimento acerca do mecanismo estabelecido ao longo de todo processo enzimático (MARZZOCO; TORRES, 1999). Como exemplo disso, enzimas com pequenas estruturas conseguem catalisar substratos muito maiores, enquanto em situações contrárias, a ação enzimática não ocorre. Além disso, as enzimas demonstram capacidade de catalisar não apenas substratos naturais, mas também inúmeros compostos xenobióticos que possuem tamanho e características estruturais diferentes (FABER, 2004).

Desta forma, no final da década de 1960, foi sugerido por Koshland et al. (1968) o mecanismo de ajuste induzido, que leva em consideração a mobilidade referente à estrutura das enzimas durante a interação com seu substrato. Neste modelo, a formação do complexo enzima-substrato ocorre mediante a conformação da enzima em função da estrutura do substrato, a partir da interação de seus respectivos grupos reativos de forma que o *centro ativo* da enzima envolva o substrato. Este modelo de ajuste induzido é ilustrado no Esquema 2, onde diferentemente do modelo estático chave-fechadura (Esquema 1), sugere um movimento que pode ser associado à interação entre uma luva e a mão, representando respectivamente a enzima se moldando ao substrato.

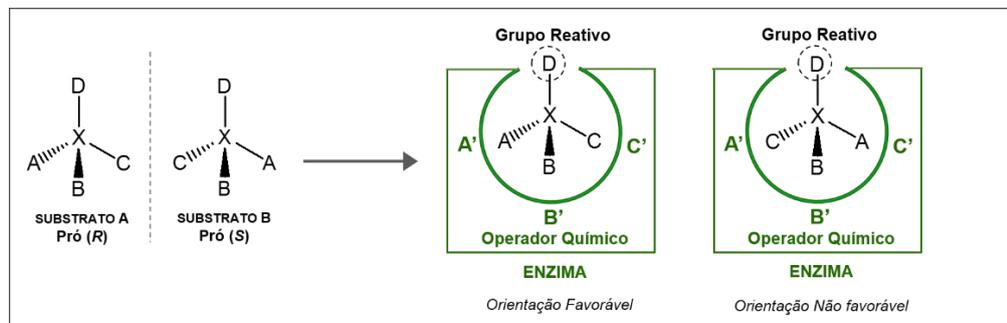


**Esquema 2.** Mecanismo de ação enzimática de ajuste induzido, proposta por Koshland et al. (1968)

**Fonte.** Adaptado de Faber (2004)

Conforme pode ser observado no Esquema 2, apesar da interação entre os grupos reativos X da enzima e A do substrato, a porção B correspondente ao substrato, obriga a enzima de ajustar sua conformação original para um novo formato, e assim obter o posicionamento dos grupos ativos X da enzima, cujo encaixe confere atividade enzimática e efetuação do processo de catálise. Caso não ocorra nenhuma mudança conformacional da enzima, ou seja, a porção B do substrato não se encaixe com a mesma, seus operadores químicos (grupos reativos X) permanecem inativos, não ocorrendo o processo de catálise (FABER, 2004).

Como consequência, a organização estrutural específica das enzimas, confere aos seus centros ativos uma elevada especificidade para catálise de seus substratos, visto que segundo sugerido por Ogston (1948), a enantiosseletividade das enzimas está relacionada aos pontos de fixação do substrato ao sítio ativo das enzimas, e pode ser esclarecida a partir da regra dos três pontos. Esta regra diz que o substrato deve ser posicionado ao menos em três diferentes pontos de fixação no *centro ativo* da enzima, de modo que assegure o reconhecimento espacial (Esquema 3).



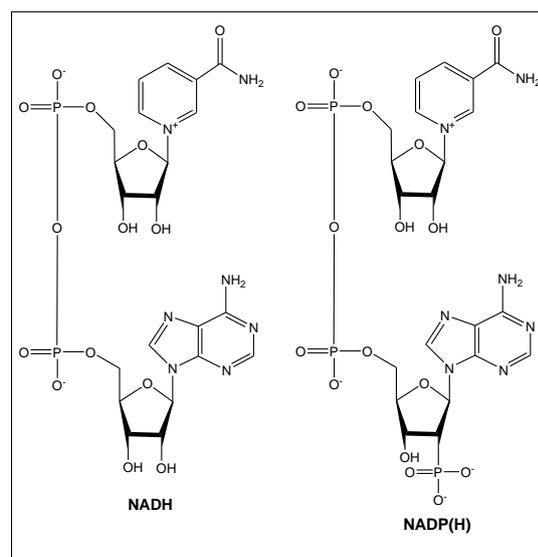
**Esquema 3.** Representação esquemática referente ao mecanismo de ação enzimática de ajuste induzido, proposta por Koshland et al. (1968)

**Fonte.** Adaptado de Faber (2004)

Conforme ilustrado no Esquema 3, podemos observar que o substrato A, pró-(R) é um bom substrato, pois permite uma ótima interação dos seus grupos A, B e C com os grupos reativos complementares A', B' e C' (operador químico) da enzima, assegurando uma orientação ideal ao grupo reativo D do substrato em relação ao operador químico da enzima, resultando em uma catálise bem sucedida. Enquanto o posicionamento do grupo reativo do substrato B pró-(S)

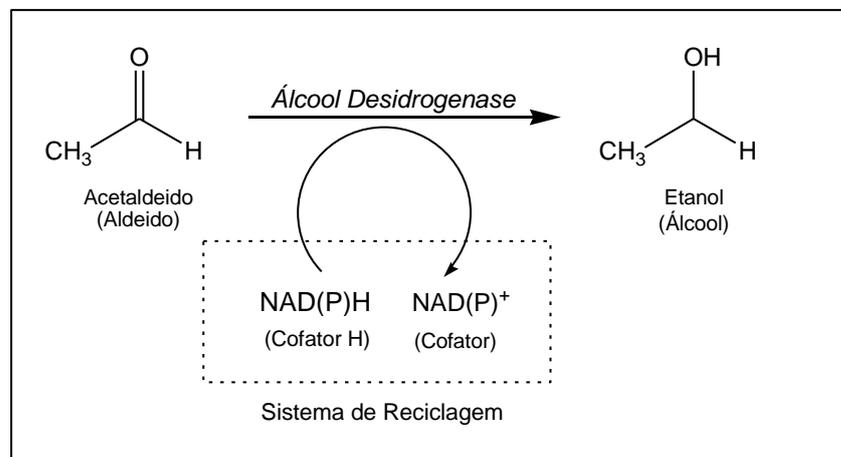
em relação ao operador químico da enzima, resulta em uma orientação não favorável dos seus sítios complementares, obtendo uma catálise deficiente. Como consequência, o substrato pró (*R*) é catalisado preferencialmente, tendo como produto majoritário e excesso enantiomérico a configuração absoluta (*R*). Diante disso, o modelo de ajuste induzido tem sido utilizado para compreender o princípio da especificidade da catálise enzimática, especialmente relacionado aos processos de biocatálise de substratos xenobióticos (YOUSEFF et al., 2003).

O processo de biocatálise para algumas enzimas não requerem nenhum tipo de grupo químico, além de seus resíduos de aminoácidos, para serem ativas. No entanto, existem espécies de enzimas que necessitam de componentes químicos adicionais, denominados cofatores, para realizarem sua atividade biocatalítica (MOUAD, 2014). Os cofatores são substâncias não proteicas, de baixa massa molecular, que fornecem os componentes químicos necessários para que as reações de biocatálise ocorram no centro ativo das enzimas. Podendo ser estes, grupos prostéticos ligados permanentemente às enzimas ou moléculas orgânicas complexas, denominadas de coenzimas (GRUNWALD, 2009). As coenzimas podem ser derivadas de vitaminas (tiamina, flavina e niacina), dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH) ou fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD(P)H) (Figura 3).



**Figura 3.** Representação esquemática da estrutura molecular das coenzimas NADH e NADP(H)  
**Fonte.** Adaptado de Mouad (2014)

Dentre as coenzimas, podemos destacar NADH e NAD(P)H, consideradas de grande importância na redução assimétrica de cetonas pró-quirais e aldeídos, em processos de biocatálise. A ação de oxirredução ocorre a partir do fornecimento de hidretos para a conversão da carbonila dos grupos cetona e aldeído em hidroxila, com alta enantiosseletividade. A atuação da NAD(P)H como coenzima no processo de biocatálise, pode ser observada na representação do Esquema 4, que ilustra a biorredução enzimática do composto acetaldeído catalisada por enzimas oxidorredutases ADH (álcool desidrogenase).



**Esquema 4.** Biocatálise do composto acetaldeído em etanol via redução enzimática com oxidorredutases (álcool desidrogenase) e cofator NAD(P)H

**Fonte.** Adaptado de FABER (2004)

Assim como as enzimas (Tabela 2), as coenzimas também podem ser classificadas de acordo com o tipo de reação que participam (OLIVEIRA; MONTOVANI, 2009), conforme segue descrito na Tabela 4.

**Tabela 3.** Coenzimas utilizadas em biocatálises conforme tipo de reação

Coenzima	Tipo de reação
NAD <sup>+</sup> /NADH	Remoção ou adição de hidreto
NADP <sup>+</sup> /NADPH	
ATP	Fosforilação
SAM	C1 - Alquilação
Acetil-CoA	C2-Alquilação

Flavinas	Oxigenação
Pirodoxal-fosfato	Transaminação
Biotina	Carboxilação
Complexos metal-porfirina	Peroxidação e oxigenação

**Fonte.** Oliveira e Mantovani (2009)

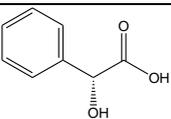
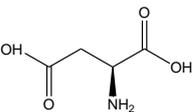
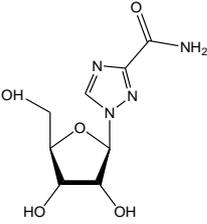
As vantagens no uso de enzimas como biocatalisadores estão relacionadas diretamente ao seu potencial catalítico, cujo principal fator está em sua especificidade nas transformações de substratos xenobióticos com quimiosseletividade, regioseletividade e enantiosseletividade. A quimiosseletividade está vinculada a capacidade de atuação preferencial da enzima em grupos funcionais específicos, mantendo as demais funcionalidades presentes no substrato inalteradas. Enquanto a regioseletividade, a enzima atua na diferenciação de grupos funcionais idênticos conforme ambiente químico em que estão localizados os substratos. Por último, a enantiosseletividade, uma das características mais importantes presentes nas enzimas (Esquema 3), se resume na capacidade da enzima em diferenciar um enantiômero do outro, produzindo compostos enantiomericamente puros, pois são considerados catalisadores quirais e, portanto, reconhecem em seu sítio ativo, substratos quirais e pró-quirais (ARAÚJO, 2010).

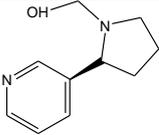
Diante do exposto, a possibilidade de produzir compostos enantiomericamente puros por biocatalisadores renováveis, via rota enzimática, com alto nível de especificidade, em condições aquosas e brandas de temperatura, pressão e pH, motivaram uma ampla busca por novas fontes biocatalíticas, tornando a biocatálise essencial para o desenvolvimento de pesquisas acadêmicas em síntese orgânica, sobretudo no campo da indústria farmacêutica, alvo na obtenção de produtos bioativos com alta pureza enantiomérica. Aplicações de enzimas e processos de biocatálise com células inteiras para produção de diversos tipos de substâncias químicas e biológicas tornaram-se uma tecnologia comprovada em indústrias químicas e farmacêuticas, devido as características apresentadas, tal como redução no tempo de processo e também de etapas de reação, resultando consequentemente na diminuição de resíduos (CHOI, et al., 2015).

### 3.2 BIOCATÁLISE E QUÍMICA VERDE

Perante as questões ambientais que estão presentes em nosso cotidiano, as indústrias vêm cada vez mais buscando processos denominados de ambientalmente limpos, que sejam capazes de reduzir a quantidade de efluentes poluentes e a geração de resíduos tóxicos. Neste sentido, os biocatalisadores apresentam-se como potencial alternativa pois são altamente seletivos e capazes de minimizar a formação de resíduos, permitindo sua reutilização e possibilitando benefícios econômicos, sobretudo ambientais (GRUNWALD, 2009). Desta forma, a biocatálise e a biotransformação são considerados processos biotecnológicos em ascensão nos setores industrial e acadêmico, visto que este fato pode ser observado não somente pelo crescente aumento no número de publicações científicas, mas como também a presença de processos biocatalíticos nas indústrias químicas (Tabela 4). Empresas como BASF, DSM, Yamasa e Lonza já desenvolvem e aplicam processos biocatalíticos em produção de larga escala em um número considerável de blocos de construção opticamente ativos (OLIVEIRA; MATOVANI, 2009).

**Tabela 4.** Compostos intermediários quirais produzidos em larga escala por indústrias químicas

Compostos	Estrutura	Reação	Biocatalisador (enzimas)	Empresa
Ácido ( <i>R</i> )-mandélico		Hidrólise	Nitrilase	BASF
Ácido <i>L</i> -aspártico		Adição de amônia	Liase	DSM
Antiviral ribavarina		Hidrólise	Fosforilase	YAMASA

6-hidróxi-S-nicotina		Adição de água	Célula íntegra (hidrolase)	LONZA
----------------------	---	-------------------	-------------------------------	-------

**Fonte.** Oliveira e Mantovani (2009) adaptado

A descoberta de que sistemas enzimáticos são capazes de produzir transformações estruturais mais seletivas e/ou mais complexas, em condições mais brandas e ecologicamente corretas, contribuíram para que a biocatálise ocupasse importante papel no desenvolvimento de tecnologias sustentáveis alinhadas aos princípios da “*Química Verde*”. O termo *Química Verde*, *Química Ambiental* ou *Química para o Desenvolvimento Sustentável* segundo publicação *Química Verde no Brasil: 2010-2030* (2010) é definido como um campo emergente, cuja finalidade se traduz em conduzir ações científicas e/ou processos industriais ecologicamente corretos, conectando os interesses da inovação química de forma simultânea com os objetivos da sustentabilidade ambiental e de caráter industrial e econômico. O motivo pelo qual a química vem assumindo tamanha importância nestas últimas décadas deve-se ao fato de que a mesma está relacionada com a maioria dos processos que impactam o meio ambiente e conseqüentemente setores vitais da economia como agronegócio, fármacos e combustíveis (*Química Verde no Brasil: 2010-2030*, 2010).

O desenvolvimento da *Química Verde* teve início nos anos 1990, principalmente nos Estados Unidos, Inglaterra e Itália com a introdução de novos conceitos e valores para as diversas atividades fundamentais da química, juntamente com suas relativas atividades industriais e econômicas, onde posteriormente a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) e Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), estabeleceram suas diretrizes em nível mundial. Dentre seus princípios, podemos destacar a busca em promover reações químicas a partir de reagentes catalíticos, os quais induzam à produção de compostos orgânicos de forma seletiva, minimizando desta maneira, a formação de subprodutos (*Química Verde no Brasil: 2010-2030*, 2010).

Conseqüentemente, a biocatálise vem se destacando neste sentido, como uma alternativa ambientalmente correta na síntese de diversos compostos orgânicos (CAO et al., 2013). Embora as reações de biocatálise ocorram

naturalmente em sistemas biológicos, as mesmas podem atuar com substratos xenobióticos, considerados compostos estranhos e não naturais de seu sistema bioquímico (MILETÍC et al., 2009). A biocatálise pode ser empregada a partir de organismos inteiros, células integras, micro-organismos em fase de crescimento, assim como enzimas imobilizadas em suportes poliméricos ou isoladas, onde dependendo da espécie, há necessidade do uso de cofatores (item 3.1, p.0), conforme segue descrito na Tabela 5 com suas respectivas vantagens e desvantagens.

**Tabela 5.** Parâmetros de comparação entre células em repouso e fase de crescimento em reações de biocatálise

Biocatalisador	Forma	Vantagens	Desvantagens
Enzimas isoladas	Qualquer	Aparelhos e processamentos simples, melhor produtividade devido a maior tolerância a concentração	Necessidade de reciclagem do cofator
	Dissolvida em água	Alta atividade enzimática	Possíveis reações laterais, substratos lipofílicos insolúveis, processamento requer extração
	Suspensão em solvente orgânico	Fácil realização e tratamento, substratos lipofílicos solúveis e simples recuperação de enzimas	Atividades reduzidas
Células inteiras	Imobilizado	Simple recuperação enzimática	Perda de atividade durante imobilização
	Qualquer	Não há necessidade de cofatores	Baixa tolerância a solventes orgânicos e possíveis reações secundárias oriundas do

		metabolismo descontrolado
Cultura em crescimento	Alta atividade enzimática	Grande quantidade de biomassa e subprodutos, difícil controle de processo
Células em repouso	Facilidade de trabalho e menor geração de subprodutos	Menor atividade enzimática
Células imobilizadas	Possível reutilização das células	Menor atividade enzimática

**Fonte.** Adaptado de Faber (2004)

Segundo a literatura (FABER, 2004), o uso de células em fase de crescimento é utilizado a partir da adição de substratos ao meio de cultura, simultaneamente à inoculação, ou durante a fase de crescimento do micro-organismo. Enquanto o uso das células em repouso, o micro-organismo é cultivado até seu crescimento máximo, onde a biomassa é separada e reinserida ao meio de cultivo, com posterior adição de substratos e solventes. O emprego de células em repouso e células em fase de crescimento são geralmente descritos, respectivamente, em termos de enzimação e fermentação (FABER, 2004) (Tabela 6).

**Tabela 6.** Parâmetros de comparação entre células em repouso e fase de crescimento em reações de biocatálise

Parâmetros	Enzimação	Fermentação
Micro-organismo	Células em repouso	Células em crescimento
Tipo de reação	Curta, catalítica	Longo, processo de vida
Número de etapas de reação	Poucas	Muitas
Número de enzimas ativas	Poucas	Muitas
Produto	Natural e sintético	Somente natural
Tolerância a concentração	Alta	Baixa
Isolamento do produto	Fácil	Tedioso
Subprodutos	Pouco	Muito

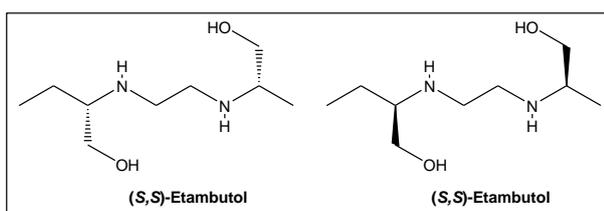
**Fonte.** Adaptado de Faber (2004)

Estas reações de biocatálise podem ser projetadas considerando o produto de interesse e a classe enzimática responsável por sua produção, sendo facilmente executáveis em laboratório, devido a sua realização em meio aquoso e geração de resíduos biodegradáveis. Logo, o uso de materiais vegetais, microorganismos terrestres e marinhos como fontes biocatalíticas são, em contrapartida, uma alternativa viável em relação às reações químicas clássicas que requerem o uso de reagentes tóxicos e metais pesados, cujos descartes resultam em grandes impactos ao meio ambiente (SALVANO et al., 2011).

### 3.3 ALCOÓIS QUIRAIS A PARTIR DE CETONAS PRÓ-QUIRAIS VIA BIOCATÁLISE ENZIMÁTICA

Os álcoois quirais são compostos de grande importância para indústria em variados setores, como agroquímico, cosmético, sobretudo o farmacêutico, onde a quiralidade é essencial na obtenção de produtos com aplicação biotecnológica como fármacos, fragrâncias e agroquímico, que dependem da predominância de um dos enantiômeros para sua respectiva atividade e consequente aplicação (MOUAD, 2014).

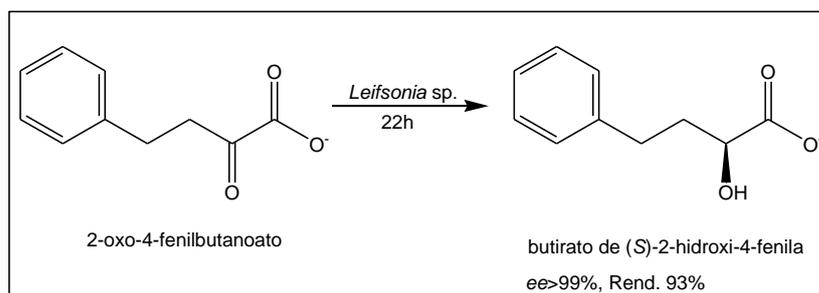
Isto se deve à bioatividade do enantiômero estar associada à sua atividade óptica, em que sua configuração absoluta irá determinar não somente sua atividade biológica, mas como também estabelecer sua ação toxicológica. Este fato pode ser observado para o fármaco *Etambutol*, no qual um de seus enantiômeros, neste caso o (*S,S*) é utilizado como fármaco no tratamento para tuberculose, enquanto o outro enantiômero (*R,R*) é tóxico, sendo capaz de provocar cegueira (SOUZA; VASCONCELLOS, 2005). A estrutura química do fármaco *Etambutol* com seus respectivos enantiômeros seguem ilustrados na Figura 4.



**Figura 4.** Representação da estrutura molecular dos enantiômeros do fármaco *Etambutol*

**Fonte.** Adaptado de Mouad (2014)

Para a área de biotecnologia, esta característica é de extrema importância biológica, uma vez que a maioria dos receptores endógenos de fármacos, como proteínas e enzimas, são compostos quirais constituídos por *L*-aminoácidos, portanto, sua quiralidade inerente, viabiliza a ocorrência de ligações específicas entre seu centro ativo e o substrato para formação do produto de interesse (LENHINGER, 2000). Neste cenário, as enzimas ADH são grande alvo de pesquisa nos setores acadêmicos e industriais, na redução assimétrica de cetonas pró-quirais, produzindo além de álcoois quirais, precursores de moléculas ativas mais complexas conhecidos como blocos de construção quiral (“*chiral building blocks*”) (NAKAMURA et al, 2003). Um importante bloco de construção quiral, utilizado na produção de fármacos com ação hipertensiva, foi obtido a partir da redução assimétrica utilizando o fungo *Leifsonia* sp., decorrendo no produto butirato de (*S*)-2-hidroxi-4-fenila com resultado de excesso enantiomérico acima de 99% (ZHENG; XU, 2011), conforme ilustrado no Esquema 5.

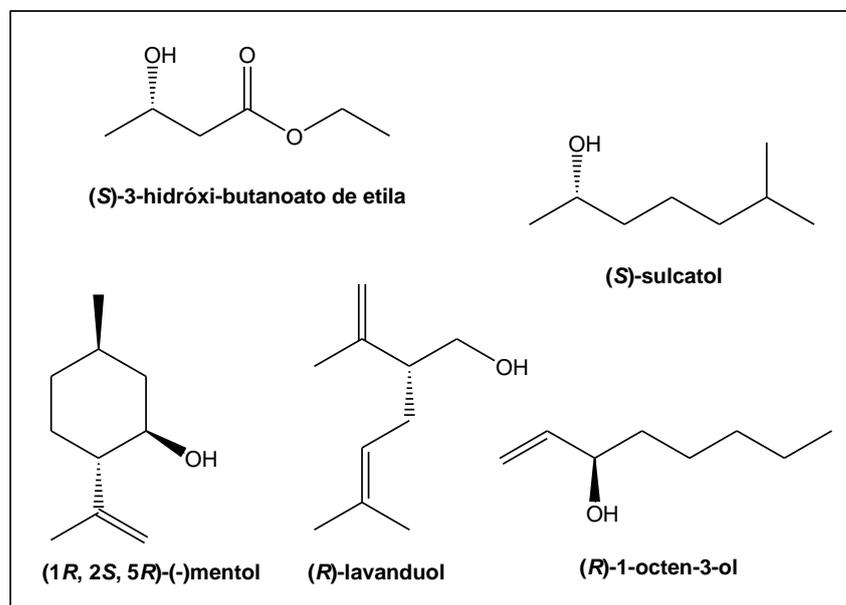


**Esquema 5.** Obtenção do álcool quiral (*S*)-2-hidroxi-4-fenila via redução enzimática assimétrica com fungos *Leifsonia* sp.

**Fonte.** Adaptado de Mouad (2004)

Podemos citar outros exemplos de álcoois quirais provenientes de cetonas pró-quirais, como o (*S*)-3-hidróxi-butanoato de etila (Figura 5), um dos álcoois quirais mais utilizados como precursor em síntese orgânica; o (*S*)-sulcatol (Figura 5), importante insumo para a síntese de diversos produtos naturais e (*R*)-lavanduol (Figura 5), indispensável aditivo na indústria de perfumes (TEMBA; OLIVEIRA; DONNICI, 2003). Existe também a classe dos terpenos, como o (1*R*, 2*S*, 5*R*)-(-)-mentol (Figura 5), um álcool quiral comumente utilizado na qualidade de aromatizante, devido ao seu efeito refrescante e o feromônio (*R*)-1-octen-3-ol

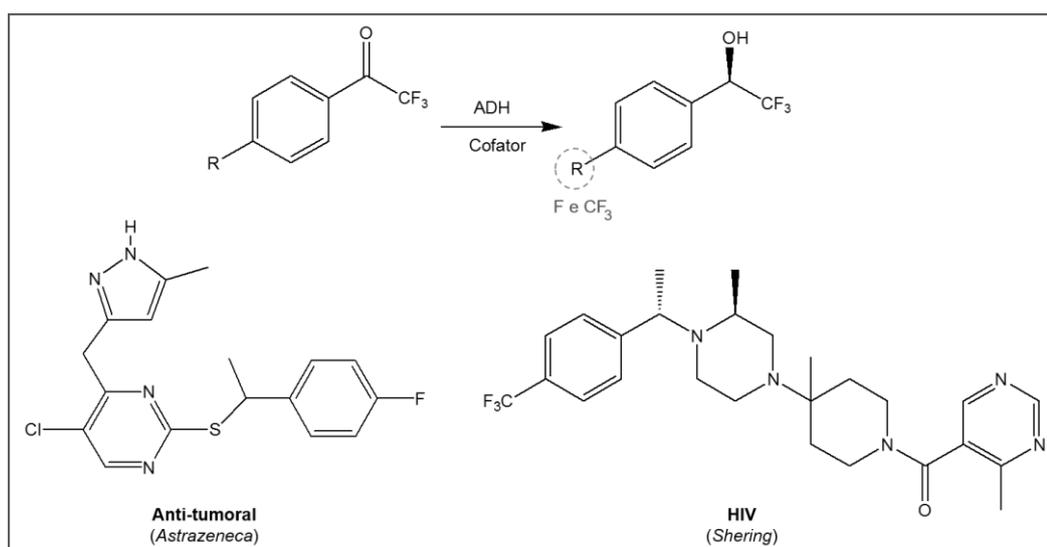
(Figura 5), utilizado no estudo com mosquitos (TEMBA; OLIVEIRA; DONNICI, 2003).



**Figura 5.** Representação da estrutura molecular dos enantiômeros (S)-3-hidróxi-butanoato de etila, (S)-sulcatol, (1R, 2S, 5R)-(-)-mentol, (R)-lavanduol e (R)-1-octen-3-ol

**Fonte.** Adaptado de Souza (2012)

A Figura 6 ilustra a biorredução assimétrica das cetonas pró-quirais fluoradas com suas respectivas ações como bloco de construção quiral.



**Figura 6.** Representação das estruturas químicas dos álcoois quirais 1-(4-fluorofenil) etanol e 1-(4-trifluorofenil), juntamente com suas ações como bloco de construção quiral

**Fonte.** Adaptado de Mouad (2014)

As cetonas 2,2,2-trifluoro-1-(4-fluorofenil) etanona e 2,2,2-trifluoro-1-(4-(trifluorometil)fenil) etanona tem sido objetos de estudos biocatalíticos, em que são utilizados enzimas ADH na biorredução de tais substratos nos respectivos álcoois quirais, para serem utilizados como blocos de construção de moléculas bioativas, em fármacos de ação antitumorais e no tratamento de síndrome de imunodeficiência adquirida (HIV) (HOFF e SUNDBY, 2013).

Neste sentido, vem se buscando cada vez mais o emprego de células íntegras, de origem vegetal e de micro-organismos terrestres e marinhos, como potenciais biocatalisadores na produção de álcoois quirais, a partir de cetonas pró-quirais. Visto que, por possuírem em sua constituição intrínseca as enzimas ADH, juntamente com seus cofatores e sistemas naturais de regeneração, seu emprego conduz a soluções economicamente viáveis e de baixo custo financeiro (ZILBEYAZ e KURBANOGLU, 2008).

Com intuito de desenvolver processos enzimáticos mais simples, a utilização de raízes da espécie *Daucus carota* (cenoura), surgiu como uma das primeiras aplicações de células íntegras como biocatalisador. Este sistema se diferencia do uso de sistemas com células inteiras de micro-organismos e enzimas isoladas, despertando o interesse de diversos pesquisadores em investigar a potencialidade de plantas frescas e intactas como fonte de biocatalisadores. (CORDELL et al., 2007). Yadav et al. (2002), utilizando raízes de *Daucus carota* como biocatalisador, obtiveram álcoois quirais a partir de diferentes cetonas pró-quirais ( $\alpha$ -azido aril,  $\beta$ -ceto-ésteres, alifáticas cíclicas e acíclicas), com rendimentos químicos e excessos enantioméricos excelentes (Tabela 7).

**Tabela 7.** Resultados da reação de biocatálise assimétrica com diferentes espécies de acetofenona empregando como catalizador raízes da espécie *Daucus carota* (YADAV et al., 2002)

Composto	Massa (%)	ee (%)	Configuração absoluta
Acetofenona	73	92	S
<i>p</i> -cloro-acetofenona	76	95	S
<i>p</i> -bromo-acetofenona	61	95	S

<i>p</i> -fluoro-acetofenona	80	90	S
<i>p</i> -nitro-acetofenona	82	96	S
<i>p</i> -metil-acetofenona	75	92	S
<i>p</i> -metoxi-acetofenona	72	94	S
<i>p</i> -hidroxi-acetofenona	73	91	S
Etil-acetoacetato	58	95	S
4-cloro-3-oxo-butanoato de etila	50	90	S
1-tetralona	52	96	S
2-tetralona	58	95	S

**Fonte.** Adaptado de Yadav et al. (2002)

Desde então, diversos trabalhos de investigação no emprego de células íntegras vêm sendo realizados, conforme podemos observar no trabalho de MACHADO et al. (2006), onde raízes das espécies de *Manihot esculenta* (mandioca) e *Manihot dulcis* (macaxeira) foram empregadas em reações de bio-redução de diferentes tipos de cetonas (alifáticas, cíclicas e  $\alpha,\beta$ -insaturadas). Embora as cetonas esteroidais não tenham sido reduzidas, para os demais substratos foram apresentados resultados promissores com excessos enantioméricos acima de 97%.

Outras fontes enzimáticas de células íntegras, além de raízes, também são encontradas, como descrito o trabalho de Fonseca et al. (2008), onde é avaliado o potencial catalítico da água de coco (região do estado do Ceará), na redução de cetonas alifáticas, cíclicas e aromáticas.

Neste estudo, foram obtidos excessos enantioméricos moderados a excelentes (56 - 99%). Demais fontes de plantas ou derivados, como caldo de cana (*Saccharum officinarum*) e feijão (*Vigna unguiculata*), também são encontrados em trabalhos de Assunção et al. (2008) e Bizerra et al. (2010), respectivamente, com a biorredução de uma série de cetonas, apresentando resultados promissores de rendimentos e enantiosseletividades.

Estudos de plantas herbáceas de Takeda et al. (2011), a partir da espécie *Arabidopsis thaliana* com cetonas assimétricas aromáticas e alifáticas, apesar de apresentarem moderadas conversões, demonstraram excessos enantioméricos promissores (40 a 95%). A Figura 7 ilustra a reação de biocatalise de cetonas via espécie *Arabidopsis thaliana* com cetonas assimétricas aromáticas e alifáticas.



antibacteriana, anticancerígena, antioxidante, etc.), mas também são capazes de produzir agentes fotoprotetores, conforme observado em algas marinhas da espécie *Coralina pilulifera* (KIRKWOOD, 2002).

Desta forma, a bioprospecção da biodiversidade marinha com ações enzimáticas representa, sem dúvida, um ambiente com grande potencial para síntese química, pois seus micro-organismos, esponjas, moluscos e algas marinhas podem oferecer uma diversidade de atividades enzimáticas capazes de realizar reações de biotransformação de variados substratos de interesse (DA MATA et al., 2011).

Algas, esponjas, ascídias, corais e outros organismos marinhos, devidos a propriedades adquiridas como resultado de milhões de anos de evolução, desenvolveram mecanismos de defesa, adaptação e preservação da própria espécie, que diferentemente dos organismos terrestres, são capazes de sobreviverem em condições inóspitas, com limitações de nutrientes e ambientes que necessitem competição de espaço (DEBASHISH et al., 2005). Portanto, tais características adquiridas por estes organismos marinhos, são de grande importância em biotecnologia, pois possibilitam a interação com uma extensa variedade de substratos xenobióticos em condições extremas, como também apresentam potencial de cultivo em larga escala.

