



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**JOSÉ EVILAZIO UCHÔA**

**BIOTRANSFORMAÇÕES EMPREGANDO *Dioscorea trifida* L.  
(INHAMBU) E *Opuntia ficus-indica* L. (PALMA) EM REDUÇÕES  
ENANTIOSSELETIVAS DE  $\beta$ -CETOÉSTERES**

Salvador

2016

**JOSÉ EVILAZIO UCHÔA**

**BIOTRANSFORMAÇÕES EMPREGANDO *Dioscorea trifida* L.  
(INHAMBU) E *Opuntia ficus-indica* L. (PALMA) EM REDUÇÕES  
ENANTIOSELETIVAS DE  $\beta$ -CETOÉSTERES**

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  
2016

Sistema de Bibliotecas da IQ/UFBA

Uchôa, José Evlazio .

Biotransformações empregando Dioscorea Trífida L. (Inhambu) e Opuntia ficus-indica L. (Palma) em reduções enantiosseletivas de  $\beta$ -cetoésteres. / José Evlazio Uchôa . - 2016.

128 f. : il.

Inclui anexo e apêndice.

Orientadora: Profª. Drª. Valéria Belli Riatto .

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2016.

1. Síntese assimétrica. 2. Biotransformação. 3. Dioscorea Trífida L. (Inhambu). 4. Opuntia ficus-indica L. (Palma). I. Riatto, Valéria Belli. II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química. III. Título.

CDD – 547

CDU – 547: 54.057

TERMO DE APROVAÇÃO

JOSÉ EVILÁZIO UCHÔA

“BIOTRANSFORMAÇÕES EMPREGANDO *DIOSCOREA TRIFIDA L. (INHAMBU)* E *OPUNTIA FÍCUS-INDICA L. (PALMA)* EM REDUÇÕES ENANTIOSELETIVAS DE BETA-CETOÉSTERES”

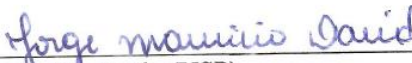
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Valeria Belli Riatto



Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)  
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Jorge Mauricio David



Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)  
Universidade Federal da Bahia

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Idália Helena Estevam



Doutorado em Química, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)  
Universidade Estadual da Bahia

Salvador, 13 de maio de 2016.

Dedico esta dissertação aos

Meus Pais,

Heroína e Egídio Uchôa (*in memoriam*)

Que sempre suportaram e alimentaram meus sonhos.

Minha esposa,

Ana Lúcia o grande amor de minha vida e fiel companheira.

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup>. Valéria Belli Riatto, minha orientadora, pelo incentivo, paciência, confiança, apoio e amizade, e sobre tudo, pela oportunidade do mestrado que me permitiu realizar o sonho de continuar estudando.

Ao Prof<sup>o</sup>. Maurício Victor, meu co-orientador de fato, pelo apoio, ensinamentos e troca de experiências que levarei comigo.

Aos meus pais, que sempre foram o incentivo da minha vida. E em especial a minha mãe, meu amor maior e minha fortaleza.

Ao grande amor da minha vida, Ana, por seu incentivo, compreensão, apoio e companheirismo em todos os momentos. Assim como minha sogra, D. Lourdes, minha segunda mãe.

A todos os colegas do Laboratório CIENAM pela convivência, incentivo e trocas de experiências: Cíntia, Havi, Kuliakita, J. Rosa, Jaqueline Reis, Sissa, Gálber, Jaqueline França, e Elivânia.

A minha amiga Vânia, que mesmo longe sempre forneceu palavras de apoio, otimismo e amizade.

À prof<sup>a</sup> Lourdes e minha chefe Conceição Góes que conciliaram meus horários de trabalho, viabilizando a realização da pesquisa.

Ao