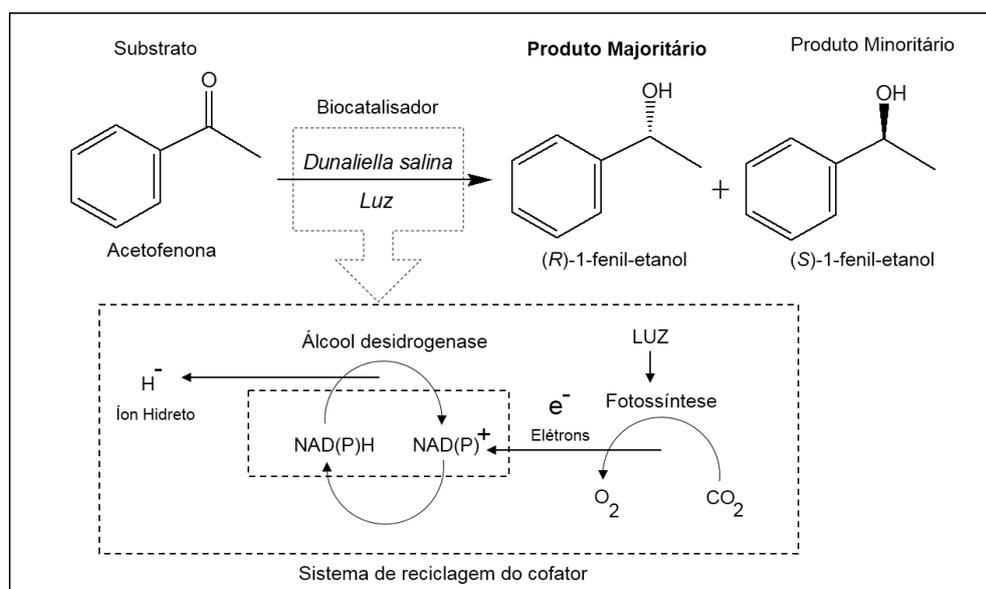
Segundo Trincone (2011), no período entre 1973 a 2007, os micro-organismos marinhos foram objetos de diversas patentes, onde 53% correspondiam ao setor químico e 33% ao setor farmacêutico, seguidos dos setores alimentícios, cosméticos e agroquímicos. Devido à diversidade enzimática presente nos organismos marinhos, enzimas como a oxirredutase tem sido objeto de pesquisa nas áreas acadêmicas e industriais, sobretudo na farmacêutica.

Estudos sobre biorreduções de cetonas pró-quirais, com base em micro-organismos marinhos, são cada vez mais presentes na literatura, conforme observado na redução assimétrica do composto 2,3,4,5,6-pentafluoracetona, através do micro-organismo marinho *Synechococcus*, que levou ao produto com rendimento e excesso enantiomérico acima de 90 % (Esquema 6) (NAKAMURA et al., 2003).



solventes apolares, sendo empregados diversos tipos de solventes para cetonas que apresentam baixa solubilidade em soluções aquosas tamponadas.

Diante da diversidade enzimática de micro-organismos marinhos, o potencial foto-biocatalítico vem sendo explorado, a partir de cianobactérias e microalgas marinhas. Estudos da literatura (CHEN et al., 2013) vem demonstrando a redução enantiosseletiva do grupo carbonílico pró-quiral de cetonas e aldeídos, mediante a presença de enzimas ADH intracelulares em diversas espécies de microalgas. Esta reação ocorre a partir da oxidação do cofator NAD(P)H em NADP<sup>+</sup>, decorrente da doação do íon hidreto ao grupo carbonílico pró-quiral, onde o NADP<sup>+</sup> oxidado é diretamente regenerado a NAD(P)H, através da absorção de luz e transferência de elétrons, proveniente da reação de fotossíntese das microalgas (BARSANTI; GUALTIERI, 2006) (Esquema 8).



**Esquema 8.** Representação esquemática do processo de fotobiocatálise com seu sistema de regeneração do cofator

**Fonte.** Autor (2017)

Neste cenário, diversas espécies de microalgas marinhas (eucarióticas e procarióticas) vem sendo empregadas na biorredução de cetonas pró-quirais e aldeídos. Um dos primeiros relatos sobre a utilização de células de microalgas marinhas em reações de biocatálise, foi a conversão do composto di-hidroxi-acetona em (R)-1,2-propanodiol com 75% de excesso enantiomérico, a partir de

células imobilizadas da espécie *Dunaliella parva* (HATANAKA, 1999). Hook et al. (2002) realizaram estudo da biorredução de cetonas pró-quirais alifáticas e aromáticas com cinco espécies de microalgas marinhas, *Dunaliella parva*, *Chlorella minutissima*, *Porphyridium purpureum*, *Isochrysis galbana*, e *Nannochloris atomus*, obtendo 65 a 97% de excessos enantioméricos, com destaque para as três últimas espécies descritas. Estudos mais recentes (CHEN; ZHANG et al., 2013), apresentam resultados promissores para as diferentes espécies de microalgas, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis*, *Anabaena flosaquae*, *Synechocystis sp.*, em reações de biorredução de cetonas pró-quirais, gerando os respectivos álcoois em rendimentos de até 70% e excessos enantioméricos acima de 90%.

Apesar do Brasil possuir uma ampla faixa territorial costeira, com extensão de aproximadamente 7.400km, composta por diversos ambientes marinhos, com grande riqueza em seu ecossistema e diversidade biótica (LONGO; FILHO, 2014), poucos trabalhos de pesquisas são encontrados na literatura sobre atividade enzimática de algas e microalgas marinhas e seus micro-organismos associados, sobretudo quando se trata de pesquisas com células íntegras. Com rara exceção, encontramos pesquisas com redução enzimática a partir de fungos marinhos, isolados da alga *B. radicans* na biocatálise de iodo-fenonas (MOUAD et al., 2011) e fluoro-acetofenonas (MOUAD, 2014), para produção de álcoois quirais organiodados e organofluorados, onde em ambos os casos foram obtidos álcoois com elevados excessos enantioméricos.

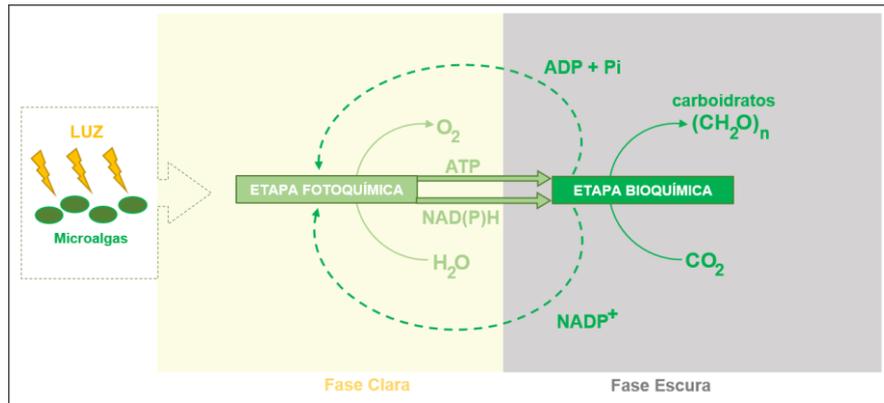
Próximo de nosso conhecimento, temos o trabalho desenvolvido recentemente pelo Grupo de Pesquisa em Síntese Química e Bioatividade Molecular (GPSQ) do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia (UFBA), referente ao emprego de células íntegras de esponja marinha da espécie *Cliona varians* como biocatalisador em reações de biorredução para obtenção de intermediários sintéticos quirais, alcançando resultados de excessos enantioméricos promissores (SOUSA, 2017).

### 3.5 MICROALGAS

Segundo ficologia, área da botânica especializada no estudo de algas, o termo alga se refere a todo organismo que possui um talo não diferenciado em raiz, caule, folhas, e moléculas de clorofila *a* (pigmento fotossintetizante) em sua constituição, que possibilitam a realização de fotossíntese oxigênica (LEE, 2008; MUTANDA et al., 2011). As algas representam um grupo de organismos que abrange uma enorme diversidade morfofisiológica e genética, incorporando organismos microscópicos e macroscópicos (ANDRADE et al., 2014). Segundo estimado por Barsanti e Gualtieri (2006), o número de espécies de algas existentes chegam a cerca de aproximadamente 10 milhões, em que a maioria destas, são de microalgas.

As microalgas são micro-organismos fotossintetizantes que compreendem seres procarióticos (não possuem núcleo celular), representados pelas cianobactérias, e seres eucarióticos (possui núcleo celular) representados pelas clorófitas, onde sua principal estrutura é denominada de talo, variando seu tamanho entre 0,2  $\mu\text{m}$  a 2,0  $\mu\text{m}$ , podendo apresentar flagelos e conferir mobilidade (motilidade) em algumas espécies de microalgas. A fotossíntese realizada pelas microalgas é oxigênica e consiste em uma reação de oxirredução, cuja energia luminosa absorvida é convertida em energia química, promovendo a conversão do  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  em carboidratos e  $\text{O}_2$  (BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

A reação compreende duas fases, a clara representada pela reação fotoquímica e a escura, representada pela reação bioquímica, onde esta, independe da presença de luz e ocorre simultaneamente à fase clara (ANDRADE et al., 2014). A fase clara é caracterizada pela absorção de luz, seguida da transferência de elétrons e translocação de prótons, resultando na produção de NADP(H), ATP e  $\text{O}_2$  (ANDRADE et al., 2014). Enquanto na fase escura ou bioquímica, o NADP(H) e o ATP produzidos na fase clara, são utilizado na conversão do  $\text{CO}_2$  em carboidratos  $(\text{CH}_2\text{O})_n$  (ANDRADE et al., 2014). O Esquema 9, ilustra o processo de fotossíntese oxigênica realizado pelas microalgas na fase clara e escura respectivamente.



**Esquema 9.** Representação esquemática do processo de fotossíntese oxigênica realizado pelas microalgas ao longo da fase clara e escura respectivamente

**Fonte.** Autor (2017)

A morfologia das microalgas é variada, podendo ser unicelular, cenobial, filamentosa e sifonosa (BARSANTI; GUALTIERI, 2006), onde sua caracterização é determinada por diferentes atributos morfológicos, de composição bioquímica (especialmente os pigmentos), cloroplastos, ultraestrutura celular, ciclo de vida e dados da sequência do genoma (ANDERSEN, 2004). Nesta perspectiva, a classificação das microalgas é decorrente de diversos aspectos citológicos e morfológicos, tais como ocorrência de células flageladas e estrutura de seus flagelos, processos de formação do núcleo e de sua divisão celular, presença e caracterização de envoltório do cloroplasto (HU et. al., 2004; TOMASELLI, 2004). Incluem também os diferentes tipos de pigmentos presentes nas células e a natureza química dos produtos de reserva e dos constituintes da parede celular das microalgas (ANDRADE et al., 2014). Segundo proposto por Hoek (1995), a classificação das microalgas engloba 11 divisões e 30 classes, distribuídos nos domínios *Bacteria* (procarionte) e *Eucarya* (eucarionte), conforme segue descrito na Tabela 8.

**Tabela 8.** Principais grupos de microalgas dos domínios *Bacteria* e *Eucarya*

Domínio	Divisão	Classe
<i>Bacteria</i>	<i>Cyanophyta</i>	<i>Cyanophyceae</i>
	<i>Prochlorophyta</i>	<i>Prochlorophyceae</i>
	<i>Chlorophyta</i>	<i>Prasinophyceae</i>
		<i>Chlorophyceae</i>

	<i>Ulvophyceae</i>
	<i>Cladophorophyceae</i>
	<i>Bryopsidophyceae</i>
	<i>Dasicladophyceae</i>
	<i>Klebsormidiophyceae</i>
	<i>Trentepohliophyceae</i>
	<i>Pleurastrorhynchophyceae</i>
	<i>Zygnematophyceae</i>
	<i>Charophyceae</i>
<i>Heterokontophyta</i>	<i>Crysophyceae</i>
	<i>Parmophyceae</i>
	<i>Sarcinochrysidophyceae</i>
	<i>Xanthophyceae</i>
	<i>Eustigmatophyceae</i>
	<i>Bacillariophyceae</i>
	<i>Dictyochophyceae</i>
	<i>Phaeophyceae</i>
<i>Euglenophyta</i>	<i>Euglenophyceae</i>
<i>Rhodophyta</i>	<i>Bangiophyceae</i>
	<i>Florideophyceae</i>
<i>Haptophyta</i> ( <i>Prymnesiophyta</i> )	<i>Haptophyceae</i>
<i>Cryptophyta</i>	<i>Cryptophyceae</i>
<i>Glaucophyta</i>	<i>Glaucophyceae</i>
<i>Dinophyta</i>	<i>Dinophyceae</i>

---

**Fonte.** Adaptado de Andrade et al. (2014)

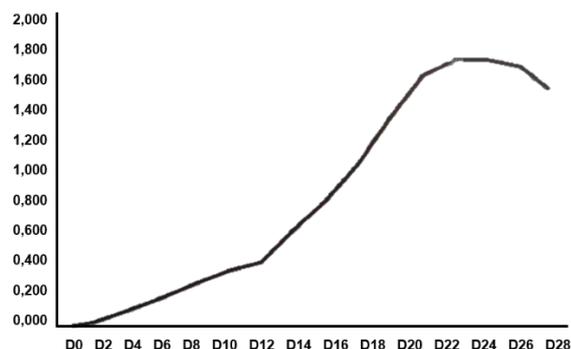
O crescimento das microalgas depende de fatores biológicos e físico-químicos, em que estão relacionados respectivamente as taxas metabólicas das diferentes espécies, influência de outros tipos de micro-organismos sobre seu desenvolvimento, condições de concentração de nutrientes, salinidade, iluminação, pH, aeração e temperatura do meio de cultura (ANDRADE et al., 2014). Seu crescimento pode ser caracterizado por 5 fases distintas, seguidas respectivamente de adaptação ou indução do crescimento, crescimento exponencial, redução de crescimento ou transição, crescimento estacionário e declínio ou morte celular (Tabela 9, Gráfico 1) (ANDRADE et al., 2014).

**Tabela 9.** Descrição das principais características referente a cada fase de crescimento exponencial em cultivos de microalgas

Fases de crescimento	Características
Lag ou adaptação	Intensa atividade metabólica, caracterizada principalmente pela síntese de DNA e enzimas, seguido no aumento da biomassa com aumento na densidade e volume celular
Log ou crescimento exponencial	Aumento da taxa de crescimento com valor constante, maior atividade metabólica, excreção de compostos orgânicos no meio de cultivo e duração viável conforme disponibilidade de nutrientes essenciais no meio
Redução de crescimento ou transição	Redução relativa na taxa de crescimento, grande volume de biomassa, estado fisiológico da população menos favorável ao crescimento e difícil de ser detectada devido à semelhança com suas fases adjacentes
Estacionária ou equilíbrio	Diminuição na velocidade de crescimento, tornando-se estável e mais baixa, a quantidade de células mortas é equivalente à de células novas, grande volume de biomassa e excreção de metabólitos, onde geralmente é a fase com maior duração ao longo do processo de crescimento
Declínio ou morte celular	Morte das células, taxa negativa de crescimento, onde o número de células mortas excede as de células novas, presença de auto inibidores de crescimento com duração variável e altamente dependente da espécie

**Fonte.** Adaptado de Andrade et al. (2014)

**Gráfico 1.** Curva de crescimento da microalga clorófito *Neochloris oleoabundans* em sistema fechado a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12h, durante 28 dias com agitação



**Fonte.** Adaptado de Andrade et al. (2014)

Devido sua intensa versatilidade metabólica, as microalgas conseguem alterar rapidamente seu metabolismo como resposta às intempéries em que são submetidas, sendo capazes de ajustar com facilidade as condições ambientais de seu meio de cultura, através de mecanismos de aclimação bioquímica e fisiológica (MATA et al., 2010). Essa variabilidade metabólica das microalgas, se traduz em sua capacidade de sobreviver em diferentes habitats e serem encontradas além de ecossistemas marinhos, tal como em dulcícolas (ecossistemas de água doce) e ambientes terrestres úmidos, resultado de sua adaptabilidade em meios inóspitos (MATA et al., 2010).

Neste sentido, apesar das microalgas serem primariamente fotoautotróficas, obtenção de energia a partir de luz e fonte de carbono inorgânico (CO<sub>2</sub>), estudos taxonômicos (organismos biológicos) e bioquímicos têm demonstrado que as microalgas também podem apresentar outras modalidades de metabolismo ao longo de seu desenvolvimento (ANDRADE et al., 2014). Yang (2000) e Chojnacka e Marquez-Rocha (2004) classificam o metabolismo das microalgas em quatro grupos, de acordo com a forma de obtenção de energia e fonte de carbono (Tabela 10).

**Tabela 10.** Variabilidade metabólica das microalgas em relação à fonte de energia e carbono

Metabolismo	Fonte de energia	Fonte de carbono
Fotoautotrófico	Luz	Inorgânica
Heterotrófico	Compostos orgânicos	Orgânica
Mixotrófico	Luz e compostos orgânicos	Inorgânica e orgânica
Fotoheterotrófico	Luz	Orgânica

**Fonte.** Adaptado de Andrade et al. (2014)

Desta forma, as tecnologias empregadas na produção de culturas de microalgas podem ser classificadas quanto à fonte de energia utilizada e às vias metabólicas aplicadas, possibilitando através destas variações, induzir a produção dos metabólitos de interesse (ANDRADE et al., 2014). A Tabela 11 mostra a comparação entre as características dos processos de produção fotoautotrófico e heterotrófico de microalgas da espécie *Chlorella vulgaris*.

**Tabela 11.** Comparativo entre as características dos processos fotoautotrófico e heterotrófico na produção de microalgas da espécie *Chlorella vulgaris*

Características	Fotoautotrófico	Heterotrófico
Fonte de energia	Luz	Carbono orgânico
Fator limitante de crescimento	Luz	Oxigênio
Controle de parâmetros	Alto	Alto
Equipamento	Fotobiorreator	Fermentador
Proteínas (% produzida)	52,64 ± 0,26	10,28 ± 0,10
Lipídio (% produzida)	14,57 ± 0,16	55,20 ± 0,28
Carboidrato (% produzida)	10,62 ± 0,14	15,43 ± 0,17
Cinzas (% produzida)	3,36 ± 0,05	5,93 ± 0,04
Umidade (% produzida)	5,39 ± 0,04	1,96 ± 0,02
Outros (% produzida)	10,42 ± 0,65	11,20 ± 0,61

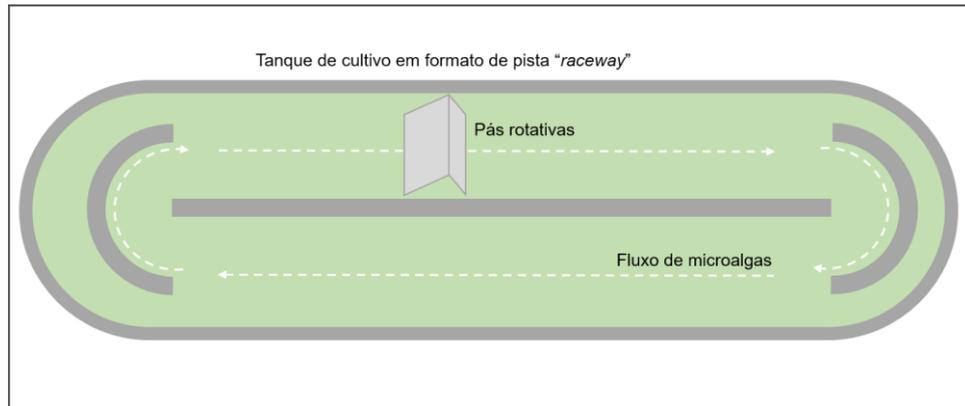
**Fonte.** Adaptado de XU et al. (2006)

Os sistemas mais comuns utilizados para produção de microalgas em regimes fotoautotróficos são conhecidos como fotobiorreatores, onde podem ser classificados em dois sistemas, aberto e fechado (ANDRADE et al., 2016).

Segundo Lourenço (2006), os sistemas abertos são de maneira geral, formados por grandes tanques de recirculação, onde podem ser empregados dispositivos como caixas de água, piscinas rasas em formato circular ou elíptico, além de diferentes métodos de agitação e circulação do meio de cultura algal. Existem sistemas abertos em formato de pista de corrida, denominado de *raceway* (Esquema 10).

Este sistema é composto por um canal de recirculação fechado no formato circular, na qual possuem pás rotativas que operam continuamente com o intuito de prevenir sedimentação de biomassa e promover a manutenção das condições de fluxo hidráulico (CHISTI, 2007).

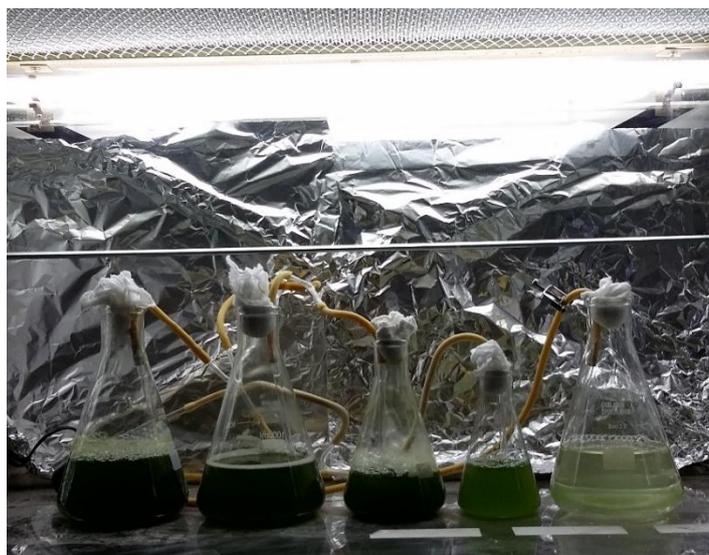
Como todo sistema de cultivo aberto, apresentam riscos de contaminação por exposição a outras espécies de microalgas assim como outros tipos de micro-organismos, além de situações de evaporação contínua da água do meio de cultura e dificuldades de se controlar outras variáveis como pH, temperatura e dissolução de CO<sub>2</sub> (PULZ, 2001).



**Esquema 10.** Representação esquemática da vista superior de um tanque de cultivo de microalgas no formato de pista “raceway”

**Fonte.** Autor (2017)

Devido ao crescente uso de microalgas em produtos como fármacos, cosméticos e aditivos alimentícios, fatores como contaminação e evaporação do meio de cultura algal provenientes de sistemas abertos, impulsionaram o investimento em fotobiorreatores fechados para produção de microalgas (RICHMOND et al., 1993). Os fotobiorreatores fechados (Figura 8) tem como característica principal o controle de parâmetros como quantidade de nutrientes, difusão gasosa do CO<sub>2</sub> e sua dissolução no meio de cultura, temperatura, pH e intensidade luminosa, que fazem com que este sistema apresente altas taxas de crescimento de microalgas (PULZ, 2001).



**Figura 8.** Fotobiorreator em sistema fechado sob regime autotrófico de culturas de microalgas da espécie *Dunaliella salina*

**Fonte.** Autor (2017)

Estes sistemas podem ser encontrados nas seguintes configurações, coluna vertical, cilíndrico e no formato de placas (FRAC et al., 2010). Além das vantagens como baixa contaminação e elevado grau de pureza, sua versatilidade de cultivo em espaços menores, proporciona um alto rendimento produtivo de microalgas por unidade de área e volume (LOURENÇO, 2006). A Tabela 12 apresenta os sistemas de cultivo, assim como o regime empregado na produção de microalgas com fins comerciais e suas respectivas aplicações.

**Tabela 12.** Sistemas e regime de cultivo referente a diversas espécies de microalgas com seus respectivos produtos e aplicações

Sistema de Cultivo	Regime de cultivo	Microalga (Gênero)	Produto	Aplicação
FBRs	H	<i>Prototheca moriformis</i>	Vitamina C	Produtos farmacêuticos e nutricionais
FBRs	F, H	<i>Chlorella protothecoides</i>	Tocoferóis, biomassa e lipídios	Produtos farmacêuticos e nutricionais
TA, FBRs	F, H	<i>Chlorella vulgaris</i>	Biomassa e lipídios	Suplemento alimentar e biocombustíveis
FBRs	F	<i>Aphanizomenon flosaquae</i>	Glicoproteínas, vitaminas e lipídios	Produtos farmacêuticos, nutricionais e cosméticos
TA, FBRs	H	<i>Lyngbya majuscula</i>	Moduladores imunes	Produtos farmacêuticos e nutricionais

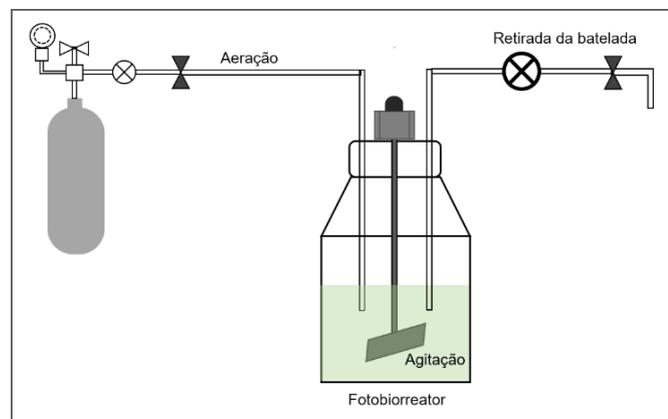
**Fonte.** Adaptado de Oncel (2013)

**Nota.** FBRs - Fotobiorreatores, TA – Tanque aberto, H - Heterotrófico, F - Fotoautotrófico

Ainda existe o regime de produção híbrida, que consiste na combinação dos dois sistemas de cultivo, realizado em duas etapas distintas, onde a primeira etapa, consiste no desenvolvimento das microalgas em sistema fechado e na etapa seguinte, as microalgas são submetidas ao cultivo em sistema aberto,

ocasionando a mudança metabólica e consequente aumento na produção de lipídeos devido ao stress ocasionado pela mudança no ambiente de cultura algal (ANDRADE et al. 2014). Os fotobiorreatores fechados ainda permitem trabalhar em diferentes processos de produção de microalgas como cultivo descontínuo, semicontínuo e contínuo.

O processo de cultivo descontínuo (Esquema 11) é conhecido como “batelada”, e ocorre com a inoculação das células de microalgas ao meio de cultura algal, onde nenhum outro componente é adicionado ao longo de seu desenvolvimento (CARVALHO et al., 2001).



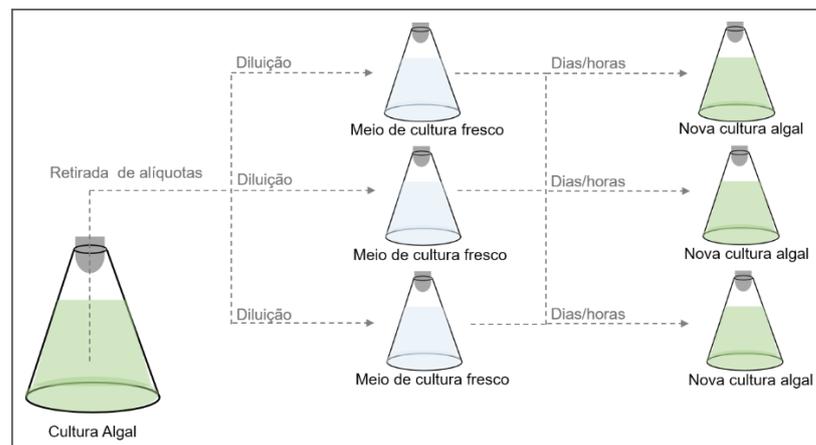
**Esquema 11.** Representação esquemática do processo contínuo de microalgas em sistema fechado

**Fonte.** Autor (2017)

Matsudo (2006) estudou a produção fotoautotrófica no sistema de cultivo descontínuo com espécie *Spirulina platensis* utilizando como fonte de nitrogênio a uréia, resultando em uma excelente produtividade de  $219,0 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ . Existe ainda uma variação deste processo denominada de sistema descontínuo alimentado, no qual um ou mais nutrientes são adicionados aos poucos nos fotobiorreatores, com o propósito de mitigar a possível inibição no crescimento das microalgas por excesso de nutrientes no meio, uma vez que no método convencional, a concentração dos nutrientes tende a ser muito elevada no início a fim de suprir todo o período de crescimento das microalgas (CARVALHO; SATO, 2001). Xiong et al. (2008), avaliando estratégias para desenvolver a espécie *Chlorella prothotecoides* em sistema heterotrófico, constataram que a mudança de sistema descontínuo para descontínuo alimentado, acarretou no

aumento da densidade de  $3,2 \text{ g.L}^{-1}$  para  $51,2 \text{ g.L}^{-1}$ , demonstrando uma considerável influência na produtividade. Esta modalidade apresenta a capacidade de alterar a cinética de crescimento das microalgas, no entanto o aumento intenso da densidade celular, dificulta a penetração de luz no interior do meio de cultivo em regime fotoautotrófico (LOURENÇO, 2006).

No regime semicontínuo (Esquema 12), também denominado como “repicagem”, o processo de cultivo é cíclico, sendo realizada a partir da retirada parcial do meio de cultivo algal, no período em que as microalgas estão em sua fase de crescimento exponencial (fase Log), onde em seguida são transferidas para um novo meio de cultivo com as mesmas condições de nutrientes, semelhante a um processo de diluição. (BORZANI, 2001).



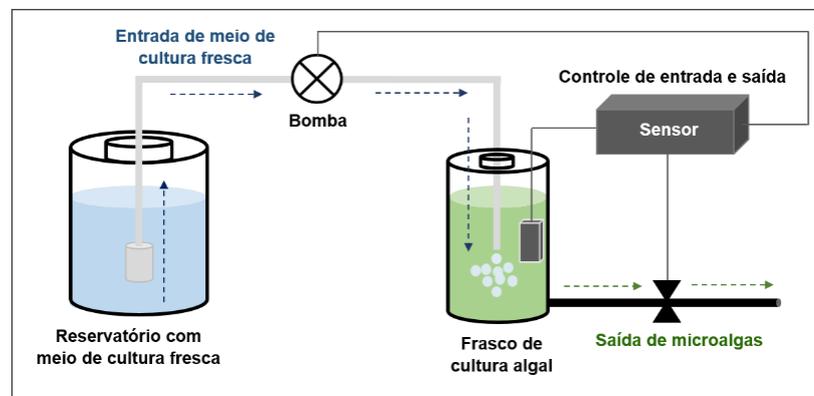
**Esquema 12.** Representação esquemática do processo de repicagem de microalgas em sistema fechado

**Fonte.** Autor (2017)

A repetição deste processo em dias consecutivos, permite produzir grande quantidade de microalgas, tornando o processo semicontínuo muito produtivo. Inclusive existem produções de microalgas em grande porte para as espécies *Arthrospira*, *Dunaliella* e *Chlorella*, utilizando este regime de cultivo (LOURENÇO, 2006). Hulatt e Thomas (2011), durante o cultivo da espécie *Scenedesmus obliquus* em sistema semicontínuo, alcançaram valores expressivos de produtividade, com valores de  $26,67 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ . Segundo Borzani (2001), esta modalidade de cultivo pode apresentar desvantagens como alto risco de contaminação, proveniente de constantes manipulações e

transferências de células, além da probabilidade de encontrar substâncias excretadas por células mais velhas remanescentes no meio de cultivo.

Na modalidade fluxo contínuo (Esquema 13), o cultivo algal é realizado em fotoperíodo constante, provocando conseqüentemente um período de crescimento exponencial contínuo das microalgas. Diferentemente das modalidades de cultivo descritas anteriormente (descontínuo e semicontínuo), o cultivo em fluxo contínuo é dinâmico, e ocorre com a permanente retirada de cultura algal com alta densidade de células, seguida de reposição com meio de cultura fresca.



**Esquema 13.** Representação esquemática de um processo contínuo de cultura algal

**Fonte.** Adaptado de Behrens (2015)

Este balanceamento é realizado por meio da medição da taxa de crescimento por sensores ópticos que regulam a entrada e saída respectivamente do meio de cultura fresco e microalgas com alta densidade celular (FACCIOTTI, 2001). Briassoulis et al. (2010), obtiveram resultados de produtividade de biomassa no valor de  $3,03 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , em regime fotoautotrófico e fluxo contínuo. A desvantagem desta modalidade está justamente na determinação da taxa de diluição para que o cultivo permaneça na fase de crescimento desejada, no qual exige profundo conhecimento referente a cinética de crescimento da espécie de microalgas utilizada no cultivo algal (ANDRADE et al., 2014).

Neste contexto, o fato das microalgas apresentarem propriedades de plantas superiores como fotossíntese aeróbica eficiente, simplicidade das necessidades nutricionais, juntamente com atributos biotecnológicos de células

microbianas como crescimento rápido em meio de cultura e capacidade de produção de metabólitos de interesse, sua prospecção biotecnológica tem se destacado nas últimas décadas, conquistando considerável relevância na produção de biocombustíveis, carotenoides, aditivos alimentícios e produtos cosméticos (DEL CAMPO et al., 2007) (Tabela 13).

**Tabela 13.** Produtos obtidos da cultura de microalgas, com suas áreas de aplicação e respectivas utilizações

Área de aplicação	Produto	Utilização
Alimentícia	Biomassa	Alimentos naturais
		“health food” e funcionais
		Aditivos alimentares
Corantes e antioxidantes	Xantofilas	Aditivos alimentares
	Luteína	Cosméticos
	Beta-caroteno	
	Vitamina C e E	
Ácidos graxos	Ácido araquidônico	Aditivos alimentares
	Ácido eicosapentaenoico	
	Ácido docosahexaenoico	
	Ácido gama-linolênico	
	Ácido linolênico	
Enzimas	Superóxido dismutase	Alimentos naturais
	Fosfoglicerato quinase	Pesquisa
	Luciferase e Luciferina	Medicina
Polímeros	Amido	Cosméticos
	Ácido poli-beta-hidroxibutirico	Medicina
Produtos especiais	Isótopos	Pesquisa
	Aminoácidos (prolina, arginina, ácido aspártico)	Medicina

**Fonte.** Adaptado de Barbosa (2003)

Dentre as aplicações biotecnológicas mais comuns referente a cultura de microalgas, podemos destacar a alimentação direta ou indireta de algumas espécies de peixes, moluscos, crustáceos e de diversos organismos forrageiros

de interesse econômico (aquicultura), onde são empregadas diversas espécies como *Cyanophyceae* (*Arthrospira* e *Spirulina*) e *Chlorophyceae* (*Chlorella* e *Dunaliella*), além de outras classes de diversas espécies (SILVA et al., 2003; MULLER-FEUGA, 2004).

Atualmente as microalgas possuem uma produção em escala comercial que abastece diferentes setores da indústria, consistindo em uma área emergente em pesquisas e aplicações industriais (RODRIGUES et al., 2014). A atividade industrial na cultura das microalgas em escala comercial, destina-se a obtenção de biomassa e de seus produtos de síntese, estabelecida em alguns países a cargo de grandes empresas (DERNER et al., 2006), conforme indicado na Tabela 14.

**Tabela 14.** Empresas que cultivam microalgas com suas respectivas localidades, gênero produzido e produto obtido com a relativa atividade biológica

Empresa	País	Microalga (Gênero)	Produto	Atividade biológica
Market Omegatech	USA	<i>Cryptocodinium</i>	DHA	Desenvolvimento cerebral
Cyanotec	USA	<i>Haematococcus</i>	Astaxantina	Tratamento da Síndrome do túnel do carpo
MERA	USA	<i>Haematococcus</i>	Astaxantina	Anti-inflamatório e tratamento de lesões musculares
OceanNutrition	FRA	<i>Chlorella</i>	Carboidratos	Melhora da resposta imunológica e antigripal
Innoval	FRA	<i>Odontella</i>	EPA	Anti-inflamatório
Panmol Madaus	AUT	<i>Spirulina</i>	Vitamina B12	Melhora da resposta imunológica

Nutrinova Celanese	GER	<i>Ulkenia</i>	DHA	Doenças cerebrais e cardíacas
-----------------------	-----	----------------	-----	-------------------------------------

---

**Fonte.** Adaptado de Pulz (2004)

**Nota.** USA - Estados Unidos, FRA - França, AUT - Áustria, GER - Alemanha

Apesar do enfoque principal no cultivo das microalgas estar voltado para os produtos bioquímicos produzidos por elas, a utilização desses microorganismos como fonte de biocombustível, vêm sendo explorada cada vez mais com diferentes perspectivas de pesquisas, principalmente em países do exterior (RODRIGUES et al., 2014). Próximo de nosso conhecimento, o Laboratório de Bioenergia e Catálise (LABEC) da Escola Politécnica da Universidade Federal da Bahia (UFBA), desenvolve pesquisa no campo de tecnologias limpas para a produção de biocombustíveis, a partir do cultivo de microalgas em fotobiorreatores com extração de lipídios de sua biomassa e decorrente processo de transesterificação. Embora as pesquisas apontem o potencial de diversas espécies de microalgas como fonte de biocombustíveis, ainda existem diversos desafios a serem superados, como o custo, que comparado a produção de combustíveis fósseis, ainda é elevado (TIONOCO et al., 2015). Desta forma, a busca por alternativas de melhoria, se torna cada vez mais crescente, como o desenvolvimento de fotobiorreatores mais eficientes e seleção de cepas de microalgas com rápido crescimento (FARIA; PAES et al., 2012).

Outra aplicação que tem se revelado como interessante alternativa para o desenvolvimento biotecnológico das microalgas, é a realização de seu cultivo em águas residuais, onde o tratamento dessas águas se torna particularmente interessante, pois além de apresentar baixo custo, possuem em sua composição nutrientes como nitrogênio e fósforo, que são incorporados pelas microalgas durante seu crescimento, evitando assim o processo de eutrofização ambiental (TIONOCO et al., 2015). Neste cenário, espécies como *Dunaliella* e *Chlorella* já são utilizadas para o tratamento de águas residuais e produção de biomassa para uso comercial (ARAVANTINOU et al., 2013).

Dentre as microalgas de origem marinha, o gênero *Dunaliella* se destaca por sua habilidade de crescer em condições de amplas faixas de concentração salina (0 – 5% de saturação) e de temperatura (5° - 40°C) (BEN-AMOTZ et al.,

2009). Além disso, são responsáveis pela maior parte da produção primária, que corresponde a formação de substâncias orgânicas ricas em energia a partir de material inorgânico (OREN, 2005). Neste sentido, a espécie *Dunaliella salina*, além de possuir cerca de 6 a 10% de  $\alpha$ -caroteno, é a principal fonte industrial de  $\beta$ -caroteno, produzindo de 10 a 100 vezes mais que a quantidade encontrada em raízes da espécie *Daucus carota* (cenoura), considerada a segunda maior fonte desse carotenoide (HENRIQUES et al., 1998) (Tabela 15).

**Tabela 15.** Teor de metabólitos em microalgas da espécie *Dunaliella salina* e raízes da espécie *Daucus carota* (cenoura)

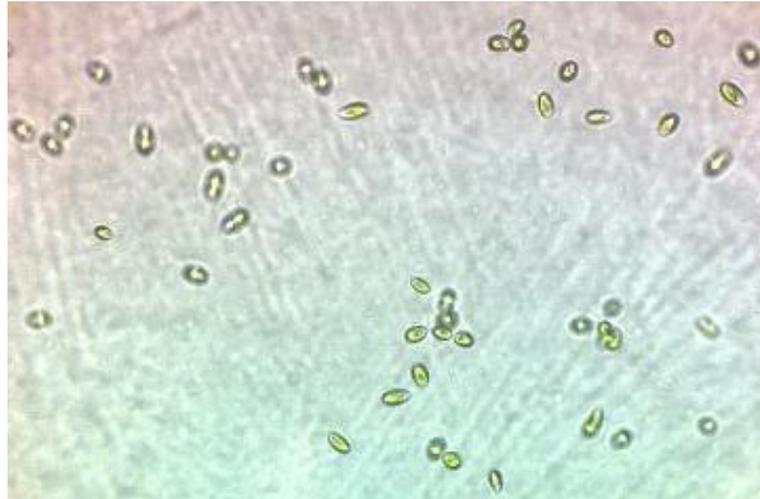
Composição	<i>Dunaliella salina</i> (mg.g <sup>-1</sup> )	<i>Daucus carota</i> (mg.g <sup>-1</sup> )
Proteína	74	10
Ácidos graxos	70	0
Carboidratos	297	100
B-caroteno	11 – 21	0,058
$\alpha$ -caroteno	0,531	0,028
Luteína e zeaxantina	0,543 – 0,976	0,002
Criptoxantina	0,234 – 0,465	0,001
Clorofila	22,1	0

**Fonte.** Adaptado de Tinoco et al. (2015)

Atualmente, segundo informações disponíveis até o mês de abril de 2017 na base de dados *AlgaeBase*, existem 31 espécies identificadas de microalgas somente do gênero *Dunaliella*.

### 3.6 MICROALGAS DA ESPÉCIE *Dunaliella salina*

O gênero de microalgas *Dunaliella*, pertencem ao filo *Chlorophyta*, são eucarióticas, fotossintéticas, unicelulares e biflageladas, com flagelos do tamanho aproximadamente de suas células, onde as mesmas são desprovidas de parede celular rígida, a capacidade de acúmulo de metabólitos possuindo um tipo de glicocálix que envolve a célula (OREN, 2005) (Figura 9).



**Figura 9.** Imagem microscópica de células de microalgas da espécie *Dunaliella salina* obtidas por meio de microscópio óptico, utilizando aumento de 400x

**Fonte.** Autor (2017)

O formato de suas células varia de acordo com o teor de salinidade do meio em que estão inseridas, no qual é resultado da ausência de parede celular em sua estrutura, que confere sua capacidade halotolerante, mecanismo de osmorregulação, resultando em sua capacidade de sobreviver a choques hiperosmóticos (TIONOCO et al., 2015). Desta forma, a quantidade de glicerol intracelular e carotenóides presente nestas microalgas, torna-se proporcional à concentração salina no meio extracelular, ou seja, no meio de cultura algal (BEN-AMOTZ et al., 1991).

A espécie *Dunaliella salina* se destaca dentre o gênero *Dunaliella*, devido a sua grande capacidade de acumular significativas quantidades de  $\beta$ -caroteno em seus cloroplastos em meio de cultura algal com alto teor de salinidade (RIBEIRO et al., 2011). Embora tenha grande destaque na produção de  $\beta$ -caroteno, a espécie *Dunaliella salina* possui amplo emprego em biotecnologia, como produção de biocombustíveis, tratamento de águas residuais, remoção de metais pesados, produção de ácidos graxos e fonte de metabólitos com ações antioxidantes e anticancerígenas, (TIONOCO et al., 2015) (Tabela 16).

**Tabela 16.** Aplicações para cultura algal de espécies *Dunaliella salina*

Microalga	Aplicação
<i>Dunaliella salina</i>	Produção de biocombustíveis
	Metabólitos com ação antioxidante
	Metabólitos com ação anticâncer
	Produção de ácido graxos
	Tratamento de águas residuais
	Remoção de metais pesados

**Fonte.** Adaptado de Tinoco et al. (2015)

Neste cenário, Herrero et al. (2006), realizaram estudos de avaliação sobre a composição química e atividade antimicrobiana do extrato pressurizado da espécie *Dunaliella salina*, em que norisoprenoides com  $\alpha$ -ionona,  $\beta$ -ionona,  $\beta$ -ciclocitral, neofitadieno e fitol, foram observados, resultando na associação de sua atividade antimicrobiana com a presença destes compostos. Esta relação foi fundamentada a partir do conhecimento de que alguns norisoprenoides, como a  $\beta$ -ionona, são capazes de inibir a cadeia respiratória de micróbios, impedindo o consumo microbiano de oxigênio (LARROCHE et al., 1995). Além disso, existem evidências referente a espécies do gênero *Dunaliella* na produção de aromas via processo biotecnológico, onde Donadio et al. (2010), ao pesquisarem compostos voláteis provenientes de sal marinho conhecido como “*fleur de sel*”, das salinas solares de Saint-Armel na região Bretanha da França, onde foi proposto que o aroma detectado nas salinas, estivesse correlacionado a concentração de microalgas presentes no meio salino. Isto porque os norisoprenoides detectados no sal marinho, são derivados de carotenoides, metabólitos provenientes do gênero *Dunaliella* (DONADIO et al., 2010).

Embora exista uma ampla diversidade de aplicações de microalgas do gênero *Dunaliella* conforme visto até aqui, sua bioprospecção no emprego em biotransformações como catálise assimétrica ainda é raro, onde são pouquíssimos os relatos encontrados em literatura. Apenas relatos sobre a espécie *Dunaliella tertiolecta* e *Dunaliella parva* são encontradas em literatura, conforme segue respectivamente os trabalhos de Noma et al. (1994) em biotransformações de terpenoides, e Hatanaka (1999), Hook et al. (1999) e Hook et al. (2003) em reações de redução assimétrica de aldeídos e cetonas. Apesar

de poucos trabalhos, os resultados alcançados nestes trabalhos (Tabela 17) são promissores e demonstram um excelente potencial de estudos do gênero *Dunaliella* no emprego de biotransformações, sobretudo no que concerne sua aplicação como biocatalisadores assimétricos em substratos pró-quirais como cetonas e aldeídos.

**Tabela 17.** Resultados de biotransformações de aldeídos e cetonas com emprego de microalgas da espécie *Dunaliella tertiolecta* e *Dunaliella parva*

Espécie	Substrato	Biotransformação (%)	Referência
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Benzaldeído	100	Noma et al. (1992)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	2-cloro-benzaldeído	100	Noma et al. (1992)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	3-cloro-benzaldeído	100	Noma et al. (1992)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	4-cloro-benzaldeído	100	Noma et al. (1992)
<i>Dunaliella parva</i>	Benzaldeído	100	Hook et al. (1999)
<i>Dunaliella parva</i>	3-cloro-benzaldeído	70	Hook et al. (1999)
<i>Dunaliella parva</i>	di-hidroxi-acetona	98 (>75 e.e.)	Hatanaka (1999)
<i>Dunaliella parva</i>	4-cloro-benzaldeído	95	Hook et al. (1999)
<i>Dunaliella parva</i>	Acetofenona	21	Hook et al. (2003)
<i>Dunaliella parva</i>	4-cloro-acetofenona	21	Hook et al. (2003)
<i>Dunaliella parva</i>	4-metil-acetofenona	35	Hook et al. (2003)

**Fonte.** Noma et al. (1992); Hook et al. (1999); Hatanaka (1999); Hook et al. (2003)

Diante deste cenário, e considerando o fato de que reações assimétricas são de grande interesse para o contexto científico e biotecnológico, representando alto valor agregado em pesquisa na área de síntese orgânica, sobretudo no que se refere a obtenção de produtos com atividade biológica, buscou-se neste presente trabalho, alinhar fatores como a bioprospecção de catalisadores mais eficientes e sustentáveis com a versatilidade metabólica das microalgas, juntamente com sua rapidez e simplicidade de cultivo, a partir da bioprospecção de microalgas da espécie *Dunaliella salina*.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 MATERIAIS UTILIZADOS

Para a realização do presente trabalho foram utilizados reagentes adquiridos dos fornecedores Sigma Aldrich<sup>®</sup>, Hexis<sup>®</sup>, Neon<sup>®</sup> e Synth<sup>®</sup>, onde todos tinham grau de pureza para análise (P.A.) (Tabela 18).

**Tabela 18.** Descrição do grau de pureza e fornecedor dos reagentes utilizados

Reagentes	Grau de pureza	Fornecedor
Acetato de etila P.A. – A.C.S.	99,0% mín.	Neon <sup>®</sup>
Acetofenona P.A.	99,0% mín.	Hexis <sup>®</sup>
Ácido bórico P.A.	97,0% mín.	Neon <sup>®</sup>
Ácido clorídrico P.A.	37,0% mín.	Synth <sup>®</sup>
Bicarbonato de sódio P.A.	97,0% mín.	Synth <sup>®</sup>
Cloreto de cobalto P.A.	97,0% mín.	Synth <sup>®</sup>
Cloreto de ferro P.A.	97,0% mín.	Synth <sup>®</sup>
Cloreto de manganês P.A.	97,0% mín.	Synth <sup>®</sup>
Cloreto de sódio P.A.	99,0% mín.	Synth <sup>®</sup>
Cloreto de zinco P.A.	97,0% mín.	Synth <sup>®</sup>
EDTA sódico P.A.	97,0% mín.	Neon <sup>®</sup>
Fosfato de sódio di-hidrogenado P.A.	97,0% mín.	Synth <sup>®</sup>
Hexano P.A. – Mín. 98,5%	97,0% mín.	Synth <sup>®</sup>
Metanol P.A.	99,0% mín.	Synth <sup>®</sup>
Molibdato de amônia P.A.	97,0% mín.	Synth <sup>®</sup>
Nitrato de sódio P.A.	97,0% mín.	Synth <sup>®</sup>
Sulfato de cobre P.A.	97,0% mín.	Synth <sup>®</sup>
Iodeto de potássio	97,0% mín.	Synth <sup>®</sup>
Iodo sólido cristalino	97,0% mín.	Synth <sup>®</sup>
Vitamina B1(Tiamina)	99,0% mín.	Sigma Aldrich <sup>®</sup>
Vitamina B7 (Biotina)	99,0% mín.	Sigma Aldrich <sup>®</sup>
Vitamina B12 (Cianocobalamina)	99,0% mín.	Sigma Aldrich <sup>®</sup>

## **4.2 COLETA DE CEPAS DA MICROALGA *Dunaliella salina***

As cepas das microalgas *Dunaliella salina* utilizadas nas reações de biocatálise, foram obtidas no Banco de Microalgas Iracema Nascimento (BMIN), a partir da Profa. Dra. Suzana Telles da Cunha Lima, coordenadora do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LaBBiotec) do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA) que gentilmente realizou a coleta e doação das cepas. As cepas coletadas foram transportadas para o Laboratório de Pesquisa em Iniciação Científica Júnior do Sesi, localizado na unidade de Piatã, e cultivadas em fotobiorreatores na modalidade de sistema fechado em água do mar artificial enriquecida com meio Conway (WALNE, 1979) modificado.

## **4.3 PREPARO DO MEIO DE CULTIVO DAS MICROALGAS**

Para seu desenvolvimento, as microalgas necessitam dispor de substâncias essenciais, como macronutrientes, micronutrientes e concentrações mínimas de vitaminas (GUILLARD 1975).

Os macronutrientes apresentam funções de grande importância, como constituição da estrutura das biomoléculas, membranas e do meio intracelular, participação do processo de troca de energia e regulação de atividades metabólicas. São classificados como macronutrientes o carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, silício e ferro (LOURENÇO 2006). Enquanto os micronutrientes participam da estrutura e atividade de diversas enzimas e os principais micronutrientes são manganês, molibdênio, cobalto, boro, vanádio, zinco, cobre e selênio (LOURENÇO 2006). As vitaminas possuem, em geral, a função de agir como coenzima e transporte do CO<sub>2</sub> no processo de fotossíntese (LOURENÇO 2006).

O meio de cultura utilizado foi o meio Conway (WALNE, 1966) modificado, que consiste no preparo da solução principal e solução traço de metais que constituem, respectivamente, os macros e micronutrientes (solução principal) e uma solução de vitaminas.

Além dessas soluções, é comumente utilizado água do mar, esterilizada em autoclave, para o cultivo de microalgas marinhas em laboratório. No entanto,

buscou-se desenvolver uma metodologia que pudesse manter uma parametrização no meio de cultivo, sem interferência de fatores externos, tal como as diferentes composições químicas da água do mar (decorrente da localização e biodiversidade provenientes de sua área de coleta), além de possíveis contaminações de outros microrganismos, como bactérias e protozoários. Desta forma, foi preparada uma solução de água do mar artificial (AMA), a partir da composição química definida em literatura (GOMES, 2005) modificada.

#### 4.3.1 PREPARO DA SOLUÇÃO DE ÁGUA DO MAR ARTIFICIAL (AMA)

As soluções de água marinha artificial (AMA) foram preparadas de acordo com método de Millero (1996, p.281-300) modificado, solubilizando as espécies químicas descritas na Tabela 19 em 1 litro de água destilada esterilizada e em seguida homogeneizada.

**Tabela 19.** Descrição das espécies químicas e suas respectivas massas utilizadas no preparo de 1L de solução AMA

Espécie química	Massa por litro de solução (g/L)
NaCl	30,07
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,08
KCl	0,72
NaHCO <sub>3</sub>	0,17
CaCl <sub>2</sub>	1,16
MgCl <sub>2</sub>	5,20
KNO <sub>3</sub>	0,72

#### 4.3.2 PREPARO DO MEIO CONWAY

O preparo do meio Conway descrito por Walne (1979) modificado, foi realizado a partir da preparação de duas soluções, a principal e a de vitaminas. A composição da solução principal é feita a partir de suas soluções. A primeira

solução foi feita com a dissolução das espécies químicas descritas na Tabela 20 em 1L de água destilada esterilizada e posteriormente homogeneizada. As quantidades utilizadas de cada espécie química para a solução principal seguem descritas na Tabela 20.

**Tabela 20.** Descrição das espécies químicas e suas respectivas massas utilizadas no preparo de 1L de solução principal

Espécies químicas	Massa por litro de solução (g/L)
$C_{10}H_{14}O_8Na_2 \cdot 2H_2O$	45,0
$H_3BO_4$	33,6
$NaNO_3$	100,0
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,36
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	1,30
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	20,0

Em seguida, foi preparada a segunda solução composta de metais traço em duas fases, a primeira consistiu na dissolução das espécies químicas descritas na Tabela 21 em 10mL de água destilada esterilizada e posteriormente homogeneizada. Em seguida, coletou-se 1mL desta solução de metais traço e adicionou-se à solução principal, constituindo a solução de macro e micronutrientes. As quantidades das espécies químicas utilizadas em massa por 10 mL de solução, seguem descritas na Tabela 21.

**Tabela 21.** Descrição das espécies químicas e suas respectivas massas utilizadas no preparo de 10 mL de solução de metais traço

Reagente	Quantidade em massa (g)
Cloreto de zinco	0,21
Cloreto de cobalto	0,20
Molibdato de amônia	0,09
Sulfato de cobre	0,20

A solução de vitaminas foi realizada a partir da dissolução da cianocobalamina (vitamina B12), biotina (B1) e tiamina (B7) em 100mL de água

destilada esterilizada. As quantidades das espécies químicas utilizadas em massa no preparado da solução de vitaminas por 100mL de solução, seguem descritas na Tabela 22.

**Tabela 22.** Descrição das espécies químicas e suas respectivas massas utilizadas no preparo de 100 mL de solução de vitaminas

Reagentes	Quantidade em massa (mg)
Cianocobalamina (Vitamina B12)	5,0
Biotina (Vitamina B1)	100,0
Tiamina (Vitamina B7)	100,0

Após preparo das soluções principal e de vitaminas, as mesmas foram acondicionadas em frasco âmbar e armazenadas sob refrigeração em temperatura de aproximadamente 4C°, em geladeira.

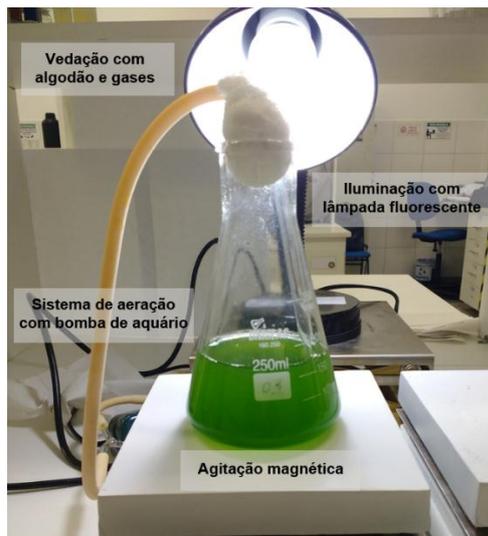
#### 4.4 CULTIVO DAS MICROALGAS

Buscando uma elevada produtividade e um ambiente controlado, foi utilizado o sistema de cultivo em fotobiorreator na modalidade de bateladas. Esta modalidade de cultivo consiste em um sistema fechado, onde todos os requisitos de crescimento das microalgas são introduzidos no sistema, e controlados de acordo com a necessidade de produção (SUALI, SARBATLY, 2012).

As condições de cultivo em fotobiorreatores visam menores perdas de água por evaporação, redução de contaminação por outros microrganismos, menor necessidade de espaço devido ao seu baixo volume, maior rendimento por unidade de área e volume, além da obtenção de cultivos com alto grau de pureza (LOURENÇO, 2006). Em grande parte dos casos, um dos principais fatores observados para uma produtividade de sucesso é o fator de turbulência, que promove a liberação eficiente de O<sub>2</sub> e gás residual (TREDICI, 1999). Para isso, os fotobiorreatores devem possuir em sua estrutura interna, difusores que convertam o ar injetado em pequenas bolhas, favorecendo a transferência do

CO<sub>2</sub> do ar e a remoção de O<sub>2</sub> do meio de cultura durante a fotossíntese (SINGH et al., 2012).

Dessa forma, as cepas coletadas foram cultivadas em fotobiorreator de sistema fechado descrito na Figura 10, composto por frasco erlenmeyer, luminária com lâmpada fluorescente de 40W e sistema adaptado de difusor de ar composto por bomba compressora de ar de aquário, mangueira de borracha e pipeta *Pasteur* de vidro.



**Figura 10.** Fotobiorreator utilizado para o cultivo em sistema fechado em laboratório para o cultivo das microalgas *Dunaliella salina*.

**Fonte:** Autor (2016)

O meio de cultura algal utilizado para o desenvolvimento das microalgas foi realizado com solução AMA enriquecida com meio Conway (WALNE, 1979) modificado, composto por adição de 0,1mL de solução principal e 0,1mL de solução de vitaminas, sob temperatura de 20°C, aeração constante e fotoperíodo contínuo com intensidade luminosa de aproximadamente 2500 Lux.

#### 4.5 MANUTENÇÃO DAS CULTURAS DE MICROALGAS

O ciclo de vida das microalgas em fotobiorreatores é relativamente mais curto em sistema fechado, pois como não ocorre entrada ou saída de qualquer material, apenas troca gasosa, os recursos do meio de cultivo acabam se tornando finitos. Desta forma, enquanto o crescimento da população de

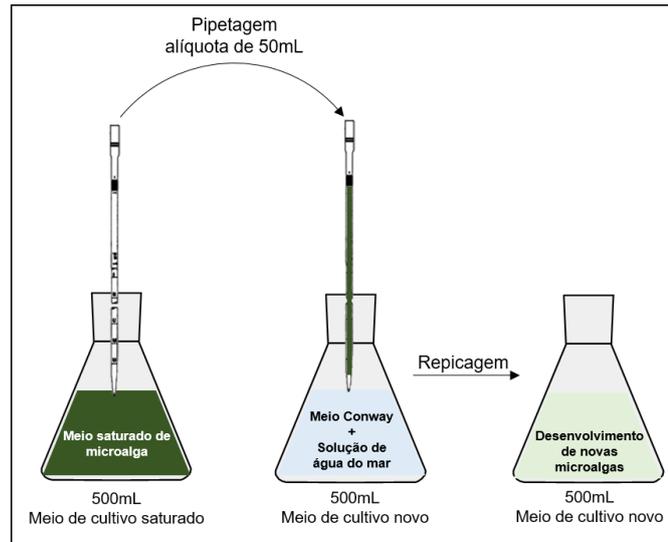
microalgas aumenta constantemente a densidade de células no meio de cultivo, os nutrientes presentes no meio, decrescem até a exaustão do fator limitante (ANDRADE et al., 2014).

A manutenção das culturas de microalgas, nesta modalidade de sistema fechado, é denominada batelada, onde exige a transferência regular de alíquotas de culturas saturadas de microalgas para novos meios de cultura. Este fato ocorre devido ao volume do meio de cultura ser fixo e limitar a quantidade de nutrientes disponíveis no meio, sendo necessário transplantar as cepas de microalgas do meio de cultura, quando o mesmo se encontra saturado, para um novo meio de cultura rico em nutrientes e sem presença de microalgas. Este processo é denominado de repicagem, sendo realizado conforme necessidade e densidade das células no meio de cultura algal, que pode ser verificado pela intensidade da sua cor verde escura, conforme ilustrado na Figura 11. As intensidades da coloração dos meios de cultura algal cultivados, foram acompanhadas por espectrofotômetro.



**Figura 11.** Fotobiorreator com microalgas *Dunaliella salina* em diferentes fases de crescimento  
**Fonte:** Autor (2016)

As repicagens foram realizadas a partir da pipetagem de 50mL do meio de cultura saturado de microalgas, com pipeta graduada esterilizada, e em seguida transferida para novo meio de cultivo de 500mL, sob as mesmas condições descritas no item 4.4 (p.0). O Esquema 14 apresenta a manutenção realizada a partir do processo semicontínuo (repicagem) realizado na manutenção da cultura algal.



**Esquema 14.** Manutenção do meio de cultivo das microalgas a partir do processo de repicagem

**Fonte:** Autor (2016)

## 4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.6.1 ESPETROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (IV)

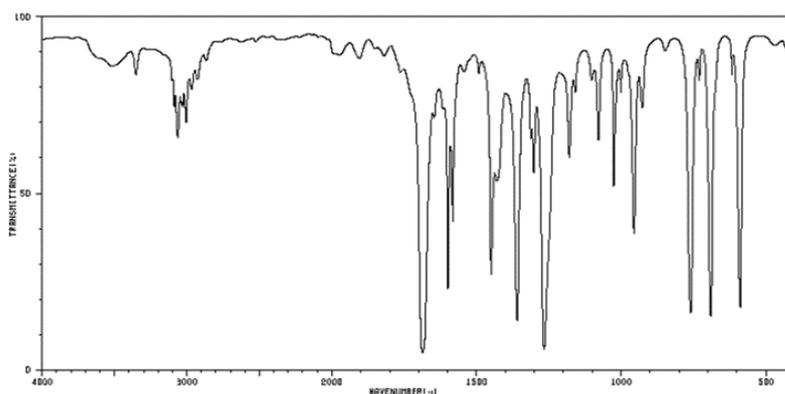
O estudo e a obtenção dos espectros por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, foram realizados e registrados em equipamento SHIMADZU IRAffinity-1 FT-IR (Fourier Transform Infrared) e software LabSolution IR (Figura 12). Este equipamento consiste em uma fonte global de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , compreendendo a região média do infravermelho conhecido pela sigla em inglês M.I.R. (Médium Infrared).



**Figura 12.** Equipamento de espectroscopia de infravermelho SHIMADZU IRAffinity-1 FT-IR (Fourier Transform Infrared)

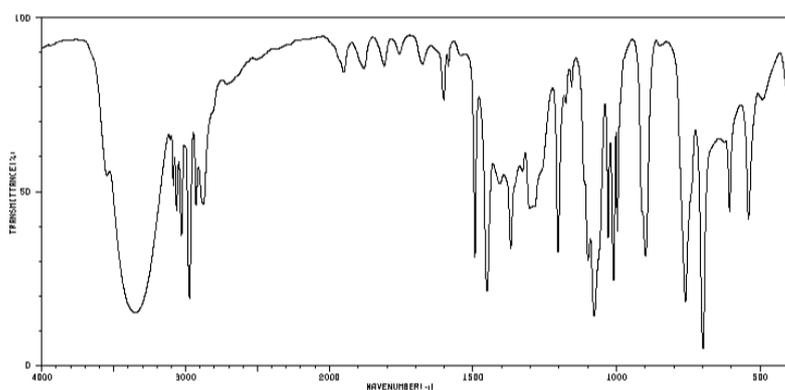
**Fonte:** Autor (2016)

As análises dos espectros de infravermelho foram realizadas em janela de NaCl, utilizando a técnica de formação de filme líquido, onde a amostra é inserida entre duas janelas de NaCl, e em seguida levemente prensada para formação do filme. Com a finalidade de realizar a caracterização espectral do substrato e produtos das reações de biocatálise, foi realizada análise comparativa do espectro obtido do substrato acetofenona e produto da reação sintética e de biocatálise com os espectros da literatura. As figuras abaixo mostram os espectros de Infra Vermelho, obtidos na base de dados espectral, dos compostos acetofenona (Figura 13), (*R*)-1-fenil-etanol (Figura 14) e (*S*)-1-fenil-etanol (Figura 15).



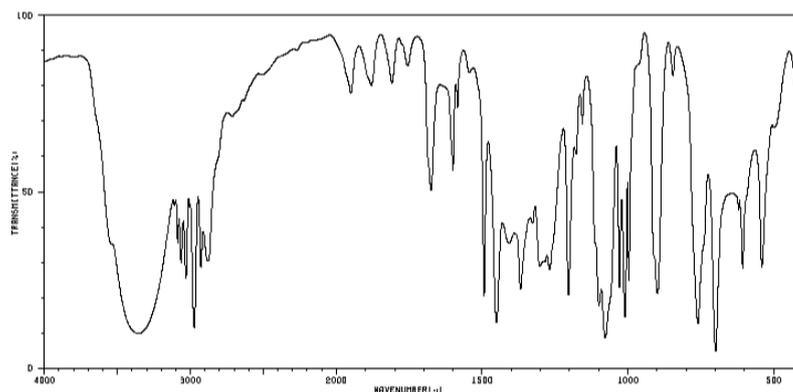
**Figura 13.** Espectro de IR-FT (Infravermelho com Transformada de Fourier) realizada em filme líquido com janela de NaCl do composto acetofenona

**Fonte:** Base de dados espectral, Data Base for Organic Compounds (SDBS). Disponível em: <[http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi)>. Acesso em 9 de abril de 2017.



**Figura 14.** Espectro de IR-FT (Infravermelho com Transformada de Fourier) realizada em filme líquido com janela de NaCl do composto (*R*)-1-fenil-etanol.

**Fonte:** Base de dados espectral, Data Base for Organic Compounds (SDBS). Disponível em: <[http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi)>. Acesso em 9 de abril de 2017.



**Figura 15.** Espectro de IR-FT (Infravermelho com Transformada de Fourier) realizada em filme líquido com janela de NaCl do composto (S)-1-fenil-etanol.

**Fonte:** Base de dados espectral, Data Base for Organic Compounds (SDBS). Disponível em: <[http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi)>. Acesso em 9 de abril de 2017.

#### 4.6.2 ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS)

Os estudos sobre a taxa de crescimento e ciclo de vida das microalgas foram realizados em espectrofotômetro UV-VIS LOGEN Scientific SFG25NM ilustrado na Figura 16, cujas características seguem descritas na Tabela 23.



**Figura 16.** Espectrofotômetro LOGEN Scientific SFG25NM

**Fonte:** Autor (2016)

**Tabela 23.** Características ópticas do espectrofotômetro LOGEN Scientific

Itens	Descrição técnica
Modelo	SFG25NM
Cubeta	Polietileno - 4mm
Escala	340 a 1000nm
Feixe de luz	UV-VIS

A partir da coleta de alíquotas do meio de cultivo algal dos fotobiorreatores, foram realizadas leituras de absorvância no comprimento de onda em 750nm, para as amostras de microalgas (Eaton et al., 1995). A calibração do equipamento foi realizada a partir da leitura de uma amostra constituída somente por solução AMA (MILLERO, 1996) modificada, enriquecida com meio Conway (WALNE 1979) modificado.

Estas leituras foram utilizadas como branco antes das leituras das amostras do meio de cultura algal. As leituras realizadas com as amostras do meio de cultura algal tiveram como objetivo verificar o grau de saturação das células de microalgas no meio, a partir da relação entre a radiação absorvida (absorvância) e intensidade da coloração verde produzida ao longo do crescimento das microalgas.

As análises consistiram, primeiramente, na leitura da absorvância da solução do meio de cultura sem a presença de microalgas. Em seguida, realizou-se a calibração do equipamento, descontando o valor de absorvância da solução utilizada no meio de cultura, constituída apenas de solução AMA enriquecida de meio Conway (WALNE 1979) modificado. Após calibração, realizou-se a leitura de alíquotas coletadas no meio de cultura algal, em diferentes fases de crescimento das microalgas, conforme segue descrito na Tabela 24.

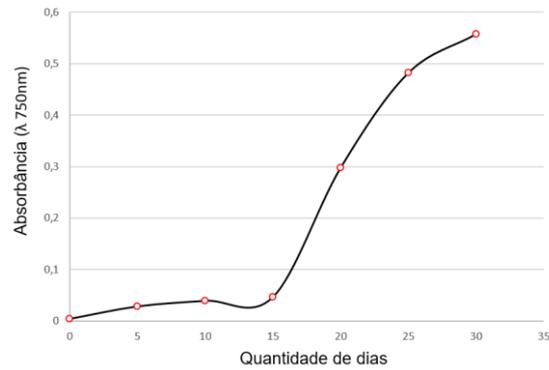
**Tabela 24.** Valores da medida de absorvância das soluções de microalgas em diferentes fases de crescimento.

Tempo de cultivo (dias)	Absorvância ( $\lambda$ de 750 nm)
0*	0,004
5	0,028
10	0,039
15	0,046
20	0,298
25	0,482
30	0,557

**Nota.** \* tempo de 0 dias corresponde ao dia da repicagem, onde o processo de crescimento das microalgas está em seu início e a intensidade da coloração verde é muito baixa

O Gráfico 2 apresenta os valores da medida de absorvância das alíquotas coletadas do meio de cultura de microalgas em diferentes fases de crescimento.

**Gráfico 2.** Valores da medida de absorvância das soluções de microalgas em diferentes fases de crescimento.



#### 4.6.3 MICROSCOPIA ÓPTICA

Foram realizados estudos das microalgas, a partir de observações em microscópio óptico OPTON modelo TNB-01B (Figura 17 e Tabela 25), assim como quantificações de contagem de células com Câmara de Neubauer (GIULLARD, 1978), dos meios de cultivos desenvolvidos em laboratório, conforme segue descrito no item 3.6.3.1 (p.0).



**Figura 17.** Microscópio óptico OPTON modelo TNB-01B

**Fonte:** Autor (2016)

**Tabela 25.** Descrição técnica do microscópio OPTON TNB-01B

Itens	Descrição técnica
Aumento	40X até 1000X
Iluminação	LED
Objetivas	Semi planacromáticas, 4X, 10X, 40X (R) e 100X (R)
Focalização	Macrométrica, ajuste de tensão e área de trabalho de 20mm
Micrométrico	Curso de 20mm e 0,002mm por divisão

A Figura 18 apresenta uma imagem microscópica das células de microalgas *Dunaliella salina*, obtida a partir da captura de imagem no microscópio óptico.



**Figura 18.** Imagem microscópica das células de microalgas *Dunaliella salina* obtida a partir da captura de imagem em equipamento microscópio óptico OPTON modelo TNB-01B com aumento de 400x

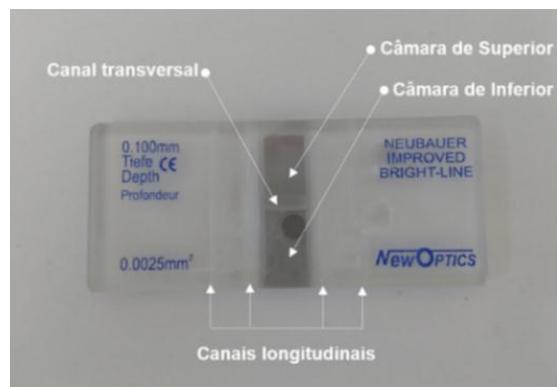
**Fonte:** Autor (2016)

#### 4.6.3.1 CONTAGEM DE CÉLULAS EM CÂMARA DE NEUBAUER

Na área de Biotecnologia, a câmara de Neubauer é comumente empregada para contagem de células ou partículas visíveis ao microscópio óptico, como células de leveduras, esporos, bactérias e microalgas. Seu rotineiro

uso, deve-se ao fato de sua leitura ser considerada rápida e relativamente precisa.

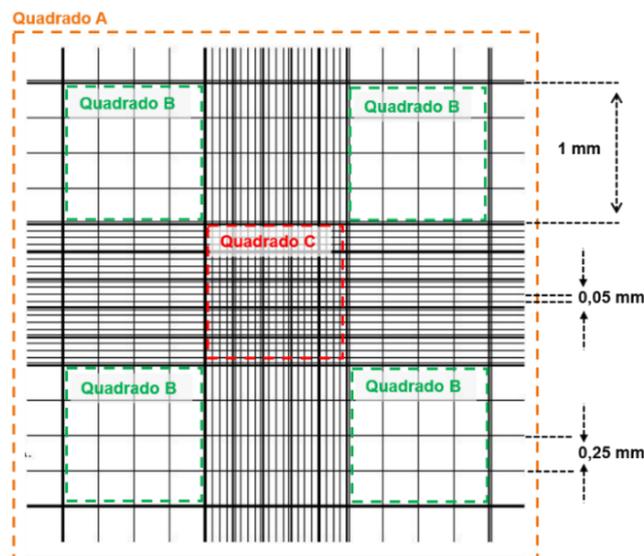
A câmara de Neubauer é conhecida por “lâmina hematimétrica”, e seu princípio de funcionamento é contabilizar todas as células em um volume conhecido e estabelecido em um plano, dentro da profundidade de foco do sistema objetiva-ocular do microscópio (ANDERSEN, 2004). As câmaras de Neubauer possuem duas zonas de contagem, separadas por um suco horizontal e limitadas de cada lado por um canal vertical, conforme ilustrado na Figura 19.



**Figura 19.** Imagem vista de cima da Câmara de Neubauer

**Fonte:** Autor (2016)

A superfície de contagem é uma área constituída por diversos quadrados reticulados de diferentes dimensões (Esquema 15 e Figura 21).



**Esquema 15.** Área de contagem da câmara de Neubauer com seus quadrantes

**Fonte:** Autor (2016)



A solução foi preparada conforme literatura (ANDERSEN, 2004), dissolvendo 20g de KI em 200mL de água destilada, adicionando em seguida 10g de I<sub>2</sub> cristalino. Após homogeneização da mistura, foi adicionado 20mL de ácido acético glacial, na sequência a solução foi filtrada e armazenada.

Para a realização das contagens, foi estabelecido método conforme literatura (GUILLARD, 1978), seguindo as respectivas etapas:

1. preparou-se a câmara de Neubauer, humedecendo os lados esmerilhados com água destilada e inserindo a lamela sobre a área demarcada de contagem;
2. coletou-se aproximadamente 5mL de suspensão algal em béquer, em seguida adicionou-se aproximadamente 0,05mL (uma gota) da solução de iodo preparada, deixando a mistura em repouso até cessar a movimentação das microalgas;
3. retirou-se alíquota com pipeta de Pasteur e em seguida, encostando a ponta da pipeta na borda da lamínula, preencheu-se a câmara de contagem cuidadosamente até completar toda sua capacidade;
4. após preenchimento da câmara, esperou-se aproximadamente 3 minutos para sedimentação das células;
5. focalizou-se a área demarcada da câmara de contagem com a objetiva de menor aumento, e contabilizou-se as células com núcleo bem visível, nos demais casos, como formação de aglomerados de células, buscou-se contar cada célula através da identificação de seus núcleos.

Os cálculos da quantidade de células foram realizados a partir dos valores médios de contagem por quadrante, e os resultados reportados em número de células por cm<sup>3</sup>, conforme segue descrito abaixo nas **Equações 1, 2 e 3**.

$$\text{n}^\circ \text{ de células por quadrado médio} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células contabilizadas}}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes contados}} \quad \text{Equação 1}$$

$$\text{n}^\circ \text{ de células/mm}^3 = \text{n}^\circ \text{ de células por quadrado médio} \times \text{volume do quadrante} \quad \text{Equação 2}$$

$$\text{n}^\circ \text{ de células/cm}^3 = \text{n}^\circ \text{ de células/mm}^3 \times \text{fator de diluição} \quad \text{Equação 3}$$

A Tabela 26 e o Gráfico 3 indicam respectivamente os valores de contagem de microalgas durante sua fase de desenvolvimento e sua curva de crescimento

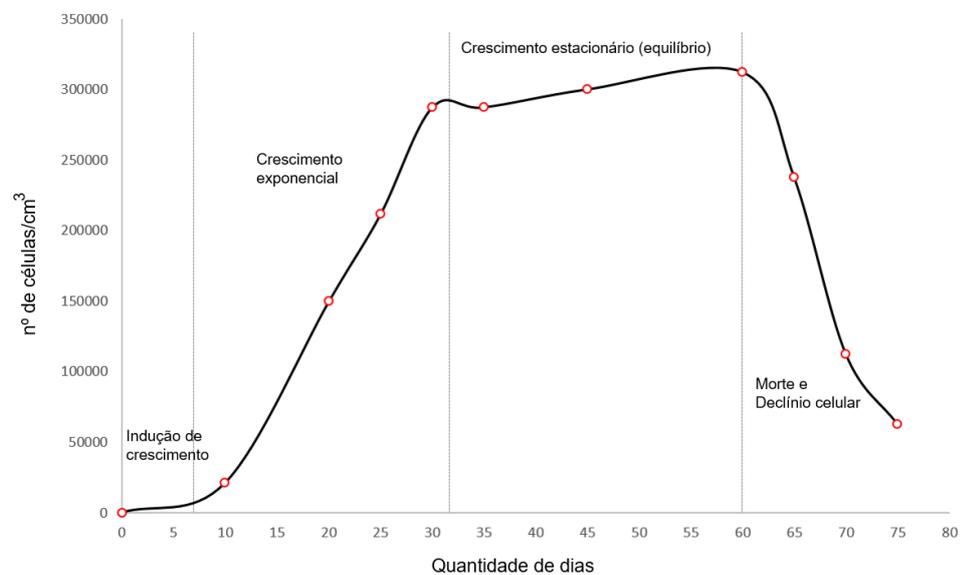
com suas fases identificadas em temperatura de aproximadamente 25°C sob aeração e fotoperíodo constante ao longo de 75 dias.

**Tabela 26.** Valores de contagem de microalgas durante fase de crescimento em temperatura de aproximadamente 25°C sob fotoperíodo constante.

Tempo de cultivo (dias)	Número de células (células/cm <sup>3</sup> )
0	0*
10	21.000
20	150.000
25	212.000
30	287.500
35	287.500
45	300.000
60	312.500
70	112.500
75	62.500

**Nota.** \*Este valor corresponde a uma quantidade tão baixa de microalgas que não foi possível realizar a contagem, portanto foi considerado o valor de contagem igual a 0.

**Gráfico 3.** Curva de crescimento das microalgas ao longo de 73 dias, em fotoperíodo e aeração constante e temperatura de aproximadamente 25°C



#### 4.6.4 CROMATOGRAFIA A GÁS COM DETECTOR POR IONIZAÇÃO DE CHAMA (CG-QUIRAL)

As análises para determinação dos produtos e taxas de conversão das reações através de  $\text{NaBH}_4$  e de biocatálise, assim como a determinação dos excessos enantioméricos, foram realizadas por cromatografia gasosa em equipamento Agilent Technologies 7820A GC System, com detector por ionização de chama (FID-Flame Ionization Detector) e injetor automático 7693A com capacidade para 16 frascos de amostra, conforme ilustrado na Figura 21.



**Figura 21.** Cromatógrafo gasoso Agilent Technologies 7820A GC System e injetor automático 7693A com capacidade para 16 frascos de amostra

**Fonte:** Autor (2016)

Os gases utilizados para as análises cromatográficas foram o hidrogênio, ar sintético e nitrogênio de acordo com a descrição da Tabela 27, onde todos foram adquiridos da fornecedora Linde Gases Brasil.

**Tabela 27.** Descrição dos gases utilizados e grau de pureza

Gases	Grau de pureza
Hidrogênio UP	99,999%
Ar Sintético Zero	20% de Oxigênio em Nitrogênio THC máximo de 0,5 ppm Umidade máxima de 3ppm
Nitrogênio UP	99,999%

As corridas cromatográficas foram realizadas em coluna quiral Agilent 112-6632LTM Cyclo Sil-B, com fase 30% heptakis (2,3-di-*O*-metil-6-*O*-*t*-butil-dimetilsilano)  $\beta$ -ciclodextrina em DB-1701 com dimensões de comprimento de 28,5m e 0,25mm de diâmetro interno, 0,25 $\mu$ m de espessura de filme e faixa de temperatura limite de 35 a 250°C. As condições estabelecidas para o detector, injetor, coluna e rampa de aquecimento utilizadas nas análises cromatográficas, seguem descritas na Tabela 28.

**Tabela 28.** Parâmetros do detector, injetor, coluna e rampa de aquecimento referente a metodologia utilizada nas análises cromatográficas

Parâmetros	Condições
Detector	Temperatura, 200°C
	Fluxo de ar sintético: 400mL/min
	Fluxo de gás hidrogênio: 30mL/min
	Fluxo de gás auxiliar (make-up flow) nitrogênio: 1,8113mL/min
	Fluxo corrigido de gás hidrogênio na coluna: 1,8113mL/min
Injetor	Temperatura: 220°C
	Pressão: 10.745psi
	Modo de injeção com divisor de fluxo: 1/10 – 18,113mL/min
Coluna	Cyclo Sil-B Agilent 112-6632LTM
	Vazão do gás de arraste nitrogênio: 1,8113mL/min
	Pressão: 10.745psi
	Velocidade média: 0,93455 min
Parâmetros	Metodologia 1
Rampa 1	Temperatura: 80°C
	Tempo de permanência: 3 min
	Tempo de corrida: 3 min
	Taxa de aquecimento: 2°C/min até 100°C
Rampa 2	Tempo de permanência: 13 min
	Taxa de aquecimento: 10°C/min até 200°C
	Tempo total de corrida: 23 min
Parâmetros	Metodologia 2
Rampa 1	Temperatura: 70°C
	Tempo de permanência: 3 min

	Tempo de corrida: 3 min
	Taxa de aquecimento: 2°C/min até 100°C
	Tempo de permanência: 0 min
Rampa 2	Taxa de aquecimento: 5°C/min até 220°C
	Tempo de permanência: 2 min
	Tempo total de corrida: 43 min

---

#### 4.6.5 CÁLCULO DE CONVERSÃO DO SUBSTRATO E EXCESSO ENANTIOMÉRICO

A quantificação da conversão do substrato acetofenona no produto 1-fenil etanol, assim como o cálculo do excesso enantiomérico, utilizados nas análises das reações de biorredução, foram realizadas através da análise comparativa de seus tempos de retenção e quantidade em área de seus respectivos cromatogramas. O padrão sintetizado quimicamente (através de NaBH<sub>4</sub>) e os produtos da biocatálise foram diluídos em solvente acetato de etila e injetados em equipamento de Cromatografia Gasosa em Coluna Quiral (CG-Quiral) com Detector de Ionização por Chama (FID) conforme metodologia descrita no item 3.6.4 (p. 00).

A determinação do excesso enantiomérico (*ee*) dos produtos obtidos nas reações de biocatálise foi realizada a partir da razão entre a diferença dos valores de área dos produtos (*R/S*)-1-fenil-etanol e sua somatória, utilizando como referência (FABER, 2004, ed. 5, p. 21), conforme segue descrito na Equação 4.

$$ee = \frac{\text{Área do enantiômero majoritário} - \text{Área do enantiômero minoritário}}{\text{Área do enantiômero majoritário} + \text{Área do enantiômero minoritário}} \times 100\% \quad \text{Equação 4}$$

A taxa de conversão do substrato acetofenona no (*R/S*)-1-fenil-etanol, foi calculada pela razão entre a área do pico referente ao produto de interesse com a somatória das áreas do produto e substrato. A equação utilizada para os cálculos, segue descrita abaixo (Equação 5).

$$\text{Taxa de conversão} = \frac{\text{Área do produto}}{\text{Área do produto} + \text{Área do substrato}} \times 100\% \quad \text{Equação 5}$$

#### 4.6.6 DETERMINAÇÃO DA ROTAÇÃO ESPECÍFICA E CONFIGURAÇÃO ABSOLUTA

A medida de rotação óptica específica do produto da biocatálise 24 horas foi realizada a 20°C, em polarímetro digital Perkin Elmer, modelo 343 conforme ilustrado na Figura 22, utilizando o comprimento de onda na radiação do sódio (D=589nm). O solvente utilizado para a leitura da rotação óptica foi o clorofórmio de acordo com a literatura (JANECZKO et al., 2014). Os dados de rotação específica para o (*R*)-1-fenil-etanol, descrito na literatura (JANECZKO et al., 2014) e para o produto de biocatálise após 24h, seguem descritos na Tabela 29.



**Figura 22.** Polarímetro Perkin Elmer modelo 343

**Fonte:** Autor (2016)

**Tabela 29.** Valor de rotação específica da literatura comparado ao valor medido em equipamento polarímetro do produto de biocatálise 120 horas.

Medida	$[\alpha]_D^{20}$ ( $c = 3,0 \text{ CHCl}_3$ )	CA
Literatura	+38,6	<i>R</i>
Biocatálise 24h*	+ 9,5	<i>R</i>

**Nota.** \*A leitura foi executada com produto de biocatálise 24 horas isolado por processo de centrifugação, seguido de extração por solvente e evaporação a vácuo, sem processo de purificação.

#### **4.6.7 PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO DAS MICROALGAS**

O processo de liofilização das microalgas foi realizado no Centro Interdisciplinar de Energia e Ambiente (CIENAM), no laboratório de Oceanografia Química, que desenvolve pesquisa em Impactos Ambientais na Atmosfera, Litosfera, Hidrosfera e na Vida coordenado pela Prof. Dra. Vanessa Hatje, que gentilmente cedeu o equipamento e espaço para a realização do procedimento.

A liofilização baseia-se em um processo de desidratação baseado no fenômeno físico denominado de sublimação que consiste na transformação direta do estado físico sólido diretamente para o estado físico gasoso, sob pressão reduzida em sistema a vácuo. Desta forma é realizada a retirada de água e/ou umidade da amostra de maneira que suas propriedades se mantenham preservadas.

O equipamento utilizado foi o liofilizador de bancada Liotop modelo L101, com capacidade total de 5,0Kg e 3,0Kg de gelo/24 horas. O procedimento de liofilização foi realizado a partir da coleta de uma quantidade de solução de microalgas saturadas e fracionadas em pequenos frascos de vidro, onde na sequência foram submetidas ao resfriamento em freezer até seu total congelamento. Após as amostras congeladas, as mesmas foram inseridas na câmara de secagem e submetidas ao processo de liofilização sob vácuo e mantidas durante período de 24 horas. O solvente (água) presente na solução algal, foi totalmente retirado por processo de sublimação, restando apenas o material orgânico da biomassa das microalgas e pequena quantidade de sais provenientes da solução principal, obtendo um pó com coloração verde clara.

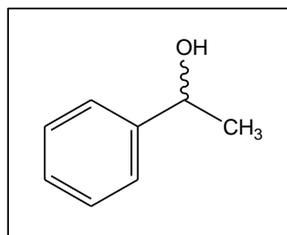
#### **4.7 REDUÇÃO QUÍMICA DA ACETOFENONA**

Para a reação de redução química da acetofenona foi empregada metodologia com borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) em metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) com temperatura inicial de aproximadamente  $0^\circ\text{C}$  e o restante da reação seguida em temperatura ambiente durante um período de 24h (VICTOR et al., 2010).

Foi dissolvido 520mg (4,3mmol) de acetofenona em 20mL de metanol, em balão de 25mL, sob agitação e atmosfera inerte. Em seguida o balão com a mistura reacional foi submetido a resfriamento em banho de gelo até atingir temperatura próxima a 0°C. Posteriormente, foi adicionado lentamente ao meio reacional, 39mg (1mmol) de boroidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) e logo após total dissolução, foi retirado o banho de gelo e a reação prosseguiu durante período de 24h em temperatura ambiente.

A reação foi extinta com adição de ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) ao meio reacional, até o pH atingir a faixa entre 5-6. Logo depois, foi adicionado 150mg de sílica em gel e realizada a evaporação do solvente em rotaevaporador. O produto da reação foi purificado através de cromatografia em coluna, com sílica gel como fase estacionária e, como eluente, uma mistura de 50 % de acetato de etila (AcOEt) e 50% de hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>). O produto obtido foi o álcool 1-fenil-etanol, um óleo com aparência levemente amarelada com rendimento de 74%.

#### **(R/S)-1-fenil-etanol**



#### **Rendimento de 74%**

IV (NaCl): 3334, 1595, 1498, 1473, 1070 cm<sup>-1</sup>. Página 0

CG – tempo de retenção: 18,0 e 18,6 min. Página 0

### **4.8 BIORREDUÇÃO ASSIMÉTRICA DA ACETOFENONA COM MICROALGAS MARINHAS *Dunaliella salina***

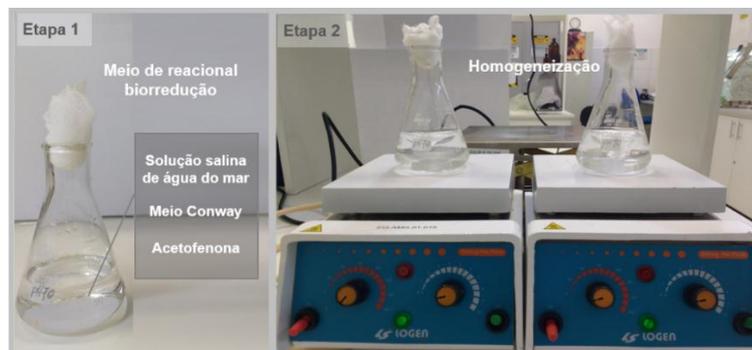
As reações de biorredução foram realizadas utilizando como biocatalisador as microalgas marinhas *Dunaliella salina* com células inteiras, ou seja, sem realizar qualquer tratamento prévio ou mesmo o isolamento das células. Desta forma, foi utilizado o próprio processo de cultivo das microalgas

como metodologia para a síntese de biorredução da acetofenona. Adicionando apenas o incremento de agitação para homogeneização do substrato acetofenona.

O processo de biocatálise consistiu na preparação do meio reacional com adição do substrato acetofenona, homogeneização, adição de microalgas e montagem do fotobiorreator, compreendendo um total de 4 etapas conforme ilustrado nas Figuras 23 e 24 (p. 93).

**Etapa 1 – Preparação do meio reacional para biorredução:** Em um erlenmeyer foram adicionados 200mg do substrato acetofenona (1,7 mmol), 60mL de solução AMA, 1mL de solução principal e 0,5mL de solução de vitaminas;

**Etapa 2 – Homogeneização do meio reacional:** A mistura reacional foi submetida a agitação magnética durante um período de aproximadamente 15 minutos, a fim de solubilizar o substrato ao meio aquoso e aumentar sua interação com os macros e micronutrientes.

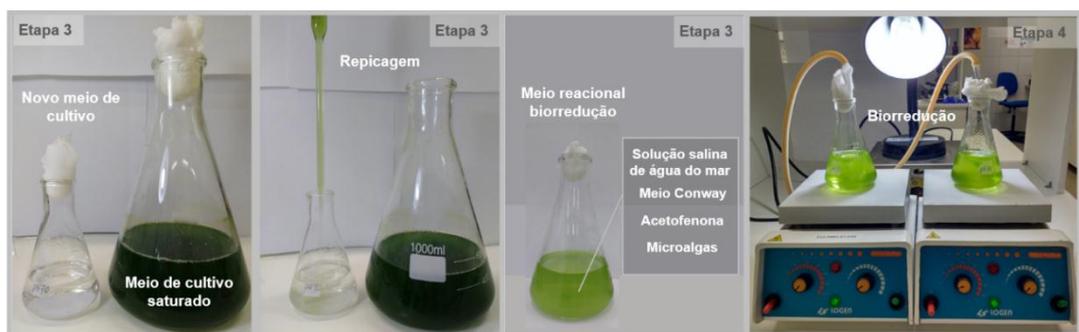


**Figura 23.** Etapas 1 e 2 de preparo do meio reacional da síntese de biorredução da acetofenona com microalgas *Dunaliella salina*

**Fonte:** Autor (2016)

**Etapa 3 – Adição das microalgas ao meio reacional:** Foi utilizado o processo de repicagem, descrito no item 4.5 (p.0), para adição das microalgas ao meio reacional. A repicagem consistiu na pipetagem de uma alíquota de 20mL do meio de cultura saturado e em seguida transferido a mistura reacional;

**Etapa 4 – Montagem do fotobiorreator em sistema fechado:** Para a montagem do sistema, foi utilizado chapa de aquecimento com agitação magnética, sistema de iluminação com luminária e lâmpada de 40W, tampa confeccionada com gases e algodão, bomba compressora de ar com mangueira de borracha e pipeta *Pasteur* de vidro. O meio reacional foi submetido ao longo de todo seu período reacional, aeração constante via injeção de ar comprimido, agitação moderada e fotoperíodo contínuo com intensidade luminosa de aproximadamente 2500 Lux, tampado com algodão e gases para permitir a difusão gasosa. Segundo literatura (ANDRADE e FILHO, 2014) a injeção de ar nos cultivos promove uma difusão efetiva dos nutrientes e o aporte parcial do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) inorgânico, proporcionando a estabilidade do pH e manutenção das algas em suspensão, possibilitando um meio de cultivo uniformemente distribuído, além de contribuírem no processo de fotossíntese.



**Figura 24.** Etapas 3 e 4, repicagem e preparação do fotobiorreator para síntese de biorredução da acetofenona com microalgas *Dunaliella salina*

**Fonte:** Autor (2016)

Após o período de 24h de reação, foi adicionado ao meio reacional mais 20mL de solução de microalgas coletadas do meio de cultivo saturado, onde este procedimento foi repetido para todas as reações de biocatálise realizadas com durabilidade acima de 24h. Em sistema fechado, o desenvolvimento das microalgas segue uma curva de crescimento exponencial, estabelecendo uma característica para cada fase, indução de crescimento (adaptação), crescimento exponencial, fase estacionária de crescimento (equilíbrio) e declínio com morte celular (ANDRADE e FILHO, 2014). A fase inicial de crescimento, é justamente o período de adaptação onde ocorre a indução do crescimento com intensa atividade metabólica, destacando a síntese de DNA e enzimas (ANDRADE e

FILHO, 2014). Portanto, buscou-se induzir o crescimento das microalgas a partir da adição de microalgas (após 24 horas de reação) em seu período de adaptação, com o intuito de promover a sustentabilidade do meio reacional e consequente sobrevivência das microalgas na presença do substrato acetofenona ao longo da reação.

Os produtos (*R*)-1-fenil-etanol obtidos mediante reações de biocatálise foram isolados através de procedimento obtido em literatura (HATANAKA, 1999) modificado e realizado em três etapas, centrifugação, extração por solvente e concentração sob vácuo. A primeira etapa consistiu na sedimentação da biomassa algal através do processo de centrifugação em equipamento centrífuga CENTRIBIO, modelo 80-2B com faixa de rotação de 1000 a 4000rpm (Figura 25).

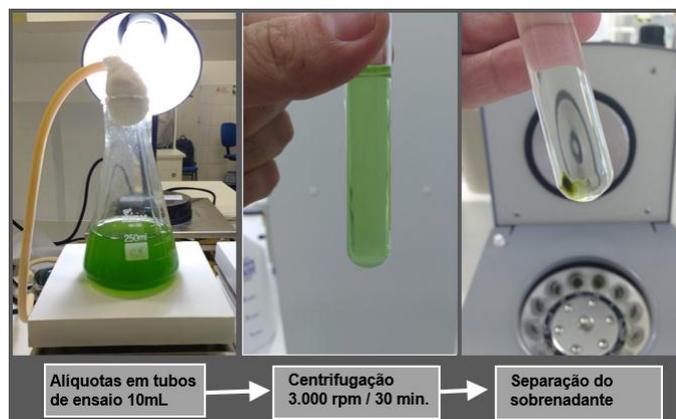


**Figura 25.** Equipamento centrífuga CENTRIBIO, modelo 80-2B com faixa de rotação de 1000 a 4000rpm

**Fonte:** Autor (2016)

Na etapa seguinte realizou-se a transferência do sobrenadante dos tubos de ensaio para um funil de separação e na sequência efetuou-se a extração com acetato de etila (3 x 20mL). Após extração, coletou-se a fase orgânica e adicionou-se a mesma  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro em quantidade suficiente para, onde em seguida foi realizado a filtração e a concentração do extrato sob vácuo em equipamento rotaevaporador. Entretanto não foi realizada a purificação dos mesmos por cromatografia em coluna utilizando sílica em gel e gradiente de efluentes. Por fim, as análises dos produtos isolados foram acompanhadas por cromatografia em fase gasosa utilizando coluna quiral, assim como os cálculos

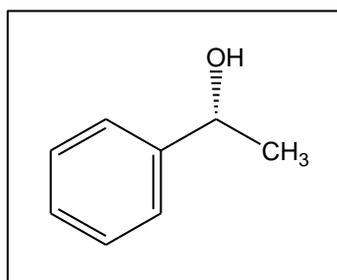
de conversão e excesso enantiomérico conforme metodologia descrita no item 3.6.5 (p.0). A figura 26 mostra o processo de centrifugação, em que após período reacional, as amostras foram transferidas para tubos de ensaio de 10mL e submetidas a centrifugação sob rotação de 3.000rpm por 30.



**Figura 26.** Processo de centrifugação das amostras de biocatálise e sedimentação da biomassa algal sob rotação de 3.000 rpm durante 30 minutos

**Fonte:** Autor (2016)

### **(R)-1-fenil-etanol**



#### **Rendimento bruto de 94% - 24 horas de reação**

IV (NaCl): 3334, 1595, 1498, 1473, 1070  $\text{cm}^{-1}$ . Página 0

CG – tempo de retenção: 18,0 e 18,6 min. Página 0

#### **Rendimento bruto de 92% - 48 horas de reação**

IV (NaCl): 3334, 1595, 1498, 1473, 1070  $\text{cm}^{-1}$ . Página 0

CG – tempo de retenção: 18,0 e 18,6 min. Página 0

**Rendimento bruto de 80% - 72 horas de reação**IV (NaCl): 3334, 1595, 1498, 1473, 1070  $\text{cm}^{-1}$ . Página 0

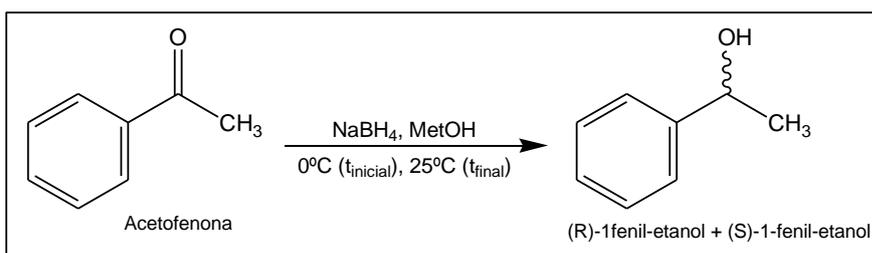
CG – tempo de retenção: 18,0 e 18,6 min. Página 0

**Rendimento bruto de 35% - 120 horas de reação**IV (NaCl): 3334, 1595, 1498, 1473, 1070  $\text{cm}^{-1}$ . Página 0

CG – tempo de retenção: 18,0 e 18,6 min. Página 0

**5. RESULTADOS E DISCUSSÃO****5.1 PREPARAÇÃO DO PADRÃO REDUZIDO 1-FENIL-ETANOL**

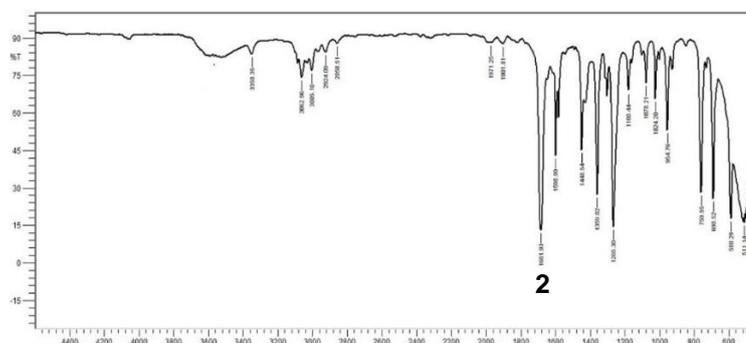
O intuito desta primeira etapa foi sintetizar um álcool (*R/S*)-1-fenil-etanol referencial padrão, com resultado conhecido em literatura e a partir deste, realizar estudos comparativos com os produtos obtidos nas biorreações com as microalgas da espécie *Dunaliella salina*. O álcool padrão racêmico (*R/S*)-1-fenil-etanol foi obtido a partir da redução química da acetofenona, utilizando  $\text{NaBH}_4$  e MetOH, conforme Esquema 16 e metodologia descrita no item 4.7 (p. 90). O produto obtido apresentou rendimento de 74%.



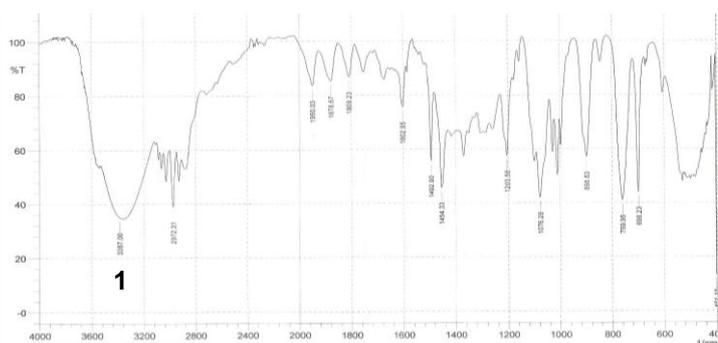
**Esquema 16.** Equação para síntese do álcool (*R/S*)-1-fenil-etanol, a partir da redução química da acetofenona.

A caracterização do produto obtido foi realizada através de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Forrier (IR-TF), a partir da identificação de seus grupos funcionais e cromatografia gasosa com detector de ionização de chama com coluna capilar quiral (CG-FID Quiral), onde as análises foram realizadas com base no reconhecimento dos tempos de

retenção e porcentagem área do reagente e produto. As Figuras 27 e 28 apresentam respectivamente os espectros de IV da acetofenona e do (*R/S*)-1-fenil-etanol.



**Figura 27.** Espectro de infravermelho da acetofenona realizado em equipamento SHIMADZU IRAffinity-1 FT-IR (Fourier Transform Infrared)



**Figura 28.** Espectro de infravermelho da mistura racêmica (*R/S*)-1-fenil-etanol realizado em equipamento SHIMADZU IRAffinity-1 FT-IR (Fourier Transform Infrared)

A Tabela 30 descreve as bandas de absorção diagnósticas para a atribuição dos grupos funcionais dos compostos estudados.

**Tabela 30.** Descrição correspondente a banda de vibração com os números de onda e seus respectivos grupos funcionais

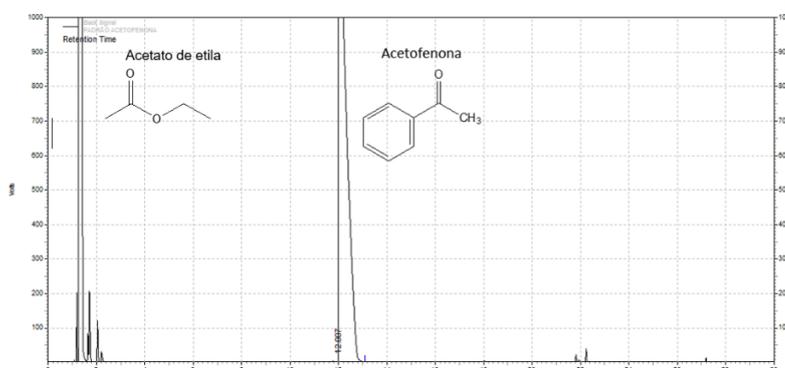
Banda vibracional	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo funcional
1	3330 – 3390	ν O-H
2	1690	ν C=O

**Fonte.** Nakanishi e Solomon (1977)

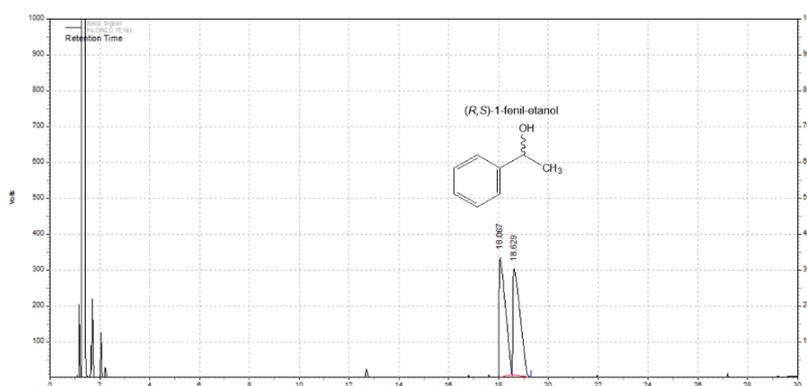
**Nota.** ν = estiramento da ligação

No espectro de infravermelho da acetofenona observa-se uma banda em  $1690\text{ cm}^{-1}$ , referente à  $\text{C}=\text{O}$  do grupo funcional cetona. Já no espectro do 1-fenil-etanol, observa-se o aparecimento de uma banda larga, em  $3330\text{-}3390\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento da ligação  $\text{O-H}$  do grupo funcional álcool, e consequente desaparecimento da banda em  $1690\text{ cm}^{-1}$  referente à  $\text{C}=\text{O}$ . Os espectros obtidos experimentalmente estão de acordo com os coletados na base de dados espectral de compostos orgânicos (SDBS), conforme segue no item 4.6.1 (p. 77).

A obtenção dos tempos de retenção do substrato, produto sintético, assim como solvente utilizado na diluição das amostras, foram necessários, a fim de conhecer o perfil cromatográfico, e estabelecer não somente as áreas referências das substâncias de interesse, como também observar a presença de possíveis contaminantes. As estruturas químicas do substrato e produto sintético racêmico (*R/S*)-1-fenil etanol e seus tempos de retenção seguem listadas na Tabela 31, bem como seus respectivos cromatogramas nas Figuras 29 e 30.

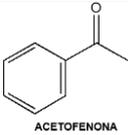


**Figura 29.** Cromatograma do substrato acetofenona com a identificação do solvente acetato de etila, utilizando metodologia 1 em CG-Quiral conforme item 4.6.4 (p. 86)



**Figura 30.** Cromatograma do produto sintético referente a mistura racêmica (*R/S*)-1-fenil etanol, utilizando metodologia 1 em CG-Quiral conforme item 4.6.4 (p. 86)

**Tabela 31.** Descrição química dos compostos e de seus respectivos tempos de retenção obtidos por análise cromatográfica gasosa com coluna quiral

Compostos	Tempo de retenção (Minutos)
 ACETOFENONA	12,4 <sup>1</sup> 14,4 <sup>2</sup>
 (S) 1-FENIL ETANOL	18,1 e 18,6 <sup>1</sup> 20,5 e 20,9 <sup>2</sup>

**Nota.** <sup>1</sup>Os tempos de retenção para o solvente, substrato e produto correspondem a metodologia 1 descrita no item 4.7 (p. 90), <sup>2</sup>Os tempos de retenção para o substrato e produto correspondem a metodologia 2, ambos em CG-Quiral descrita no item 4.6.4 (p. 86)

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ABSOLUTA DOS PRODUTOS DE BIOCATÁLISE COM MICROALGAS *Dunaliella salina*

A configuração absoluta do álcool (*R*)-1-fenil-etanol obtido majoritariamente na reação de biocatálise com microalgas foi determinada através de cromatografia em coluna quiral e medição da rotação específica em polarímetro conforme metodologias descritas nos itens 4.6.4 (p. 86) e 4.6.6 (p. 89).

A caracterização realizada em equipamento polarímetro foi feita comparando-se o valor obtido referente a medição da rotação específica do produto de biocatálise (Entrada 8, p.112) com valor relatado na literatura (JANECZKO et al., 2015). Segundo literatura citada, valores positivos relativos à rotação específica, indicam a configuração absoluta *R*.

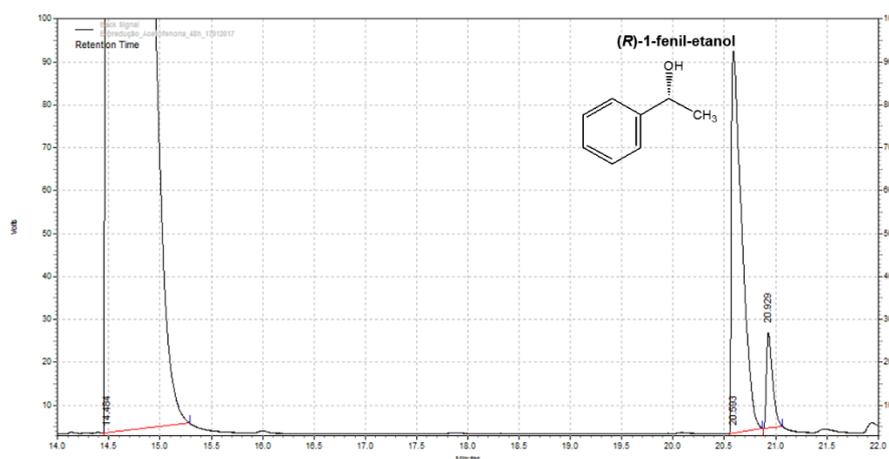
Apesar da leitura obtida ter apresentado valor positivo (Tabela 32), indicando a configuração absoluta *R* para o produto majoritário da biocatálise com microalgas, isto não ocorreu quando analisado o valor numérico, ou seja, o valor numérico obtido na leitura da rotação específica foi muito inferior quando comparado a literatura (JANECZKO et al., 2015). Logo, o valor de excesso

enantiomérico obtido via cromatografia em coluna quiral (Tabela 32 e Figura 31) não correspondia ao valor obtido na medição da rotação específica.

**Tabela 32.** Valores de rotação específica, excesso enantiomérico e configuração absoluta referentes ao composto (*R*)-1-fenil-etanol e produto de biocatálise 48 horas, obtidos respectivamente da literatura e experimentalmente em equipamento polarímetro e CG-Quiral

Medida	$[\alpha]_D^{20}$ ( $c = 3,0 \text{ CHCl}_3$ )	CA	<i>Ee</i> (%)
(JANECZKO et al., 2015)	+38,6	<i>R</i>	79
Biocatálise 48h*	+ 9,5	<i>R</i>	74

**Nota.** \*A leitura foi executada com produto de biocatálise 48 horas isolado por processo de centrifugação, seguido de extração por solvente e evaporação a vácuo, sem processo de purificação.



**Figura 31.** Cromatograma do produto biocatalítico (*R*)-1-fenil etanol referente a reação de 48 horas, utilizando metodologia 2 em CG-Quiral conforme item 4.6.4 (p. 86)

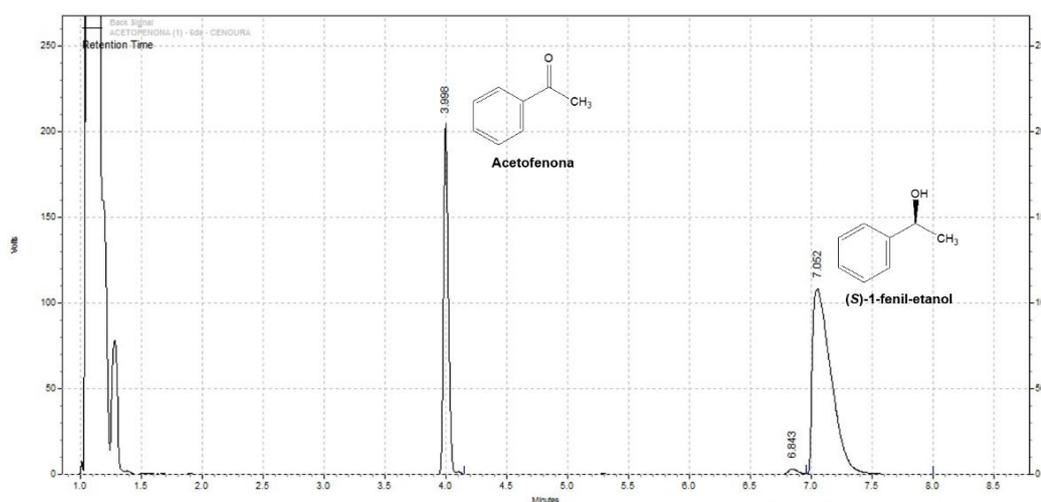
O fato de ter utilizado o produto bruto isolado sem purificá-lo, na medição da rotação específica, ocasionou provavelmente interferências na leitura e consequentemente no valor obtido. Visto que se utilizou células integras para o processo de biocatálise, onde o meio reacional em que foi extraído e isolado o produto biocatalítico é extremamente complexo e rico de compostos capazes de desviarem o plano da luz polarizada durante o processo de leitura no equipamento polarímetro. Segundo literatura (MEADE; CHEN, 1977), muitas substâncias, incluindo amido e outros carboidratos possuem esta capacidade. O

amido por exemplo, é uma substância opticamente ativa e dextrógira ( $\alpha = +66,5^\circ$ ), onde sua presença em solução pode não somente desviar o sentido do plano da luz polarizada como intensificar este desvio, ocasionando conseqüentemente erros de leitura (RAPHAEL, 2006).

Desta forma, buscou-se relacionar os resultados obtidos via biocatálise com microalgas por cromatografia quiral (Tabela 32) com resultados obtidos em literatura (YADAV 2002), juntamente com estudos realizados no Grupo de Pesquisa em Síntese Química e Bioatividade Molecular (BISPO, 2016), onde ambos trazem a utilização da cenoura como biocatalizador em reações de redução assimétrica da acetofenona com resultado conhecido para o produto de biocatálise. Segundo resultados obtidos por Yadav (2002), a biorredução assimétrica do substrato acetofenona com pedaços de cenoura (*Daucus carota*) resulta no produto majoritário (S)-1-fenil-etanol conforme apresentado na Tabela 33.

**Tabela 33.** Valores de rotação específica, excesso enantiomérico e configuração absoluta referentes a biorredução com cenoura (*Daucus carota*) da acetofenona com tempo reacional de 40 horas (YADAV 2002)

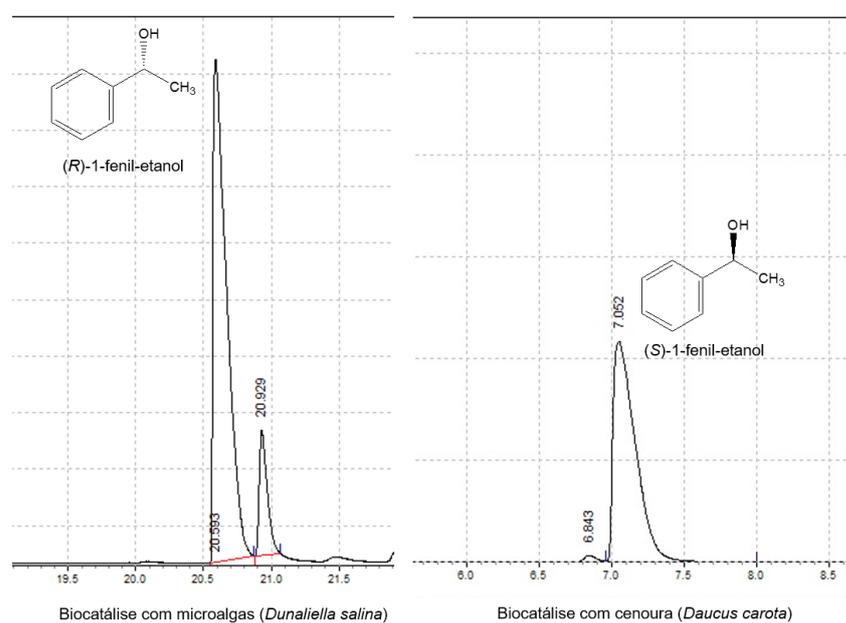
Composto	$[\alpha]_D^{20}$ ( $c = 3,5$ MetOH)	C (%)	CA	ee (%)
(S)-1-fenil-etanol	-39,1	73	S	92



**Figura 32.** Cromatograma do produto obtido via biocatálise com pedaços de cenoura (*Daucus carota*) em coluna quiral Cyclo Sil-B

**Fonte.** Bispo (2016)

Quando analisamos os resultados obtidos por Bispo (2016), utilizando cromatografia gasosa em coluna quiral (Agilent Cyclo Sil-B, 28,5m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m) para o produto de biocatálise da acetofenona com pedaços de cenoura (*Daucus carota*) na Figura 32, o produto majoritário (*S*)-1-fenil-etanol aparece como o segundo pico. A Figura 33 apresenta a comparação entre os dois resultados de cromatogramas obtidos nas reações de biocatálise com cenoura (*Daucus carota*) em literatura (BISPO, 2016) e experimental com microalgas marinhas (*Dunaliella salina*).

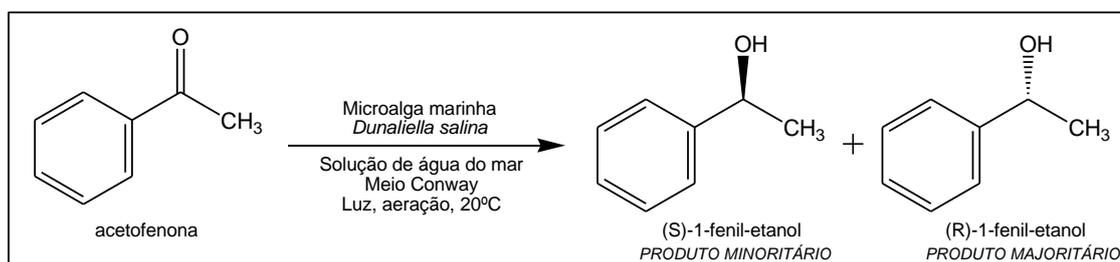


**Figura 33.** Cromatograma dos produtos obtidos via biocatálise com microalgas marinhas (*Dunaliella salina*) e pedaços de cenoura (*Daucus carota*) respectivamente em coluna quiral Cyclo Sil-B

Sendo assim, pode-se afirmar que diante do resultado do cromatograma obtido referente a reação de biocatálise com microalgas juntamente com as informações da literatura em Yadav (2002) e Bispo (2016), a configuração absoluta para os produtos majoritários provenientes das reações de biocatálise obtidas a partir de microalgas marinhas da espécie *Dunaliella salina* são o álcool (*R*)-1-fenil-etanol.

### 5.3 REAÇÕES DE BIOCATÁLISE EMPREGANDO MICROALGAS *Dunaliella salina* COMO BIOCATALISADOR

As microalgas *Dunaliella salina*, mostradas em detalhe na Figura 9 (pg. 66), foram submetidas a reações de biorredução com o propósito de avaliar seu potencial biocatalítico, tendo como substrato modelo, a acetofenona e como produto majoritário da reação de biocatálise o álcool (*R*)-1-fenil etanol conforme ilustrado no Esquema 17.



**Esquema 17.** Biorredução assimétrica da acetofenona utilizando como biocatalizador, microalgas marinhas da espécie *Dunaliella salina*

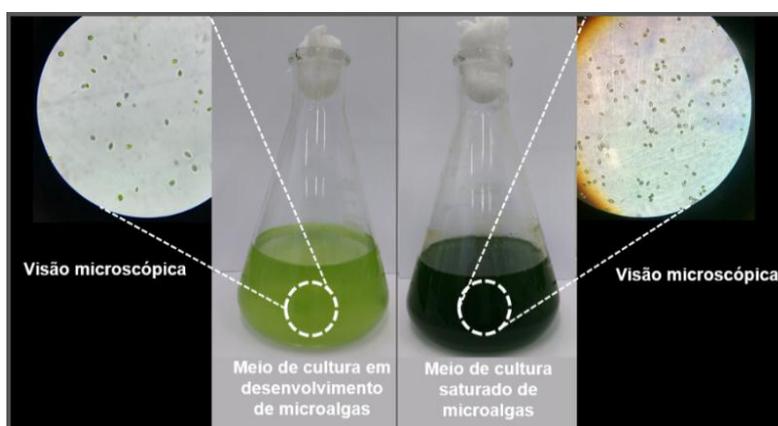
Com o intuito de realizar a biorredução, ao longo do desenvolvimento das microalgas, e utilizar sua atividade metabólica como via para a reação de biocatálise assimétrica, foram realizados diferentes ensaios relacionados aos fatores que influenciam seu crescimento, conforme informações em literatura (ANDRADE e FILHO, 2014). Desta forma, foram realizados ensaios em diferentes condições reacionais através da variação de fatores como quantidade de substrato, ordem de adição substrato/microalgas, agitação do meio, variação na quantidade de vitaminas, adição de gás carbônico e tempo de reação, com finalidade de observar os efeitos gerados nas conversões e excessos enantioméricos (*ee*) nas reações de biocatálise.

#### 5.3.1 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE MICROALGAS E SUBSTRATO ACETOFENONA NA BIOCATÁLISE

Por se tratar de um microrganismo vivo, a ser utilizado em fase de desenvolvimento celular, procurou-se investigar inicialmente a tolerância das

microalgas (biocatalisadores) frente ao substrato acetofenona e potenciais interferências causadas por sua presença no meio de cultura e, respectivamente, em seu desenvolvimento. Para isso, buscou-se estudar a relação entre o volume da solução de microalgas e a quantidade de massa do substrato acetofenona, de maneira a estabelecer uma relação que não afetasse seu crescimento e ocasionasse sua mortalidade. Desta maneira, foram realizados ensaios para medir o nível de tolerância do substrato acetofenona em quantidade de massa presente, a um volume fixo do meio de cultura com microalgas em sua fase saturada, caracterizada por grande presença de células.

O acompanhamento do desenvolvimento das microalgas e a determinação do seu grau de saturação nos testes, foram realizados a partir de parâmetros de observação da intensidade colorimétrica da cor verde e análise microscópica. As microalgas da espécie *Dunaliella salina* são clorofiladas, ou seja, possuem pigmentos de clorofila *a* em sua estrutura, conferindo uma coloração verde intensa no meio de cultura que estão presentes (FRANCESCHINI et al., 2010). Logo, quanto maior a intensidade de sua coloração verde, maior o grau de saturação e por consequência maior será a quantidade de microalgas no meio de cultura. Esta relação pode ser observada na Figura 34, onde são visualizados em microscópio óptico, dois meios de cultura algal com diferentes intensidades colorimétricas. O frasco de erlenmeyer que possui tonalidade verde escura, apresenta uma maior quantidade de células presentes quando comparadas ao frasco com a coloração verde mais clara.

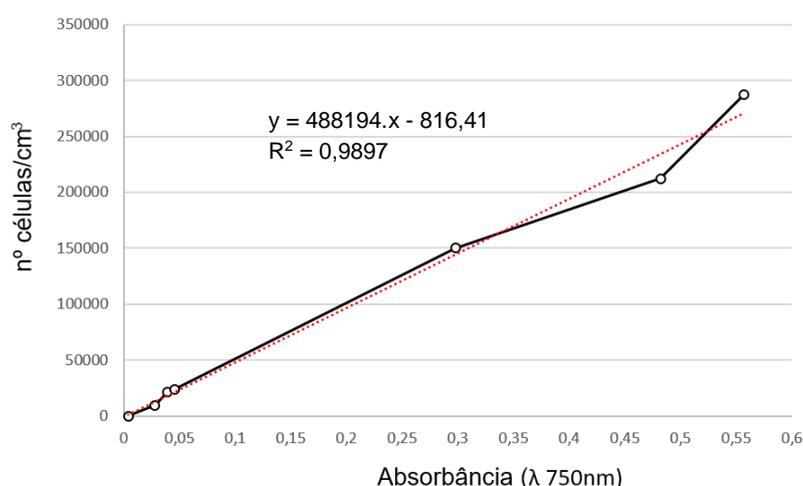


**Figura 34.** Relação do grau de saturação de microalgas no meio de cultivo com a intensidade colorimétrica e quantidade de células observadas em microscópio óptico

**Fonte:** Autor (2016)

Conseqüentemente, foi possível estabelecer uma relação entre a intensidade da coloração verde do meio de cultura algal com seu crescimento a partir dos valores de absorvância e número de contagem de células obtidos e descritos respectivamente nos itens 4.6.2 (p. 78) e 4.6.3.1 (p. 81), gerando como resultado o Gráfico 4, representado logo a seguir.

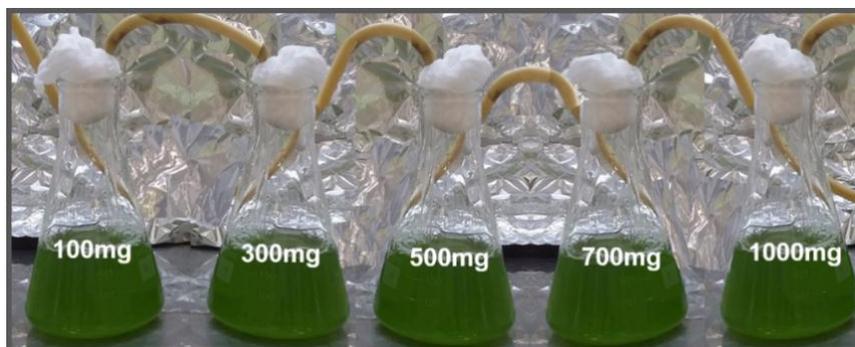
**Gráfico 4.** Relação entre os resultados de contagem do nº células de microalgas e valor da absorvância do meio de cultivo algal ao longo de 30 dias



O Gráfico 4 mostra que o coeficiente linear da reta obtido para o gráfico é de aproximadamente 0,99, sendo assim podemos afirmar que a relação obtida entre a quantidade de células presentes no meio de cultura algal e sua intensidade de coloração verde é diretamente proporcional. Portanto, utilizou-se como referência a intensidade da coloração verde dos meios de cultura algal para acompanhar o crescimento das microalgas e conseqüentes níveis de saturação nos ensaios.

Em cada ensaio utilizou-se cerca de 100mL de solução de microalgas coletadas do meio de cultura saturado, enriquecido com meio de cultura Conway (WALNE, 1979), 0,1 mL de solução de vitaminas e 0,1 mL de solução principal. Em seguida, o substrato acetofenona foi adicionado em cada frasco nas seguintes quantidades: 100mg (0,8mmol), 300mg (2,5mmol), 500mg (4,2mmol), 700mg (5,8mmol) e 1000mg (8,3mmol). As reações foram realizadas sob temperatura ambiente de aproximadamente 25°C, com aeração e fotoperíodo

constante durante 72 horas. Para a realização dos ensaios, foram preparados cinco meios de cultura em frascos de erlenmeyers de 250mL (Figura 35).



**Figura 35.** Teste de tolerância do substrato acetofenona com as microalgas *Dunaliella salina* em meio de cultura saturado, enriquecido com solução principal e de vitaminas, sob aeração e fotoperíodo constante durante 72 horas

**Fonte:** Autor (2016)

Os testes realizados com o substrato acetofenona em meio de cultura saturado de microalgas, demonstraram alteração na coloração verde em diferentes graus ao longo do período de 72 horas. Embora todos os testes tenham apresentado desbotamento na coloração verde inicial, o teste com 100mg de acetofenona (Entrada 1) foi o que apresentou o melhor desempenho, resultando na menor perda de intensidade na coloração verde inicial no período de 24 horas, conforme segue na Figura 36 e Tabela 34.



**Figura 36.** Resultados referente ao ensaio de tolerância após período de 72 horas

**Tabela 34.** Resultados referente ao ensaio de tolerância das microalgas frente ao substrato acetofenona em meio de cultura algal saturado

Entrada	Acetofenona (mg)	Coloração verde após 72h	Formação de corpo de fundo
1	100	Baixo desbotamento	Não
2	300	Médio desbotamento	Sim
3	500	Acentuado desbotamento	Sim
4	700	Inexistente	Sim
5	1000	Inexistente	Sim

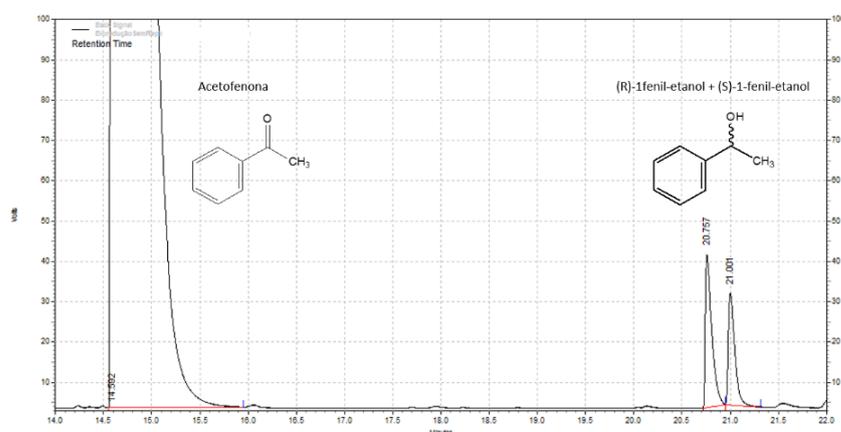
Enquanto os testes com quantidades a partir de 300mg de acetofenona, demonstraram um grau de toxicidade aguda crescente (Entrada 2 e 3, Tabela 34), prejudicando seu desenvolvimento e causando mortalidade parcial das microalgas. Este fato pode ser observado pelo acentuado desbotamento da coloração verde inicial e aglomerações de biomassa com formação de corpo de fundo. As quantidades acima de 700mg (Entrada 4 e 5, Tabela 34), apresentaram o maior grau de desbotamento e o desaparecimento total da coloração verde, ocasionando a mortalidade de todas as microalgas presentes no meio de cultura. Com o propósito de verificar o resultado da biocatálise e sua relação com o metabolismo das microalgas, foram realizadas análises cromatográficas com as amostras da Entrada 1 e 5, que apresentaram as condições e os resultados mais extremos. A Tabela 35 apresenta os resultados obtidos das análises cromatográficas em coluna quiral, seguidos dos respectivos cromatogramas ilustrados na Figura 37 e 38.

**Tabela 35.** Resultados de conversão e excesso enantiomérico referente as reações de biocatálise com 100mg e 1000mg de acetofenona.

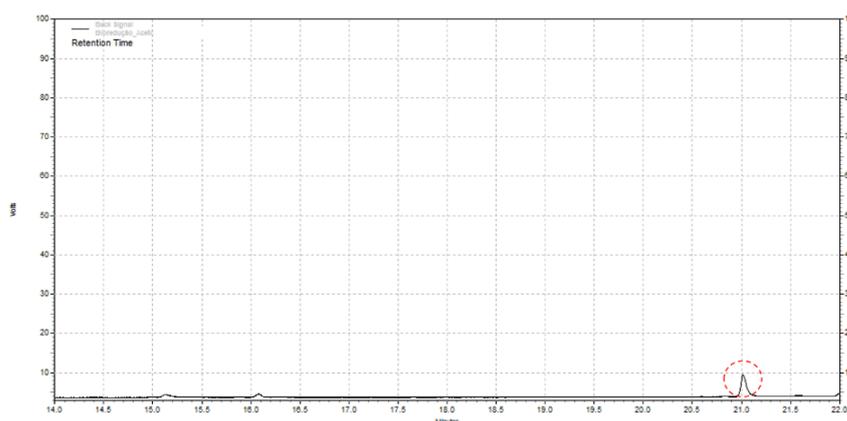
Entrada	Conversão (%)	CA	<i>Ee</i> (%)
1	2,4	( <i>R</i> )	17,1
5	0,0	-	0,0

**Nota.** Conversão% - conversão do substrato em produto, CA – configuração absoluta, *ee*% – excesso enantiomérico, utilizando metodologia 2 em CG-Quiral conforme item 4.6.4 (p. 86)

Conforme pode-se observar nos cromatogramas (Figura 37 e 38), o teste com amostra de 100mg resultou em um processo de biocatálise com pequeno excesso enantiomérico, mesmo com o desbotamento da coloração inicial (Tabela 35, Entrada 1). Enquanto que o teste com amostra de 1000mg, além de resultar no desbotamento total e mortalidade do meio de cultura algal, ocorreu a biodegradação do substrato acetofenona e possivelmente dos produtos formados (Tabela 35, Entrada 5) conforme visto na Figura 38.



**Figura 37.** Cromatograma referente ao ensaio de tolerância da Entrada 1 com 100mg de substrato acetofenona biocatalizado em meio de cultura algal saturado



**Figura 38.** Cromatograma referente ao ensaio de tolerância da Entrada 5 com 1000mg de substrato acetofenona biocatalizado em meio de cultura algal saturado.

Deste modo, pode-se inferir que o processo metabólico das microalgas pode estar diretamente relacionado com a reação de biocatálise do substrato acetofenona, uma vez que a biodegradação do meio de cultura das microalgas não somente degradou as mesmas, como também o substrato. Este indicativo

pode ser reforçado quando analisamos o cromatograma da amostra 1000mg (Entrada 5, Figura 38), que apresenta um pico na mesma região do produto de biocatálise (Entrada 1, Figura 37), sugerindo que ao longo de seu processo metabólico ocorreu uma conversão bioquímica preferencial entre um dos enantiômeros. No entanto, o pico observado é muito pequeno e sugere que o processo de biocatálise foi direcionado para uma nova rota metabólica, ou seja, a biodegradação. A partir dos resultados e inferências realizadas, buscou-se trabalhar na otimização do meio reacional e mitigar o efeito tóxico da acetofenona a partir dos seguintes incrementos: homogeneização do meio reacional por agitação magnética e ordem de adição na preparação do meio reacional.

### **5.3.2 INFLUÊNCIA DO METABOLISMO DAS MICROALGAS NA BIORREDUÇÃO DA ACETOFENONA**

Com o objetivo de avaliar a influência dos fatores biológicos relacionados a taxa metabólica das microalgas e diminuir a interferência da acetofenona como contaminante, buscou-se desenvolver um meio de cultura que pudesse estimular uma dinâmica de crescimento adaptativa à presença da acetofenona, resultando em um processo de seleção natural das espécies de microalgas no meio reacional. Sendo assim, a acetofenona deixaria de ser um contaminante e passaria a participar do processo metabólico das microalgas sem interferir em seu crescimento.

Para isso foi desenvolvido um método de preparo e estabelecido uma ordem de adição em que as microalgas realizariam sua adaptação e seu crescimento no próprio meio reacional com acetofenona homogeneizada em solução AMA enriquecida de meio Conway (WALNE, 1979). Também foi adicionado ao meio de cultura o processo de agitação magnética, que segundo Contreras Flores et al. (2003) é um parâmetro importante na produção de microalgas, pois a movimentação favorece o intercâmbio gasoso entre as células e o meio, evitando assim a sedimentação de biomassa e consequente formação de gradientes nas condições de cultivo. Levando em consideração a presença da acetofenona que é uma substância não solúvel em água, o incremento da

agitação ao meio de cultura algal aquoso, deve favorecer a inibição na formação de gradientes conforme citado anteriormente.

Primeiramente, foi preparado o meio de cultura com adição de 60mL de solução AMA, enriquecida de meio Conway (WALNE, 1979) com adição de 0,1mL de solução principal e 0,1mL de solução de vitaminas. Em seguida foi adicionado 200mg (1,7mmol) de acetofenona ao meio de cultura e submetido a agitação magnética durante 15 minutos para homogeneização do substrato no meio de cultura.

Após homogeneização da acetofenona, adicionou-se 20mL de solução saturada de microalgas ao meio de cultura e manteve-se o sistema sob agitação magnética, aeração e fotoperíodo contínuo ao longo de 24 horas em sistema fechado. Passado o período de 24 horas, adicionou-se novamente ao meio reacional mais 20mL de solução saturada de microalgas e mantido o sistema sob agitação magnética, aeração e fotoperíodo constante por mais 48 horas em sistema fechado, totalizando um período de 72 horas (Figura 39).



**Figura 39.** Biotatálise do substrato acetofenona realizada por microalgas *Dunaliella salina* no período de 72 horas em solução AMA, enriquecida com meio Conway (WALNE 1979)

Diferentemente do teste realizado anteriormente, no item 5.3.1 (p.0), o que se observou ao longo do período reacional neste ensaio, foi a manutenção da coloração verde e aumento de sua intensidade (Figura 39). Sinalizando conseqüentemente o crescimento das microalgas e sua adaptação ao meio de cultura com a presença do substrato acetofenona.

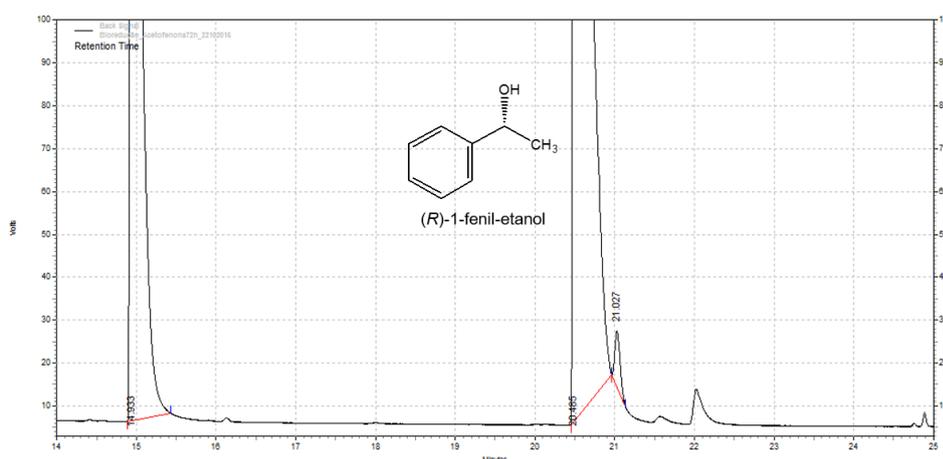
Segundo resultados apresentados do produto obtido na reação de biocatálise (Tabela 36 e Figura 40), demonstra não somente a ação biocatalítica das microalgas, mas também sua característica como biocatalisador assimétrico,

conforme resultado da ocorrência preferencial para a formação do enantiômero (*R*)-1-fenil-etanol com excesso enantiomérico de aproximadamente 97%.

**Tabela 36.** Resultados de conversão e excesso enantiomérico referente as reações de biocatálise da acetofenona em solução AMA enriquecido com meio Conway (WALNE, 1979) com tempo reacional de 72 horas

Entrada	Conversão (%)	CA	ee (%)
6	61,3	(S)	96,7

**Nota.** Conversão% - conversão do substrato em produto, CA – configuração absoluta, ee% – excesso enantiomérico, ambos utilizando metodologia 2 em CG-Quiral conforme item 4.6.4 (p. 86)



**Figura 40.** Cromatograma referente ao produto (*R*)-1-fenil-etanol obtido da biocatálise do substrato acetofenona por microalgas *Dunaliella salina* no período de 72 horas

Embora a reação tenha apresentado um alto excesso enantiomérico, a taxa de conversão da acetofenona não obteve o mesmo sucesso, apresentando resultado de 61%. Logo, pode-se inferir que além do fator biológico, o tempo de reação deve ser um dos fatores importantes para conversão na reação de biocatálise.

### 5.3.3 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE REAÇÃO NA REAÇÃO DE BIOCATÁLISE

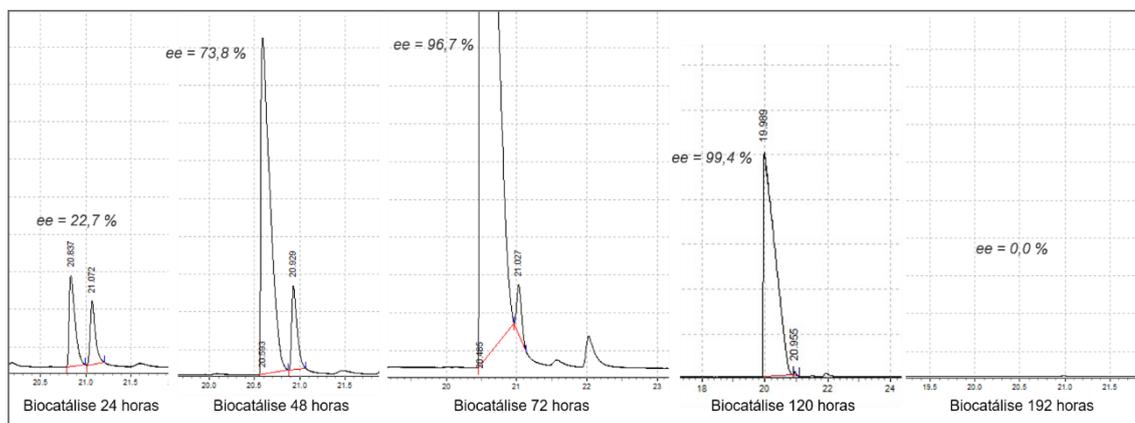
Diante dos valores de conversão e excesso enantiomérico obtidos até então, buscou-se avaliar o tempo de reação de biocatálise, realizando ensaios com

tempos de 24, 48, 120, 144 e 192 horas de reação, conforme metodologia descrita no item 4.8 (p. 91) e massa de 200mg (1,7mmol) do substrato acetofenona. Os resultados obtidos das reações de biocatálise, seguem descritos respectivamente na Tabela 37 e Figura 41.

**Tabela 37.** Resultados de biocatálises com diferentes tempos de reação, rendimento bruto, taxa de conversão, configuração absoluta e excesso enantiomérico

Entrada	Tempo de reação	Rend. Bruto	C (%)	CA	Ee
7	24 horas	94%	0,3	R	22,7
8	48 horas	92%	5,7	R	73,8
9	72 horas	80%	61,3	R	96,7
10	120 horas	35%	100,0	R	99,4
11	192 horas	0,0%	0.0	-	0,0

**Nota.** Rend. Bruto – rendimento obtido da massa do produto isolado por extração sem purificação e C% - conversão do substrato em produto, CA – configuração absoluta, ee% – excesso enantiomérico, ambos utilizando metodologia 2 em CG-Quiral conforme item 4.6.4 (p. 86)



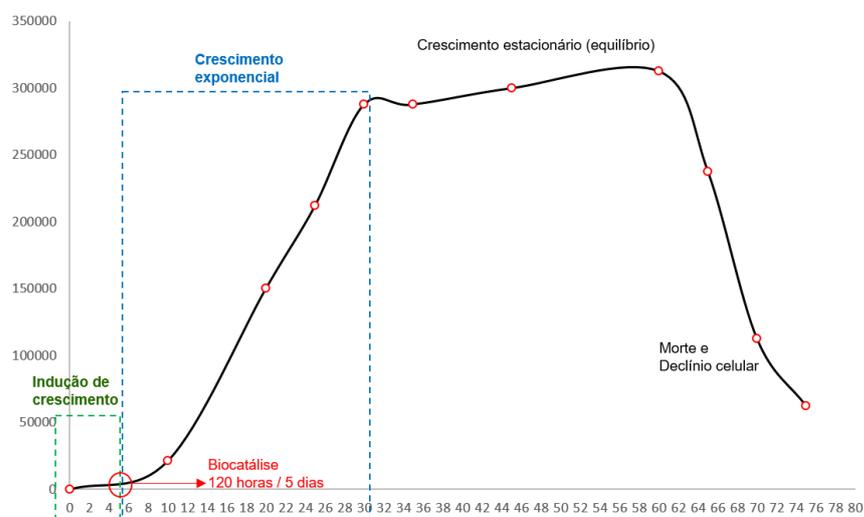
**Figura 41.** Cromatograma referente aos produtos obtidos dos ensaios de biocatálise em períodos de 24, 48, 72, 120 e 192 horas respectivamente

Quando comparamos os resultados obtidos para os diferentes tempos de reação (Figura 41), pode-se concluir que existe um valor limite no fator tempo, onde a partir de 120 horas (5 dias) a rota metabólica deixa de ser a reação de biocatálise e supostamente passa a ser o consumo do produto através da biodegradação do mesmo. Outro fator que vem a corroborar com esta observação, é quando analisamos o rendimento bruto entre os valores da

Entrada 9 e 10 (Tabela 37), que demonstram uma queda no rendimento bruto, apesar do aumento na taxa de conversão. Conforme resultado, podemos inferir que esta queda no rendimento bruto seja justamente o início da degradação do produto (*R*)-1-fenil-etanol. Segundo literatura (ANDRADE e FILHO, 2014), as microalgas podem alternar seu metabolismo na obtenção de carbono ao longo de seu desenvolvimento, conforme nutrientes disponíveis no meio de cultivo.

Devido a suas características de alta eficiência fotossintética, rápida taxa de proliferação, ampla adaptabilidade e tolerância a ambientes extremos, implicam em uma ampla diversidade metabólica. Diante disto, provavelmente ao longo da reação de biocatálise, a obtenção de carbono das microalgas pode estar alterando o metabolismo autotrófico (fonte de carbono inorgânico) para um metabolismo mixotrófico, onde a fonte de carbono passa a ser inorgânica e orgânica. Consequentemente, pode-se inferir que após 120 horas de reação, o produto da biocatálise (*R*)-1-fenil-etanol, presente no meio, torna-se a fonte de carbono orgânico disponível para as microalgas desenvolverem seu crescimento via metabolismo mixotrófico. O Gráfico 5, apresenta uma análise das fases de desenvolvimento das microalgas com as reações de biocatálise das Entradas 10 e 11 (Tabela 36).

**Gráfico 5.** Análise das fases de desenvolvimento das microalgas com as reações de biocatálise de 120 e 192 horas



Analisando o Gráfico 5, pode-se verificar que a reação de 120 horas (Entrada 10, Tabela 36), corresponde a 5 dias e está relacionado com ao limite

da fase Lag (indução do crescimento das microalgas), caracterizada por baixos níveis de metabolismo. Enquanto a reação de 192 horas (Entrada 11, Tabela 36) corresponde a 8 dias e está associado ao início do período da fase Log (crescimento exponencial), identificado por altos níveis crescimento e intenso metabolismo.

Conforme dados observados acima, pode-se inferir que a taxa ou nível de metabolismo das microalgas está relacionada diretamente com sua ação biocatalítica e com o controle da reação de biocatálise do substrato acetofenona em (*R*)-1-fenil-etanol. Pode-se inferir também que o tempo de reação da biocatálise está relacionado com as etapas de metabolismo, sugerindo que a fase de indução de seu crescimento (Gráfico 5), onde o nível metabólico é moderado, seja o período ideal para a reação de biocatálise. Pois em níveis de crescimento exponencial, onde esta etapa é identificada como de alto nível metabólico, a reação de biocatálise deixa de ser a rota de interação com o substrato, passando para uma fase de atividade catalítica tão intensa onde o substrato se torna um insumo para o crescimento das microalgas.

#### **5.3.4. BIORREDUÇÃO COM MICROALGAS LIOFILIZADAS**

Após o estudo sobre a influência do metabolismo e tempo de reação na biocatálise do substrato acetofenona em (*R*)-1-fenil-etanol, restava verificar se a biocatálise estava relacionada somente ao crescimento das microalgas ou se a reação de biorredução da acetona poderia ocorrer mesmo com as microalgas inativas, ou seja, sem desenvolver seu crescimento.

Esta análise tem fundamentação nos estudos realizados acerca das reações de biocatálise de cetonas, incluindo acetofenona, utilizando como biocatalisadores, raízes de vegetais como a cenoura (*Daucus carota*) (YADAV 2002). Estas espécies possuem em sua composição enzimas conhecidas como desidrogenases, pertencentes a uma subclasse das oxidoredutases, responsáveis por realizar as reações de oxido-redução. Nestes estudos o biocatalisador não é um micro-organismo vivo em desenvolvimento, e mesmo assim apresenta eficiente atividade biocatalítica com excelentes resultados de

rendimento e excesso enantiomérico respectivamente, 73% e 92% (YADAV 2002).

Segundo literatura (LEE, 2008; MUTANDA et al., 2011), as microalgas apresentam semelhanças aos vegetais superiores, como capacidade de realizar fotossíntese oxigênica, mesmo possuindo características bem distintas como a ausência de tecidos vasculares (ANDRADE e FILHO, 2014). Diante a semelhança entre as espécies, a hipótese da presença das enzimas desidrogenases na composição das microalgas demonstra ser bem razoável, portanto buscou-se realizar a inativação das microalgas sem degradar as substâncias presentes em sua composição a fim de verificar sua ação enzimática.

Para isso foi utilizada a técnica de liofilização descrita no item 4.6.7 (p. 90), que consiste na desidratação da substância em questão sem alterar suas propriedades químicas. Embora as substâncias presentes mantenham conservadas, este processo possui uma etapa de congelamento que resulta na ruptura da parede celular das microalgas, ocasionando sua mortalidade e efetiva inativação celular. Dessa maneira obteve-se um pó com coloração verde semelhante a cor características das microalgas em solução, conforme apresentado na Figura 42.

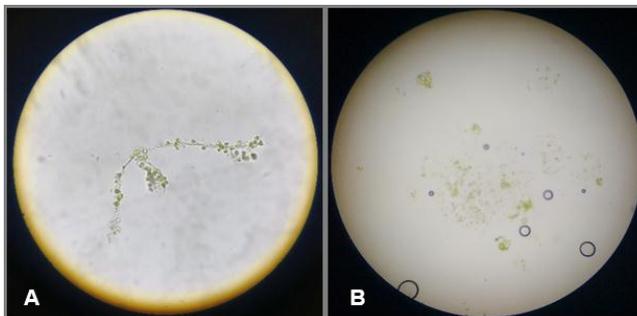


**Figura 42.** Microalgas *Dunaliella salina* liofilizadas em pó

**Fonte:** Autor (2016)

Com o propósito de avaliar o resultado da inativação das microalgas, foi realizado sua observação em microscópio óptico, dissolvendo o pó liofilizado em solução AMA. O resultado foi a observação de aglomerados de células estáticas (Figura 43), sem apresentar nenhum sinal de movimentação das células (motilidade), característica determinante para células de microalgas marinhas

*Dunaliella salina* que possuem movimentação devido à presença de flagelos em sua estrutura celular (RICHMOND, 2004; TOMASELLI, 2004; BARSANTI et al., 2006).



**Figura 43.** Imagem microscópica com aumento de 400x de microalgas liofilizadas realizadas em equipamento microscópio óptico OPTON modelo TNB-01B,

**Nota.** A - dissolvida em solução AMA; B- dissolvida em solução AMA, enriquecida com meio Conway (WALNE, 1979) e mantida sob aeração e fotoperíodo constante ao longo de 24 horas

**Fonte:** Autor (2016)

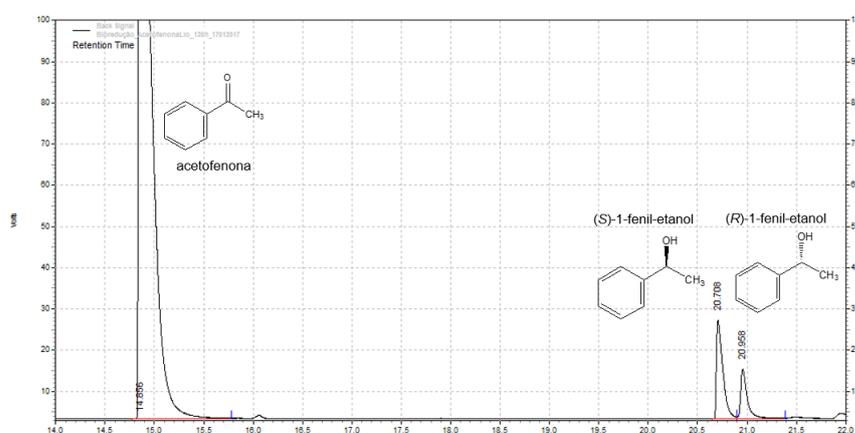
Com intuito de verificar se não ocorreria atividade metabólica das microalgas em contato com o meio de cultura, foi realizado um ensaio dissolvendo 4,0g do pó liofilizado em erlenmeyer, em seguida adicionando 60mL de solução AMA, enriquecida de meio Conway (WALNE, 1979) com adição de 0,1mL de solução principal e 0,1mL de solução de vitaminas. O sistema foi mantido sob aeração e fotoperíodo constante ao longo de 24 horas. Após este período, foi coletada amostra e realizada análise microscópica. O resultado observado foi o mesmo da análise anterior, ou seja, não havia células de microalgas vivas, como pode ser observado na Figura 44-B.

Após verificação da atividade das microalgas, foi realizado ensaio de biocatálise com as microalgas liofilizadas, utilizando massa de 8,0g de microalgas liofilizadas em pó, seguindo metodologia descrita no item 4.8 (p. 91) com período reacional de 120 horas, sob aeração e agitação constante com fotoperíodo contínuo. Os resultados da biorredução com as microalgas liofilizadas seguem descritas na Tabela 38 e Figuras 44 e 45 respectivamente.

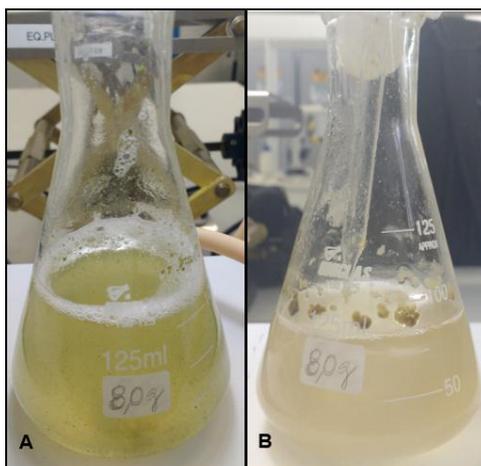
**Tabela 38.** Resultado da biocatálise com microalgas *Dunaliella salina* liofilizadas em pó com tempo reacional de 120 horas

Entrada	Tempo de reação	C	CA	ee
		(%)		(%)
12	120 horas	9,7	S	31,5

**Nota.** C% - conversão do substrato em produto, CA – configuração absoluta, ee% – Excesso enantiomérico medidos por CG-Quiral, ambos utilizando metodologia 2 em CG-Quiral conforme item 4.6.4 (p. 86)



**Figura 44.** Produto de biocatálise da acetofenona com microalgas *Dunaliella salina* liofilizadas após 120 horas de reação.

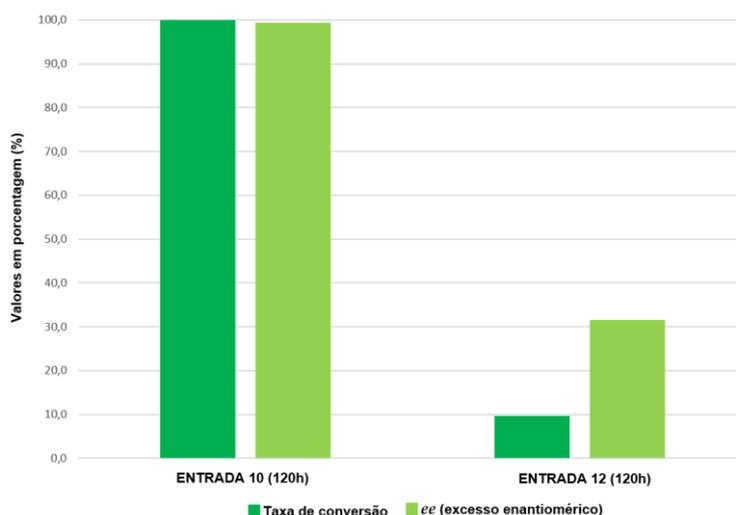


**Figura 45.** Imagem referente a biocatálise da acetofenona com microalgas liofilizadas, A - aparência inicial do meio reacional e B - aparência do meio reacional após 120 horas

**Fonte:** Autor (2016)

O resultado obtido para o produto de biocatálise após 120 horas de reação com as microalgas liofilizadas foi uma conversão de 9,7% seguido de um excesso enantiomérico no valor de 31,5% (Tabela 37). Embora a biocatálise com as microalgas liofilizadas tenha apresentado resultado de ação enzimática, os valores podem ser considerados irrelevantes para afirmar que exista influência ou mesmo outro componente com atividade biocatalítica relevante na conversão da acetofenona (Gráfico 6).

**Gráfico 6.** Comparativo das taxas de conversão e excesso enantiomérico entre as reações de biocatálise com microalgas vivas e microalgas liofilizadas com tempo reacional de 120 horas



Visto que, quando comparamos o resultado apresentado na Tabela 35, correspondente a Entrada 10, com o resultado da Tabela 37, correspondente a Entrada 12, podemos concluir que a reação de biocatálise da acetofenona somente é efetiva quando as microalgas possuem atividade metabólica, ou seja, estão vivas e em sua fase de crescimento, conforme pode ser observado no comparativo observado no Gráfico 6.

### 5.3.5. CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO DE VITAMINAS

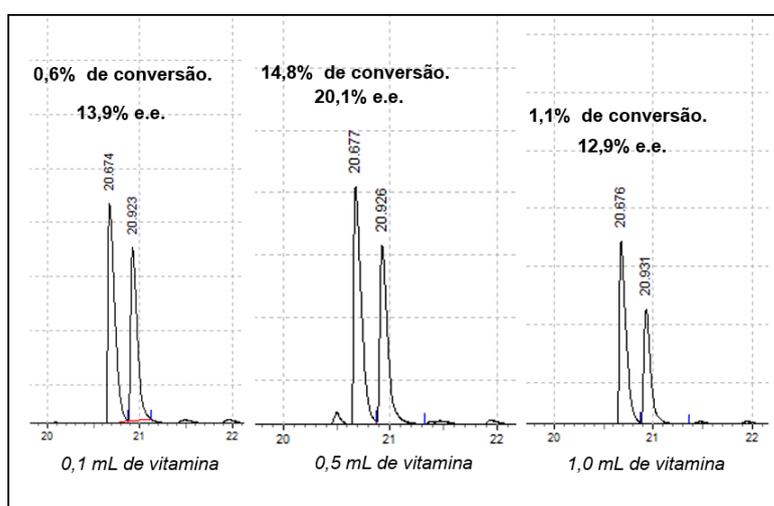
Em geral a presença de vitaminas B1 (Tiamina), B7 (Biotina) e B12 (Cianocobalamina) possuem um papel importante no processo de desenvolvimento das microalgas, onde pode-se destacar a função de ação como

coenzima e atuação no transporte do CO<sub>2</sub> no processo de fotossíntese (LOURENÇO 2006). Assim, foram realizados três cultivos de microalgas com diferentes valores de adição, referente a solução de vitaminas no meio de cultura, com o intuito de avaliar sua influência nas reações de biocatálise da acetofenona. O método de cultivo foi realizado seguindo o mesmo procedimento descrito no item 4.2.2 (p.0), utilizando 200mg (1,7 mmol) de massa do substrato em um período de 24h. As quantidades de solução de vitamina adicionadas foram 0,1mL, 0,5mL e 1,0mL respectivamente para cada ensaio. A partir dos resultados apresentados (Tabela 39 e Figura 46), pode-se concluir que o volume de adição referente à solução de vitaminas interfere, não somente no excesso enantiomérico, como também na taxa de conversão.

**Tabela 39.** Resultados das reações de biorredução da acetofenona com diferentes quantidades de adição de solução de vitaminas

Entrada	Solução de vitaminas (mL)	C (% Área)	CA	ee (% Área)
13	0,1	0,6	(R)	13,9
14	0,5	14,8%	(R)	20,1
15	1,0	1,1%	(R)	12,9

**Nota.** C% - conversão do substrato em produto, CA – configuração absoluta, ee% – Excesso enantiomérico, ambos utilizando metodologia 2 em CG-Quiral conforme item 4.6.4 (p. 86)



**Figura 46.** Cromatogramas referentes aos produtos quirais obtidos dos ensaios com diferentes volumes de adição 0,1mL, 0,5mL e 1,0mL respectivamente de solução de vitaminas

A melhor condição apresentada foi curiosamente o valor intermediário correspondente a 0,5 mL de solução de vitaminas. Isso demonstra que o excesso de vitaminas pode gerar um efeito negativo no desenvolvimento das microalgas, contrariando uma aparente expectativa de que o aumento das vitaminas no meio reacional implicaria em um aumento na conversão e conseqüente excesso enantiomérico.

### 5.3.6. ADIÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO

A maioria das microalgas do gênero clorófitas (*Dunaliella salina*) utilizam basicamente como principal fonte de energia para seu desenvolvimento a luz e o CO<sub>2</sub>, ou seja, são fotoautotróficas, portanto dependentes da fotossíntese. A fotossíntese realizada pelas microalgas é oxigênica, e consiste em uma reação química de redução onde a energia luminosa é transformada em energia química em virtude da conversão do CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O em carboidratos (CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub> e O<sub>2</sub> (BARSANTI; GUALTIERI, 2006). Embora possa ocorrer o processo de heterotrofia facultativa (consumo do carbono orgânico disponível no meio para conversão de energia), o processo de fototrofia é via obrigatória para produção dos componentes essenciais para sua sobrevivência (ANDRADE et al.,2014). Logo, buscou-se realizar ensaios com a adição de CO<sub>2</sub> ao meio reacional e avaliar seus efeitos na reação de biocatálise da acetofenona (Figura 47).



**Figura 47.** Sistema de produção de CO<sub>2</sub> e adição do mesmo no meio de cultura algal  
**Fonte.** Autor (2016)

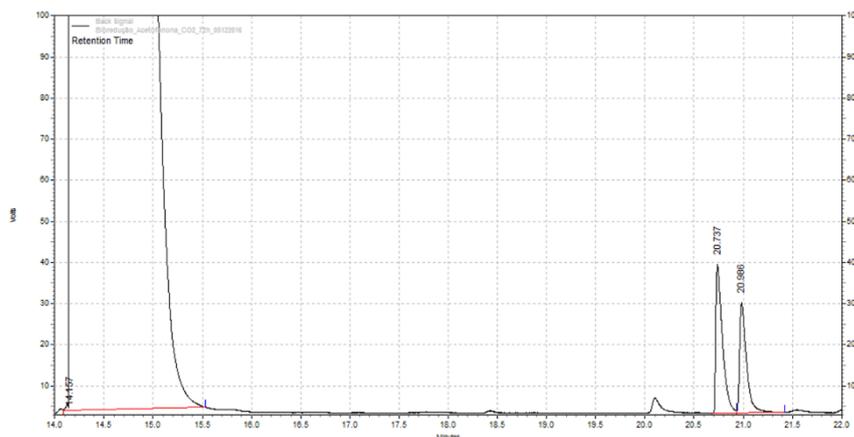
Para isso, foi necessário montar um sistema de produção de CO<sub>2</sub>, conforme segue ilustrado na Figura 48, na qual a solução aquosa de HCl era gotejada em solução aquosa de NaHCO<sub>3</sub>, gerando como produto CO<sub>2</sub>. O CO<sub>2</sub> formado, era transferido pela mangueira acoplada ao frasco de kitassato e inserido no meio de cultura por uma pipeta graduada acoplada na saída da mangueira que borbulhava o CO<sub>2</sub> produzido, no meio de cultura algal.

O ensaio de biocatálise com adição de CO<sub>2</sub> ao meio algal, foi utilizado o procedimento descrito no item 4.8 (p. 91) com adição de 200mg (1,7mmol) de substrato acetofenona com tempo reacional de 72 horas. Os resultados seguem descritos na Tabela 40 e na Figura 48 respectivamente.

**Tabela 40.** Resultado da reação de biorredução da acetofenona com adição de CO<sub>2</sub>

Entrada	C	CA	e.e.
	(% Área)		(%)
16	0,6	(R)	14,5

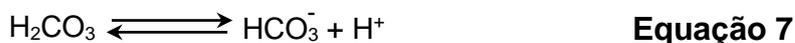
**Nota.** C% - conversão do substrato em produto, CA – configuração absoluta, ee% – excesso enantiomérico, ambos utilizando metodologia 2 em CG-Quiral conforme item 4.6.4 (p. 86)



**Figura 48.** Cromatograma do produto obtido da biocatálise da acetofenona com microalgas em meio de cultura algal com adição de CO<sub>2</sub> e tempo reacional de 72 horas.

A taxa de conversão apresentada na Tabela 38 para a biocatálise com adição de CO<sub>2</sub> foi muito baixa, resultando em cerca de 0,6% e o excesso enantiomérico em 14,5%. Quando comparamos o resultado da Entrada 16 (Tabela 38) com os resultados da Entrada 9 (Tabela 37, p. 112), que possui

tempo reacional equivalente, os resultados são muito superiores. A Entrada 9 (Tabela 37, p. 112) apresenta valores de 61,3% e 96,7% de conversão e excesso enantiomérico respectivamente. Durante o processo de adição do CO<sub>2</sub>, ocorreu grande dificuldade de controle do borbulhamento do gás produzido da reação de neutralização no meio de cultura algal. Este fato pode ter ocasionado um excesso de CO<sub>2</sub> dissolvido no meio de cultura algal, resultando na acidificação (diminuição do pH) a partir da formação de íons H<sup>+</sup>, conforme ilustrado nas equações de equilíbrio (Equações 6, 7 e 8) (RICHMOND, 2004).

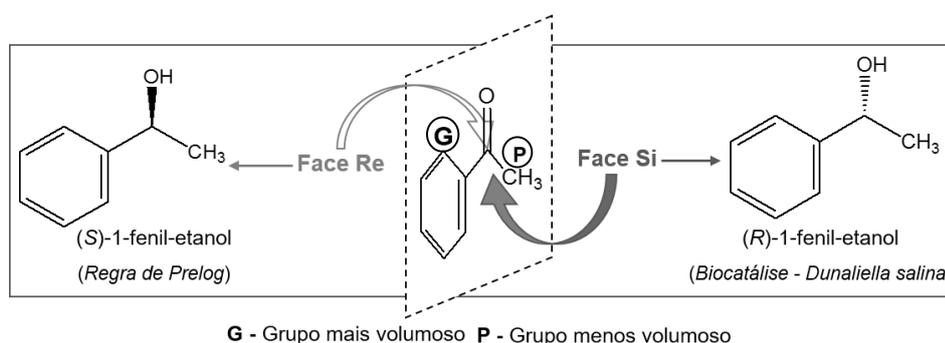


De acordo com literatura (RAVEN,1990), o pH do meio de cultura algal deve ser mantido em valores entre neutro a alcalino, para a maioria das espécies de microalgas. Pois a alteração do mesmo pode influenciar a solubilidade dos minerais no meio de cultura algal como também implicar de maneira direta ou indireta no metabolismo das microalgas. Desta forma, pode-se concluir que o resultado obtido na análise referente ao efeito da adição de CO<sub>2</sub> na reação de biocatálise da acetofenona não pode ser utilizado como parâmetro de comparação para efeito de rendimento da conversão biocatalítica. Devendo apenas, ser considerado o efeito da quantidade de CO<sub>2</sub> dissolvido no meio reacional, onde quantidades elevadas inibem não somente o crescimento das microalgas como também a ação biocatalítica das mesmas com o substrato acetofenona.

## 6. CONCLUSÃO

O emprego das microalgas da espécie *Dunaliella salina* na redução assimétrica da acetofenona no álcool (*R*)-1-fenil-etanol, apresentou resultados bem interessantes de excesso enantiomérico para reação de 3 dias (72 horas) com 96,7%ee e para reação de 5 dias (120 horas) com resultado de 99,4%ee.

Segundo literatura (ELIEL, 1974), uma das condições necessárias para que uma síntese assimétrica seja considerada de utilidade, a mesma deve ser muito seletiva e apresentar valores iguais ou acima de 85% ee. Portanto, o emprego das microalgas da espécie *Dunaliella salina* como biocatalisador, pode ser considerada pelos resultados apresentados, de utilidade em síntese orgânica assimétrica. A configuração absoluta do produto majoritário (*R*)-1-fenil-etanol, proveniente da biorredução com microalgas *Dunaliella salina*, contradiz o resultado previsto pela regra de Prelog (Esquema 18).



**Esquema 18.** Representação esquemática da Regra de Prelog, referente a face enantiotópica preferencial de ataque a carbonila, considerando a posição e volume dos substituintes

**Fonte.** Autor (2017)

Segundo a regra de Prelog (RESENDE, 2007), a redução assimétrica de grupos carbonílicos, ocorre através da transferência do íon hidreto preferencialmente pela face menos impedida, que neste caso seria a face Re para acetofenona (Esquema 19), originando no produto majoritário (*S*)-1-fenil-etanol. As reações com raízes da espécie *Daucus carota* (cenoura) seguem a lógica da regra de Prelog (YADAV et al., 2002). Logo, as microalgas além de apresentarem valores de excessos enantioméricos tão bons quanto aos obtidos em métodos já consolidados (raízes de *Daucus carota*), também demonstram potencial em obter produtos com configuração absoluta diferente do previsto pela regra de Prelog (Tabela 41).

**Tabela 41.** Comparação entre os produtos obtidos da biocatálise com emprego de células íntegras de raízes *Daucus carota* e Microalgas da espécie *Dunaliella salina*

Parâmetros	<i>Daucus carota</i> <sup>1</sup>	<i>Dunaliella salina</i>
Substrato	Acetofenona	Acetofenona
Produto	(S)-1-fenil-etanol	(R)-1-fenil-etanol
TR	40h	120h
CA	S	R
ee %	92,0	96,7

**Nota.** <sup>1</sup>Yadav et al., (2002); TR – tempo de reação; CA – configuração absoluta, ee% – excesso enantiomérico

Neste sentido, os resultados com as microalgas *Dunaliella salina* também são positivos quando comparados a trabalhos realizados com outras espécies de microalgas como *Dunaliella parva* e *Chlorella minutíssima* (Tabela 42) (HOOK et al., 2003).

**Tabela 42.** Comparação entre os resultados da *Dunaliella salina* com *Dunaliella parva* e *Chlorella minutíssima* na biorredução assimétrica da acetofenona

Microalgas	Substrato	Solvente	Produto	ee %
<i>Dunaliella salina</i>	Acetofenona	H <sub>2</sub> O	(R)-1-fenil-etanol	96,7
<i>Dunaliella parva</i> <sup>1</sup>	Acetofenona	H <sub>2</sub> O; CH <sub>3</sub> OH	(S)-1-fenil-etanol	29,5
<i>Chlorella minutíssima</i> <sup>2</sup>	Acetofenona	H <sub>2</sub> O; CH <sub>3</sub> OH	(S)-1-fenil-etanol	14,9

**Nota.** <sup>1,2</sup>Hook et al., (2003); ee% – excesso enantiomérico

Considerando a necessidade de síntese enantiosseletiva para produtos como fármacos, em que sua atividade biológica possui relação direta com sua configuração absoluta, as características de especificidade e estereosseletividade apresentada pelas microalgas *Dunaliella salina* como a síntese de produtos que não obedecem a regra de Prelog, pode ser empregada na investigação de síntese de compostos intermediários e blocos de construção quiral.

Outro fator importante a ser considerado no estudo do emprego das microalgas *Dunaliella salina* como biocatalisadores foi a quantidade em massa de substrato acetofenona utilizada no presente trabalho (200mg; 1,7mmol),

usando apenas H<sub>2</sub>O como solvente, no qual trabalhos com microalgas em literatura (HOOK et al., 2003), apresentam a utilização de solventes auxiliares, como CH<sub>3</sub>OH na solubilização do substrato, além de operar com pequenas quantidades de massas de acetofenona (100ppm). A definição em usar apenas H<sub>2</sub>O como solvente, consiste no fato de empreender o conceito de solventes sinérgicos ao meio ambiente, possibilitando seu reaproveitamento e resultando em menor impacto ao meio ambiente. Além disso, seu uso possibilitou mimetizar o meio de cultura algal, proporcionando a interação das microalgas com o substrato acetofenona, mitigando conseqüentemente sua interferência como substância tóxica ao longo do processo de biocatálise.

Diante do que foi apresentado no presente trabalho, podemos concluir que o emprego de microalgas marinhas *Dunaliella salina* em biocatálise, possui amplo potencial de bioprospecção em catálise assimétrica, possibilitando uma nova rota enzimática de células íntegras na síntese orgânica de álcoois quirais.

## 7. REFERÊNCIAS

ANDERSEN, R. A. Biology and systematics of heterokont and haptophyte algae. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 91, n. 10, p. 1508-1522, 2004.

ANDRADE, D. S.; FILHO, A. C. Microalgas continentais: potencialidades e desafios do cultivo. **Coleção IPR de Microalgas**, v. 2, Londrina: IAPAR, 2014.

ASSUNÇÃO, J. C. C.; MACHADO, L. L.; LEMOS, T. L. G.; CORDEL, G. A.; MONTE, F. J. Q. Sugar Cane for the Bioreduction of Carbonyl Compounds. **Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic**. v. 52, p. 194-198, 2008.

ARAVANTINOU, A. F.; THEODORAKOPOULOS, M. A.; MANARIOTIS, I. D. Selection of microalgae for wastewater treatment and potential lipids production. **Bioresource Technology**, 2013.

BARBOSA, M. J. G. V. **Microalgal photobioreactors: scaleup and optimisation**. 2003, 166f. Tese (Doutorando em Ciências) – Wageningen University.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology**. Boca Raton: Taylor & Francis group, 2006.

BEN-AMOTZ, A.; AVRON, M.. The Role of Glycerol in the Osmotic Regulation of the Halophilic Alga *Dunaliella parva*. **Plant Physiology**, n. 51, p. 875, 1973.

BISPO, J. R. S. **Resolução enzimática do (R/S)-acetato de 1-feniletila, empregando-se cascas de maracujá (*Passiflora edulis*)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química)-Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

BIZERRA, A. M. C.; GONZALO, G.; LAVANDERA, I.; GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; MATTOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; LEMOS, T. L. G.; GOTOR, G. Reduction

processes biocatalysed by *Vigna unguiculata*. **Tetrahedron: Asymmetry**. v. 21, p. 556-570, 2010

BORZANI, W. et al. **Biotecnologia industrial: fundamentos**. São Paulo: Edgard Blucher, v. 1, p. 254, 2001.

BRIASSOULIS, D. et al. An experimental helical-tubular photobioreactor for continuous production of *Nannochloropsis sp.* **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, p. 6768-6777, 2010.

CAO, C.; FUKAE, T.; YAMAMOTO, T.; KANAMARU, S.; MATSUDA, T. Purification and characterization of fluorinated ketone reductase from *Geotrichum candidum* NBRC 5767. **Biochemical Engineering Journal**, v. 76, p.13-16, 2013.

CARVALHO, A. P.; MEIRELLES, L. A.; MALCATA, F. X. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. **Biotchnology Progress**, Hoboken, v. 22, n. 6, p. 1490-1506, 2006.

CHEN C.; ZHANG S.; DENG X.; YANG Z.; YU F.; HOU.; Y. Asymmetric reduction of prochiral ketones to chiral alcohol by photo-biocatalysis with microalgae. **International Conference on Biology and Biomedicine**. Wuhan University of Science and Technology, 2013.

CHEN J.Y.; WEN, P.F.; KONG, W.F.; PAN, Q.H.; ZHAN, J.C.; LI, J.M.; WAN, S.B.; HUANG, W.D. Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonialyase in haversted grape berries. **Postharvest Biology an Technology**, v. 40, p. 64 – 72, 2006.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**. New York, v. 25, p. 294-306, 2007,

CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F. J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**. v. 3, n. 1, p. 21-34, 2004.

CHOI, M. J.; HAN S. S.; KIM S. H.; Industrial applications of enzyme biocatalysis current status and future aspects. **Elsevier**, JBA-06909, 2015.

CORDELL, G. A.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; MATTOS, M. C. Vegetables as chemical reagents. **Journal of Natural Products**. v. 70, p. 478-494, 2007.

DA MATA, C. B.; SOUZA, E. T.; QUEIROZ, A.C.; LIRA, D.; P.; ARAÚJO, M. V. Antinoceptive and anti-inflammatory activity from algae of the genus *Caulerpa*. **Marine Drugs**, v. 9, p. 307, 318, 2011.

DEBASHISH, G; MALAY, S.; BARINDRA, S.; JOYDEEP, M. Marine enzymes. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 96, p. 189-218, 2005.

DEL CAMPO, J.; GARCÍA-GONZÁLES, M.; GUERREIRO, M. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin: v. 74, n. 6, p. 1163-1174, 2007.

DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

DONADIO, C.; BIALECKI, A.; VALLA, A.; DUFOSSÉ, L. Carotenoid-derived aroma compounds detected and identified in brines and speciality sea salts (*fleur de sel*) produced in solar salterns from Saint-Armel (France). **Journal of Food Composition and Analysis**, n. 24, p. 801, 2011.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. 5.ed. Berlin: Springer-Verlag, 2004.

FACCIOTI, M. C. R. Fermentação contínua. In: BORZANI, W. et al. (Coord.). **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, v. 2, p. 223-246, 2001.

FARIA, G. R.; PAES, C. R. P. S.; CASTRO, D. J. F. A.; TINOCO, N. A. B.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. Effects of the availability of CO<sub>2</sub> on growth, nutrient uptake, and chemical composition of the marine microalgae *Chlorella sp.* and *Nannochloropsis oculata*, two potentially useful strains for biofuel production. **International Research Journal of Biotechnology**, n. 3, p. 65, 2012.

FELICIO, R.; OLIVEIRA, A. L. L.; DEBONSI H. M. Bioprospecção a partir dos oceanos: conectando a descoberta de novos fármacos aos produtos naturais marinhos. **Ciência e Cultura**. São Paulo: v. 64, n. 3, 2012

FERRER, M.; GOLYSHINA, O.; BELOQUI, A.; GOLYSHIN, P. N. **Mining enzymes from extreme environments**. *Current Opinion in Microbiology*. v. 10, p. 207-214, 2007.

FISCHER E. **Ber. dtsh . chem. Ges**, n. 27, p. 2985, 1894

FONSECA, A. M.; MONTE, F. Q.; DE OLIVEIRA, M. F.; DE MATTOS, M. C.; LEMOS, T. G.; CORDELL, G. A. Coconut water (*Cocos nucifera L.*) – A new biocatalyst system for organic synthesis. **Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic**. in press, 2008.

GUILLARD, R. R. L. Purification methods dor microalgal. In: ANDERSEN, R. A. (Ed). *Algal culturing techniques*, Amsterdam: Elsevier academic press. p. 117-132, 2005.

GRUNWALD, P. **Biocatalysis: biochemical fundamental and applications**. London: Imperial College, 2009. 1035p.

HATANAKA, Y. Study on the practical application of halotolerant microalgae *Dunaliella*. Kobe University: **Doctoral Dissertation**, 1999.

HERRERO, M.; IBAÑES, E.; CIFUENTES, A.; REGLERO, G.; SANTPYO, S. *Dunaliella salina* microalga pressurized liquid extracts as potential antimicrobials. **Journal of Food Protection**, n. 69, p. 2471, 2006.

HENRIQUES, N. M. et al. *Dunaliella*: uma fonte natural de beta-caroteno com potencialidades de aproveitamento biotecnológico. **Biotecnologia de Microlgas**, Faro: Portugal, v. 61, p. 12-18, 1998.

HOEK, C. **Algae an introduction to phycology**. Cambridge: Cambridge University Press. p.623, 1995

HOFF, B. H.; SUNDBY, E. Preparation of pharmaceutical important fluorinated 1-arylethanol using isolated enzymes. **Bioorganic Chemistry**, v. 51, p. 31-47, 2013.

HOOK, I.I.; RYAN, S.; SHERIDAN, H. Biotransformations of aliphatic and aromatic ketones, including several monoterpenoids ketones and their derivatives by five species of marine microalgae. **Photochemistry**, v. 63, p. 31-39, 2003.

HOOK, I.I.; RYAN, S.; SHERIDAN, H. Biotransformations of aromatic aldehydes by five species of marine microalgae. **Photochemistry**, v. 51, p. 621-627, 1999.

HULATT, C. J.; THOMAS, D. N. Productivity, carbon dioxide uptake and net energy return of microalgal bubble column photobioreactors. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 10, p. 5775-5787, 2011.

HU, Z. et al. An efficient method for DNA isolation from red algae. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 16, n. 3, p. 161-166, 2004.

JANECZKO, T.; BAKOWSKI, W.; WALCZAK, E.; ROBAK, M.; DMOCHOWSKA-GLADYSZ, J.; KOSTRZEWA-SUSLOW, E. Biotransformation of acetophenone and its halogen derivatives by *Yarrowia lipolytica* strains. **Springerlink**, 2014.

KIRKWOOD, T. B. L. **Mechanisms of Ageing and Development**. vol. 123, n. 737, 2002.

KINGSTON, D. G. I. **Journal of Natural Products**. vol. 74, n. 496, 2011.

KOSHLAND, D. E.; NEET K. E. Ann. Rev. **Biochem**, n. 37, p. 359, 1968

KURBANOGLU, E. B.; ZILBEYAZ, K.; TASKIN, M.; KURBANOGLU, N. Total production of (*R*)-3,5-bistrifluoromethylphenyl ethanol by asymmetric reduction of 3,5-bis(trifluoromethyl)-acetophenone in the submerged culture of *Penicillium expansum* isolate. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.20, p. 2759-2763, 2009.

LARROCHE, C.; CREUY, C.; GROS, J. B. Fedbatch biotransformation of  $\beta$ -ionone by *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 43, p. 222, 1995.

LEE, R. E. **Phycology**. Cambridge: Cambridge University Press. 2008. 561 p.

LEHNINGER, P.; DAVID, L.N.; MICHAEL, M.C. **Principles of Biochemistry**. 4. ed. New York: Worth Publishers, 2000.123 p.

LONGO, L. L.; AMADO FILHO, G. M.; O conhecimento da fauna marinha bentônica brasileira através dos tempos. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**. Rio de Janeiro: v. 21, n. 3, jul-set. 2014, 995-1010p.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. São Carlos: São Paulo. RiMa, 2006.

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

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel productions and other applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews, Golden**, v. 14, p. 217-232, 2010.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B.; **Bioquímica básica**. Ed. Koogan, ed. 2, 1999.

MATSUDO, M. C. **Cultivo de *Spirulina platensis* por processo descontínuo alimentado repetitivo utilizando uréia como fonte de nitrogênio**. São Paulo: USP, 2006

MEAD, G. P.; CHEN, C. P. **Cane Sugar Handbook**: a manual for cane sugar manufacturers and their chemists, 10th. New York: John Wiley and Sons, p. 947, 1977.

MOUAD, A. M.; MARTINS, M. P.; DEBONSI, H. M.; OLIVEIRA, A.L.L.; FELICIO, R.; YOKOYAC, N.; FUJIC, M.; MENEZES, C.; PORTO, A.L.M. Bioreduction of acetophenone derivatives by red marine algae *Bostrychia radicans* and *B. tenella*, and marine bacteria associated. **Helvetica Chimica Acta**. v. 94, 2011.

MILETÍC, N.; VULKOVÍČ, Z. NASTASOVIĆ, A. LOOS, K. Macroporous poly(glycidylmethacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins – Versatile immobilization supports for biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 196-201, 2009.

MULLER-FEUGA, A. Microalgae for aquaculture. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, p. 352-364, 2004.

MUTANDA, T.; KARTHIKEYAN, S.; BUX, F. The utilization of postchlorinated municipal domestic Wastewater for Biomass and Lipid production by *Chlorella spp.* Under batch conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Clinton, v. 164, n. 7, p.1126-1138, 2011.

NAKAMURA, K.; YAMANAKA, R.; MATSUDA T.; HARADA T. Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts.

**Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, p. 2659-2681, 2003.

NOMA, Y.; AKEHI, E.; MIKI N.; ASAKAWA, Y. **PHYTOCHEMISTRY**, n.31, p. 515-517, 1992.

OGSTON A.G. **Nature**, n. 162, p. 963, 1948.

OLIVEIRA, G.L.; MATOVANI, M.S. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p.742-756, 2009.

ONCEL, S.S. Microalgae for a macroenergy world. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. n. 26 p. 241, 2013

OREN, A. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. **Saline Systems**, 2005.

RAPAHEL, E. **Eletrólitos sólidos a base de amidos de mandioca**: nativo, acetilado e oxidadoacetilado. 2006, p. 110 Dissertação (Mestrado em Físico-Química)-Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

RAVEN, J. A. Sensing pH? **Pant, Cell and Environment**, Oxford, v. 13, p. 721-729, 1990.

RESENDE, C. M., Vladimir Prelog e a estereoquímica das moléculas orgânicas – um centenário de nascimento. **Quim. Nova**, vol. 30, n. 4, p. 1046-1053, 2007.

PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim: v. 65, n. 6, p. 635-648, 2004.

RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Victoria: Blackwell Science Ltded, 2004

RODRIGUES, D. B.; FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; MERCADANTE, A. Z.; JACOB-LOPES, E. & ZEPKA, L. Q. Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. **Food Research International**, n. 65, p. 144, 2014.

SAID, S.; PIETRO, C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. 416p.

SILVA, F. C. et al. Cultivo de microalgas marinhas. In: POLI, C. R. et al. (Orgs). **Aquicultura: experiências brasileiras**. Florianópolis: Multitarefa, p. 93-120, 2003.

SOUZA, M. V. N. S.; VASCONCELOS, T. R. A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Química Nova**, v. 28, p.678-682, 2005.

SOUSA, J. F.; **Emprego de esponja marinha da espécie *Cliona varians* em reações de biorredução**. Dissertação (Mestrado em Química)-Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2017.

TAKEDA, S.; OGATA, Y.; KOJIMA, H.; OKADA, A.; URANISHI, Y.; NAKAMURA, K. Arabidopsis thaliana: a novel biocatalyst for asymmetric reductions. **Plant Biotechnology**. V. 28, p. 77-82, 2011.

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

TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Victoria: Blackwell Science, 2004. P. 3-19.

TIONOCO, N. A. B.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; RESENDE, C. M. O gênero *Dunaliella*: biotecnologia e aplicações. **Rev. Virtual Quim**, n. 7, p. 1421-1440, 2015.

TREDICI, M. R. Bioreactors: photo. In: Sw, D (Ed.). Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation. New York: Editor, v.1, p. 395-419, 1999.

TRINCONI, A. Marine biocatalysts: enzymatic features and applications. **Marine Drugs**. v. 9, p. 478-499, 2011.

UTSUKIHARA, T.; CHAIA, W.; KATOA, N.; NAKAMURAB, K.; HORIUCHIA, A. Reduction of (+)- and (-)-camphorquinones by cyanobacteria. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. V. 60, p. 145-150, 2009.

WALNE, P, R. *Culture of Bivalve Molluscs: 50 years experience at Conwy*. 2th Londres: **The Whitefriars Press Ltd**, p. 189, 1979.

WOHLGEMUTH, R. Asymmetric biocatalysis with microbial enzymes and cells. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, p. 283-292, 2010.

VICTOR, M. M.; RIATTO, V. B.; CARNEIRO, M. N. M.; CARVALHO, V. B. J. Efficient Synthesis of 1,3,5-Oxygenated synthons from dimethyl 3-oxoglutarate: first use of borane-dimethyl sulfide complex as a regioselective reducing agent of 3-oxygenated glutarate derivatives. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, n. 1, p. 172-175, 2011.

YADAV, J. S.; NANDA, S.; REDDY, P. T.; RAO, A. B., **J. Org. Chem**, n. 67, p. 3900-3903, 2002.

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 87-102, 2000.

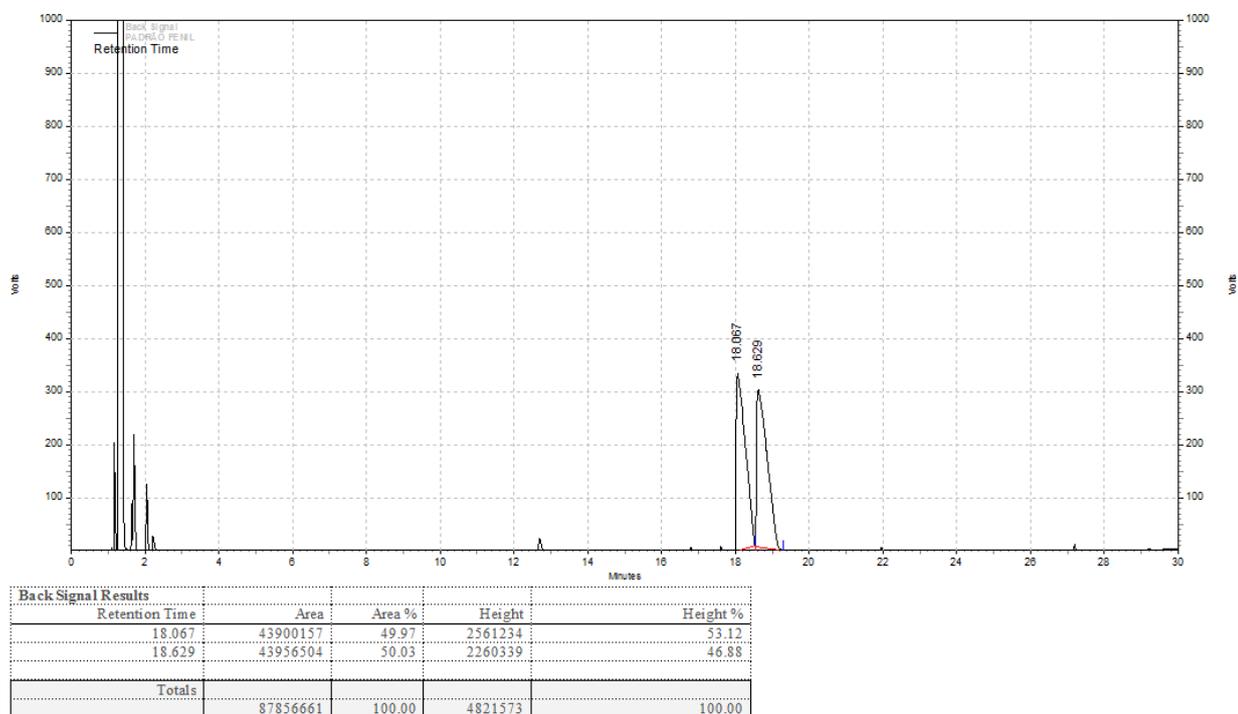
XIONG, W. et al. High-density fermentation of microalgae *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin: v. 78, n. 1, p. 29-36, 2008.

XU, H.; MIAO, X.; WU, O. High quality biodiesel production from a microalgae *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**. v. 126, n. 4, p. 499-506, 2006.

ZHENG, G.W.; XU, J. H. New opportunities for Biocatalysis: Driving the synthesis of chiral chemicals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 784-792, 2011.

ZHU, F.; QIN, C.; TAO, L.; et al. “**Clustered patterns of species origins of nature derived drugs and clues for future bioprospecting**”. Pnas, vol. 108, n. 31, p. 12943-12948, 2011.

## 8. APÊNDICE: ESPECTROS E CROMATOGRAMAS



**Figura 49.** Cromatograma referente ao álcool padrão racêmico (*R/S*) 1-fenil-etanol obtido via reação sintética realizado por cromatografia gasosa em equipamento Agilent 7820A CG System em coluna quiral Cyclo Sil-B

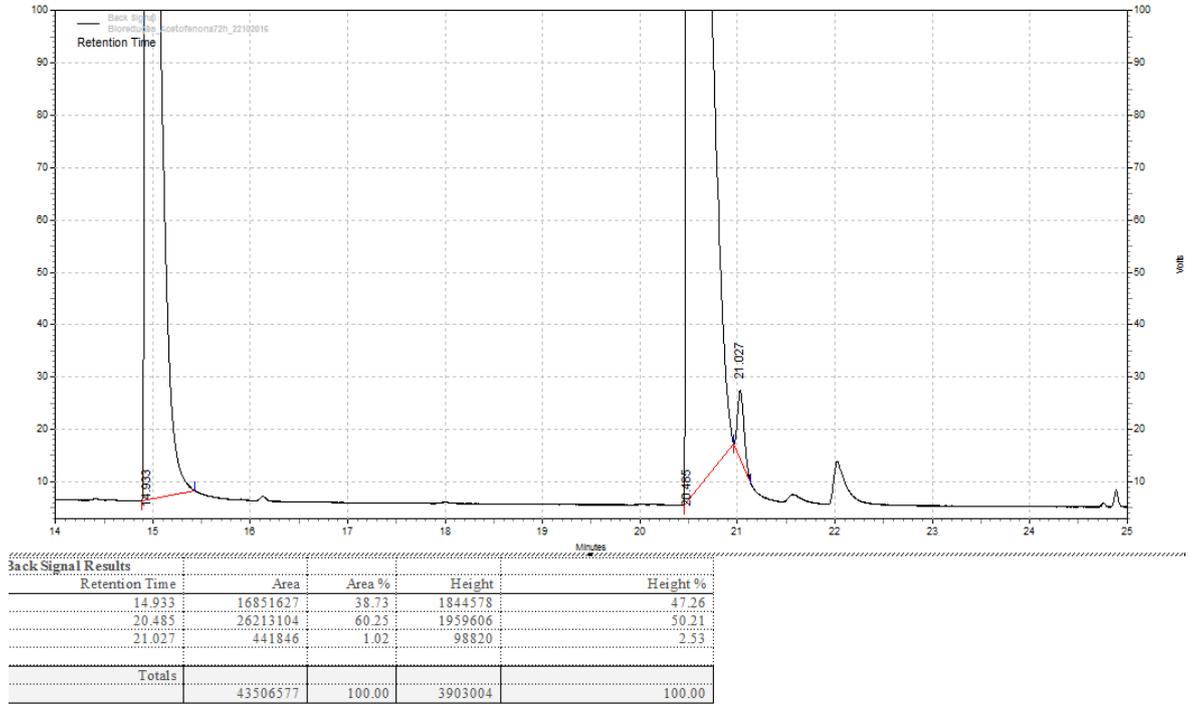


Figura 50. CG-Quiral referente a Entrada 6 (Reação de 72 horas)

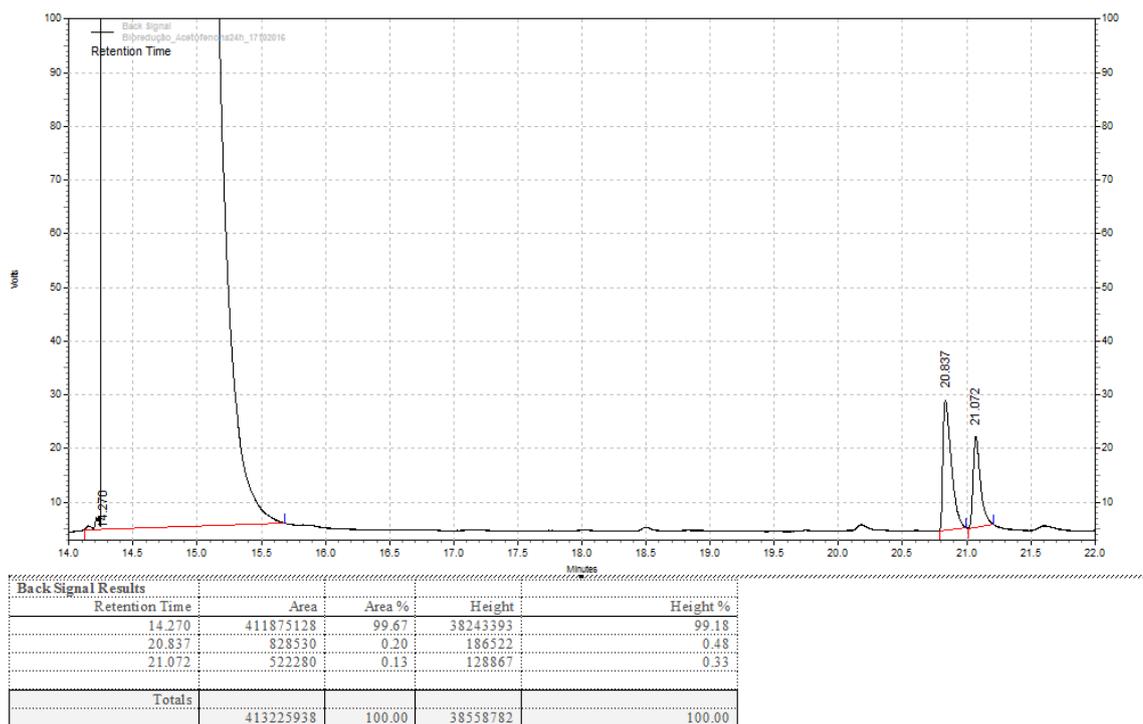


Figura 51. CG-Quiral referente a Entrada 7 (Reação de 24 horas)

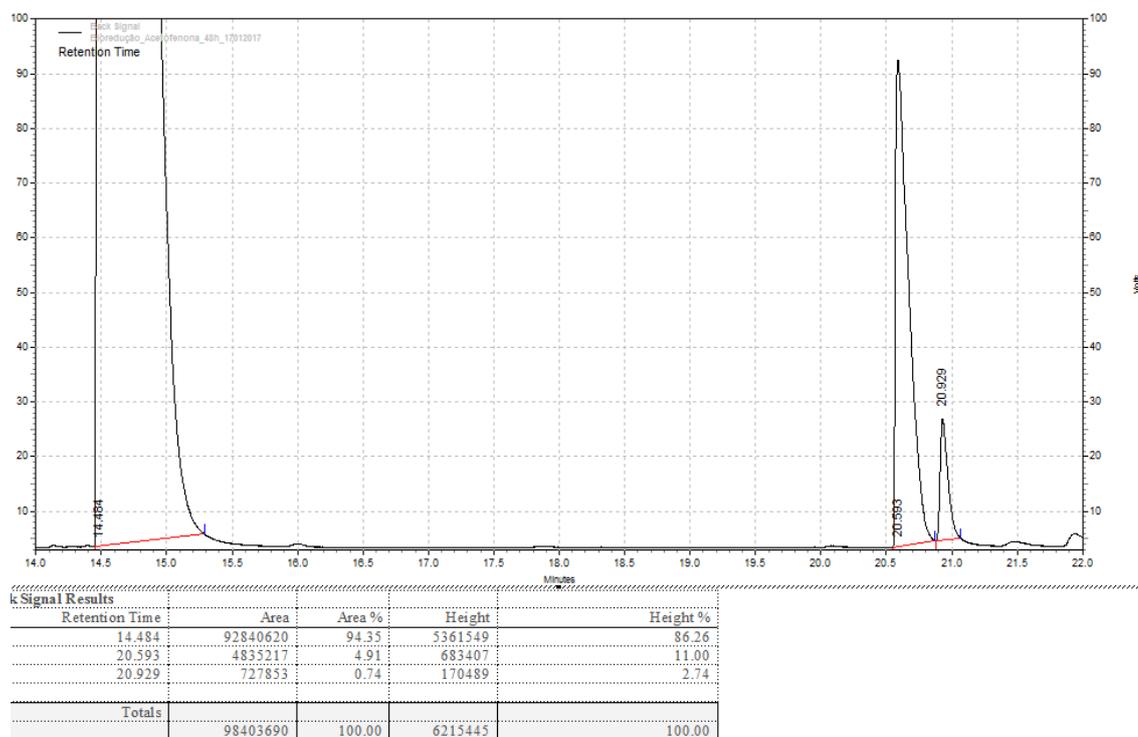


Figura 52. CG-Quiral referente a Entrada 8 (48 horas)

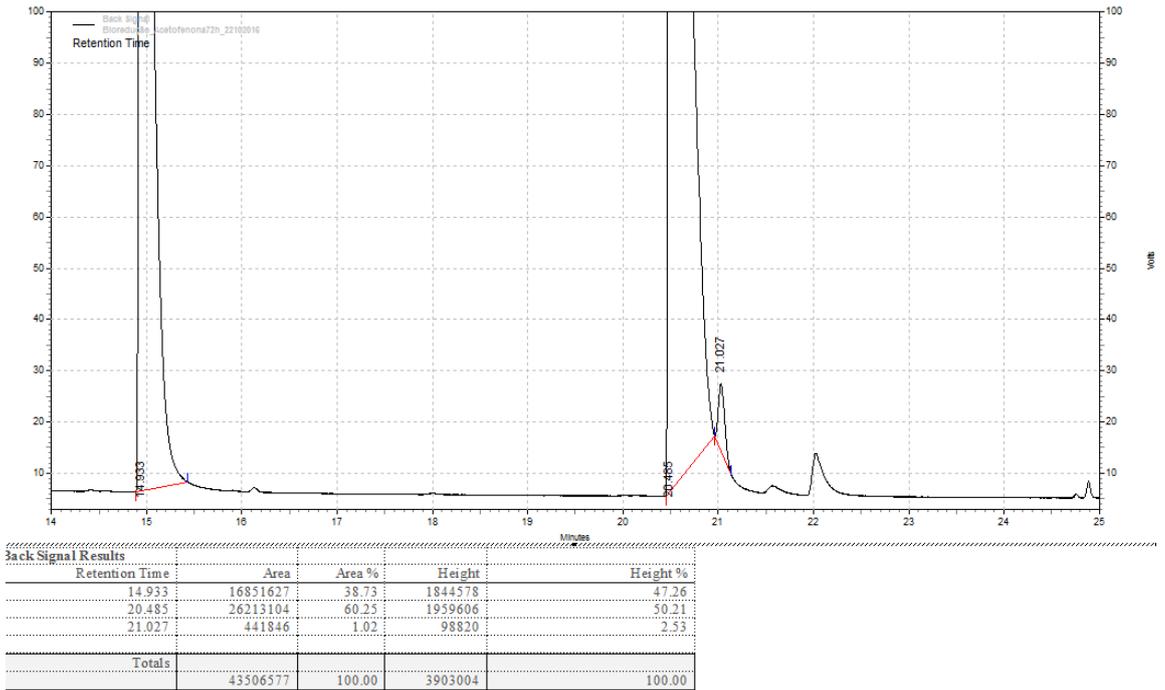


Figura 53. CG-Quiral referente a Entrada 9 (72 horas)

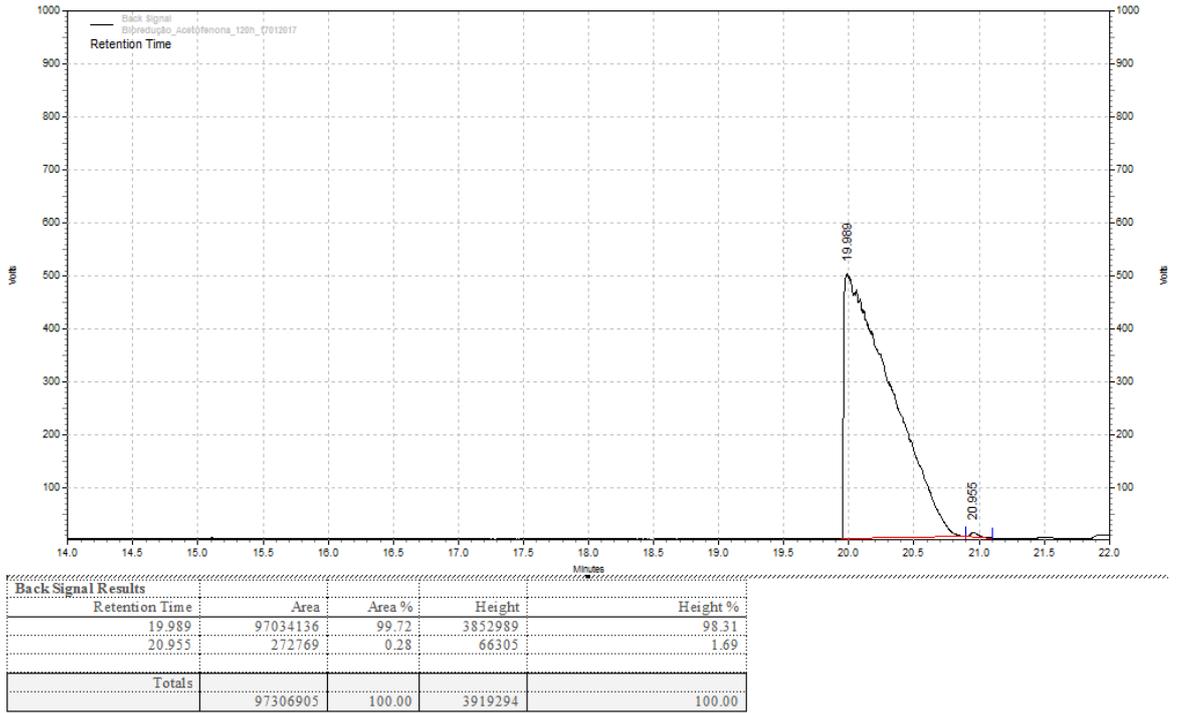
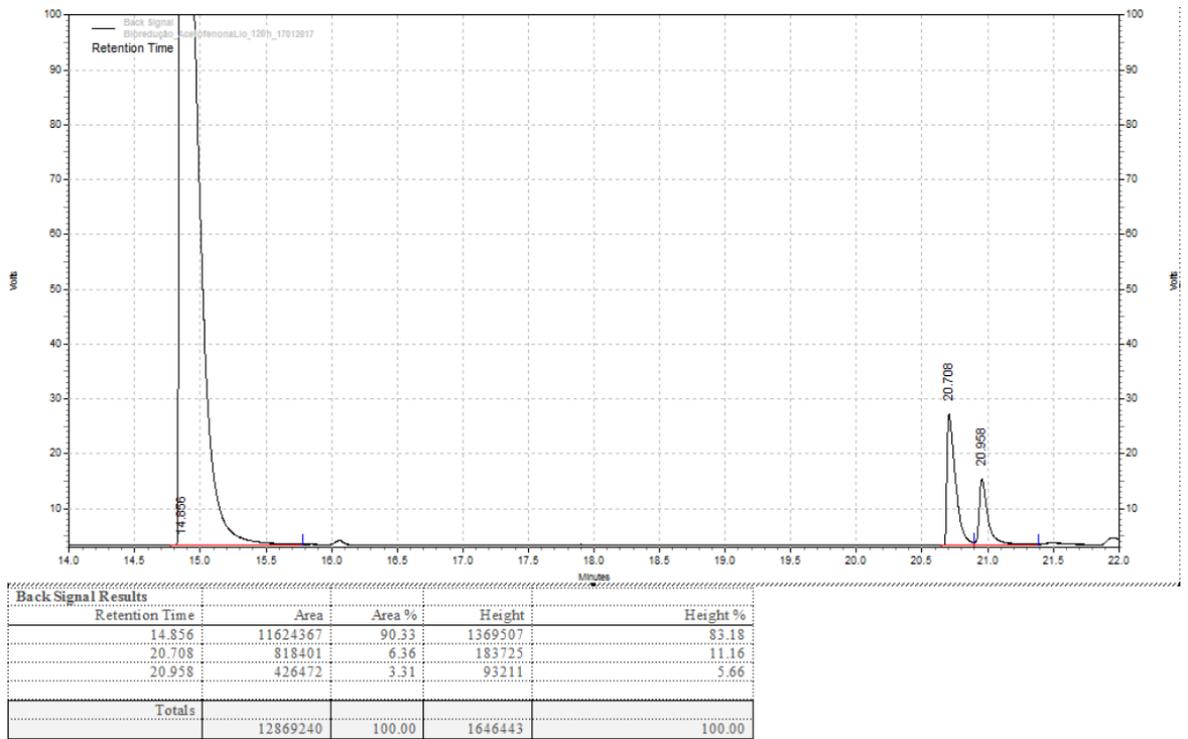


Figura 54. CG-Quiral referente a Entrada 10 (120 horas)



**Figura 55.** CG-Quiral referente a Entrada 11 (192 horas)



**Figura 56.** CG-Quiral referente a Entrada 12 (Microalgas Liofilizadas)

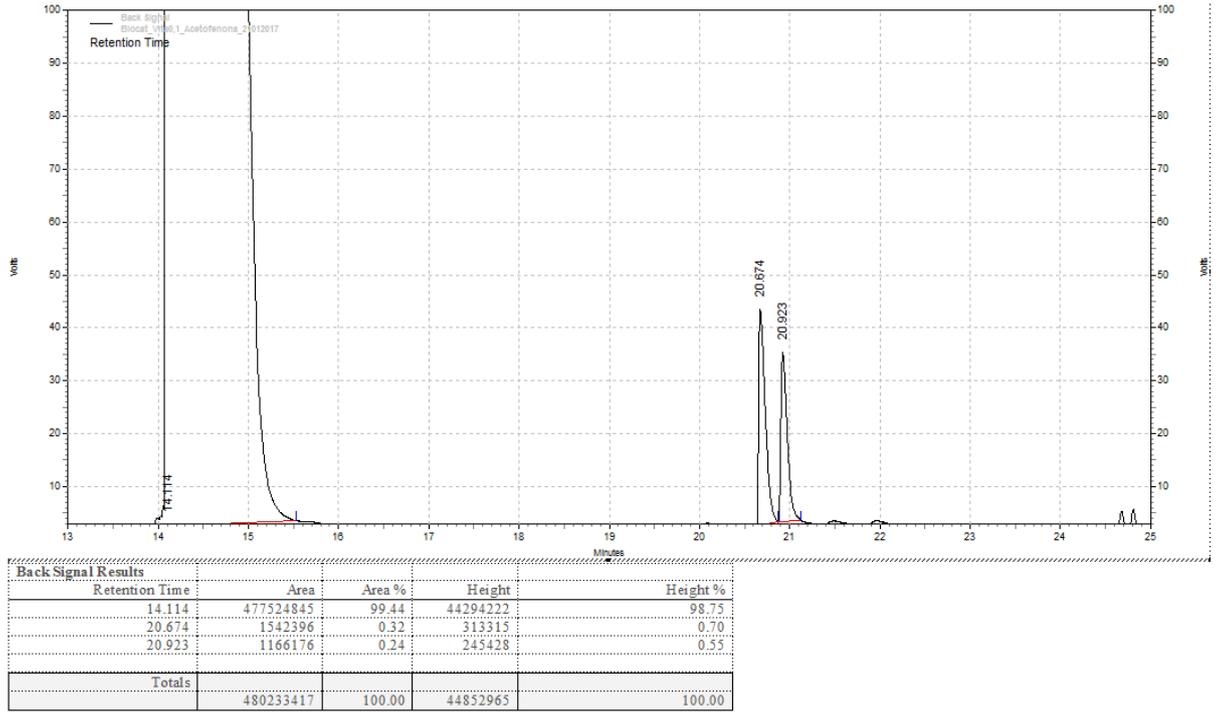


Figura 57. CG-Quiral referente a Entrada 13 (Adição de 0,1 ml de solução de vitaminas)

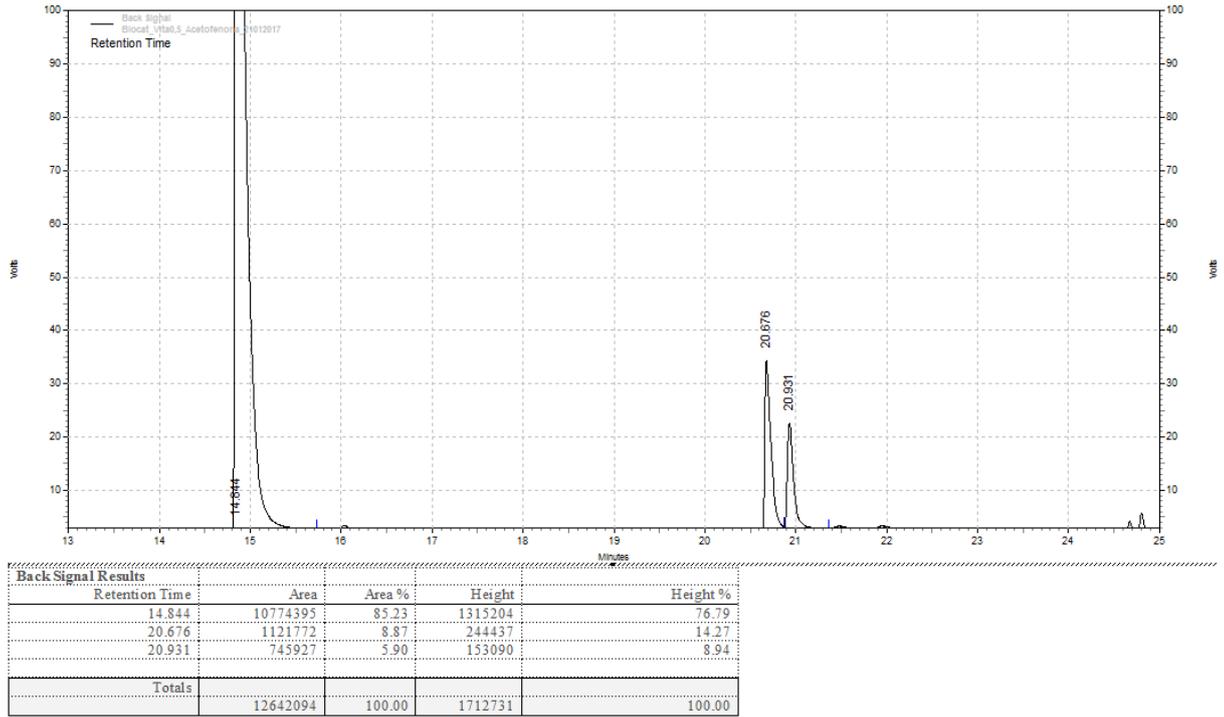


Figura 58. CG-Quiral referente a Entrada 14 (Adição de 0,5 ml de solução de vitaminas)

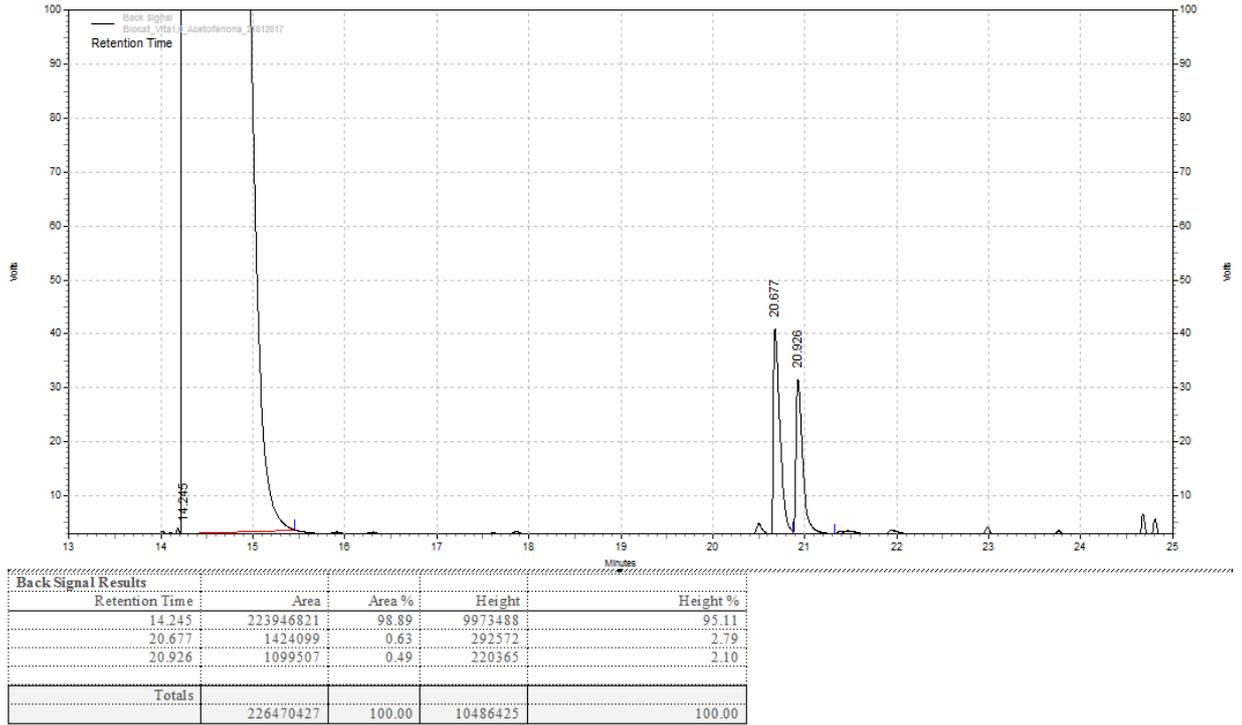


Figura 59. CG-Quiral referente a Entrada 15 (Adição de 1,0 ml de solução de vitaminas)

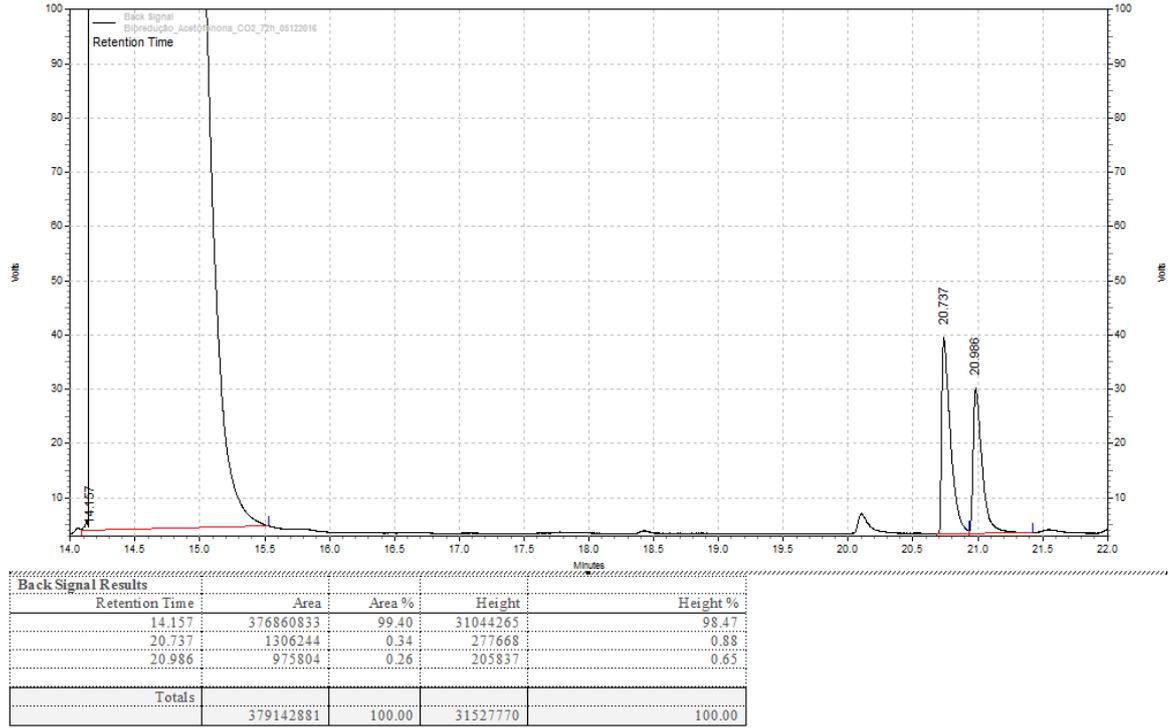
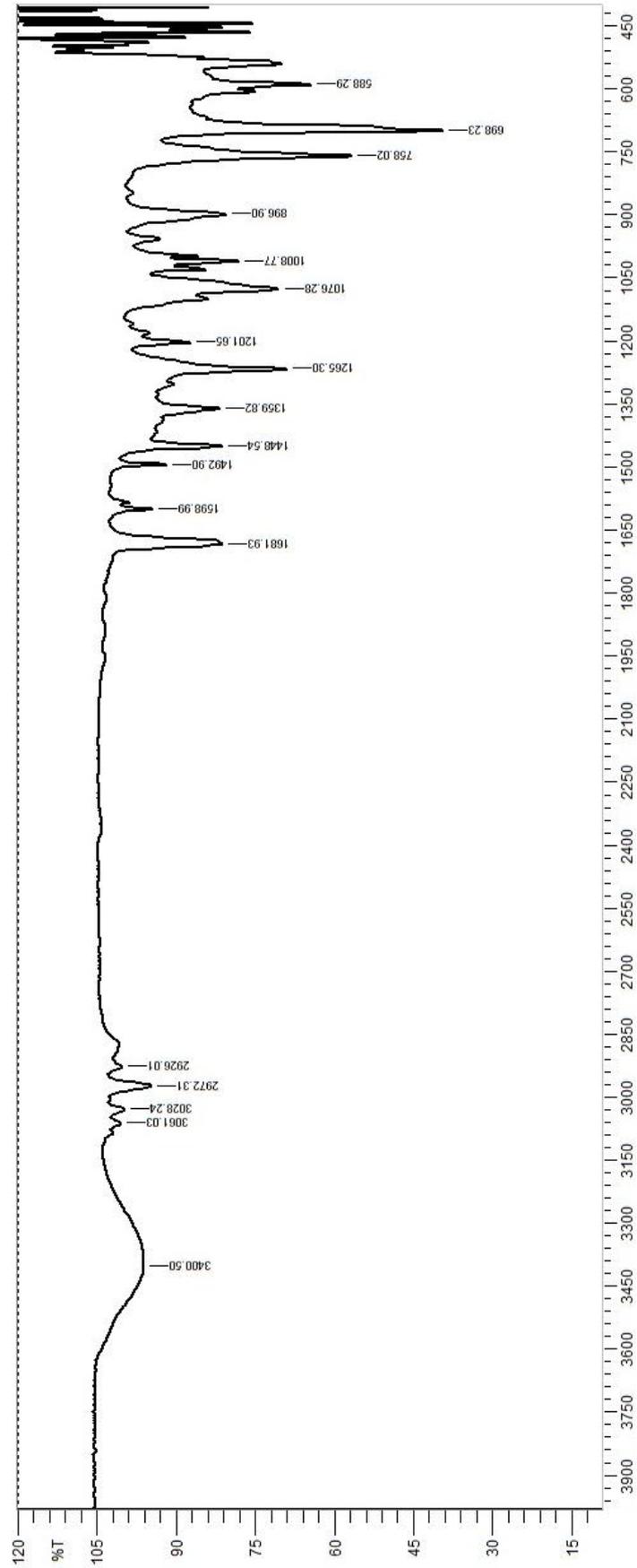


Figura 60. CG-Quiral referente a Entrada 16 (Adição CO<sub>2</sub>)



**Figura 61.** Espectro de IV referente a Entrada 6 (Reação de 72 horas)

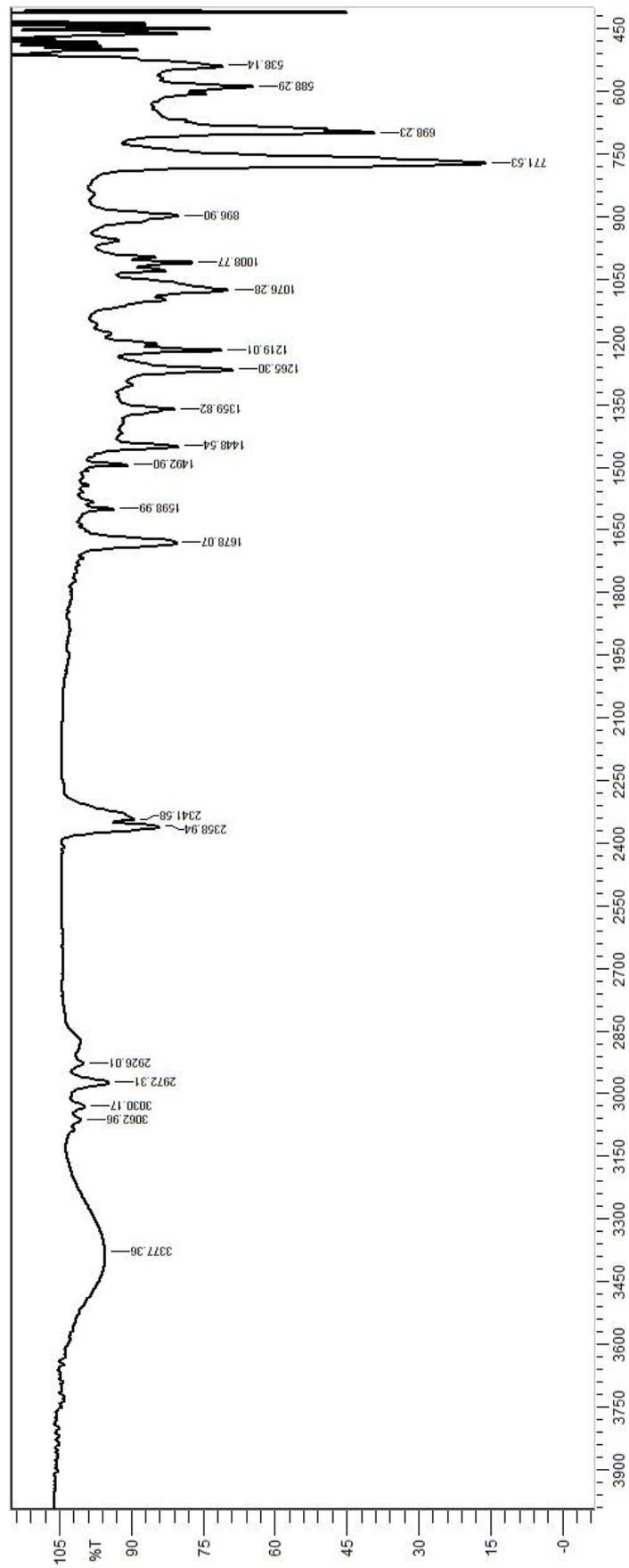


Figura 62. Espectro de IV referente a Entrada 7 (Reação de 24 horas)

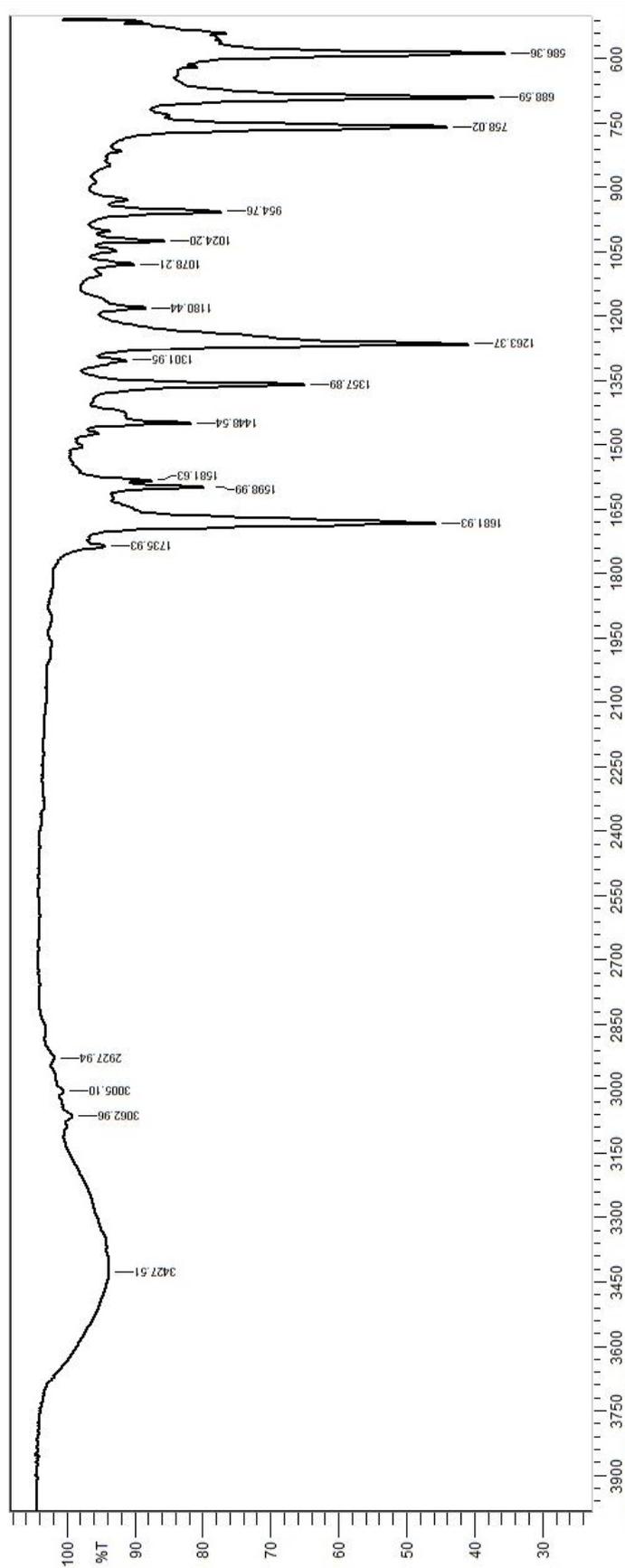
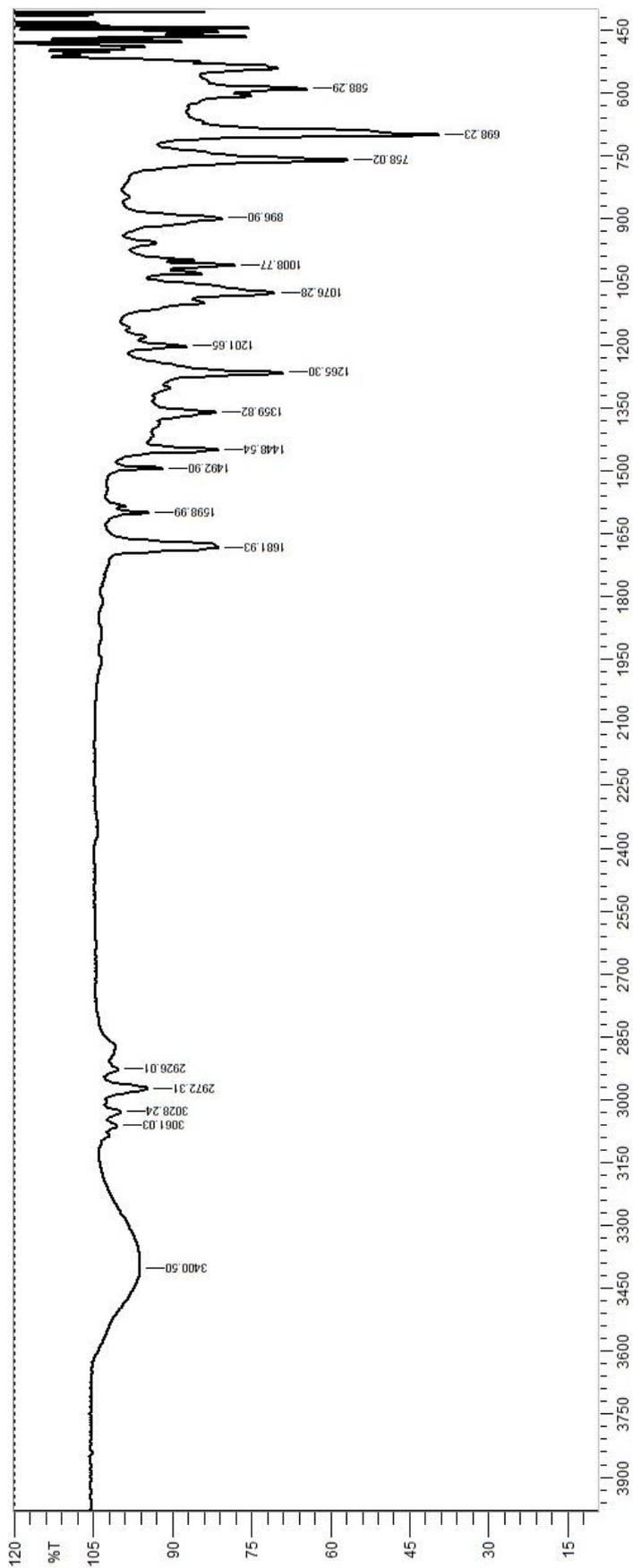


Figura 63. Espectro de IV referente a Entrada 8 (Reação de 48 horas)



**Figura 64.** Espectro de IV referente a Entrada 9 (Reação de 72 horas)

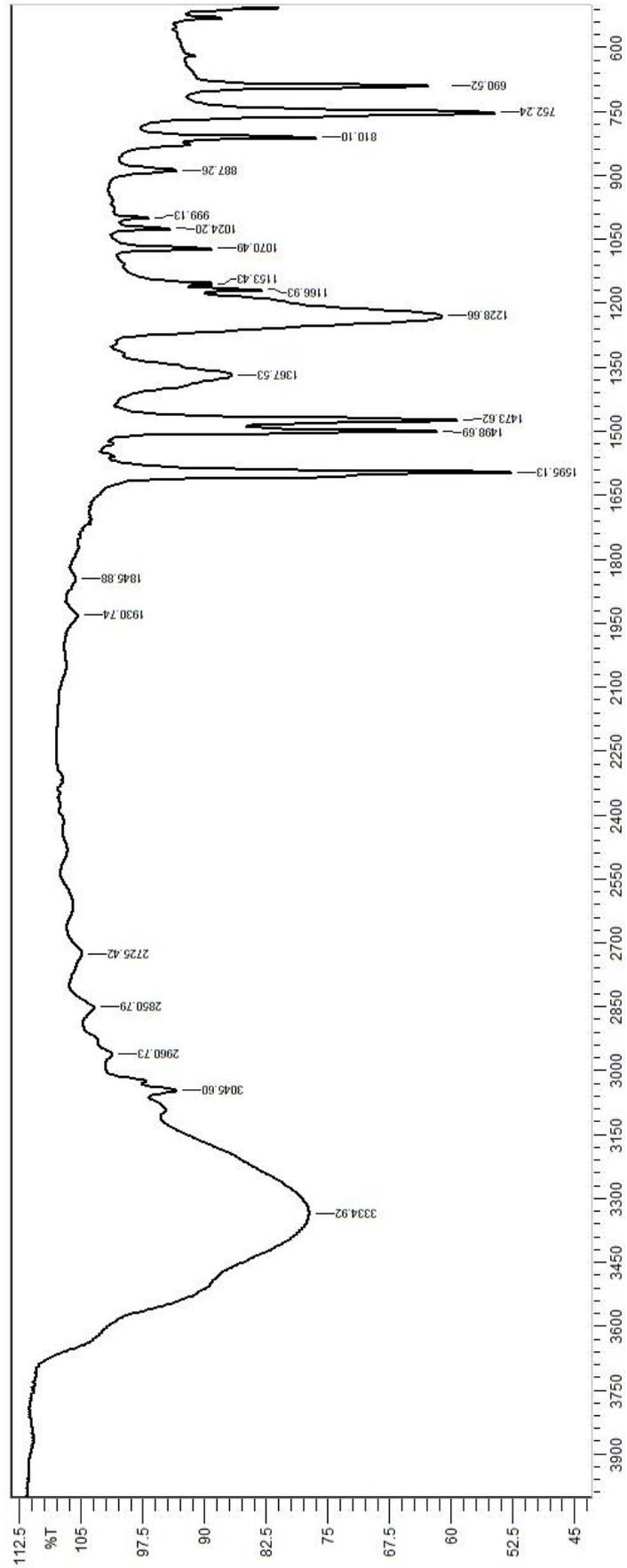


Figura 64. Espectro de IV referente a Entrada 10 (Reação de 120 horas)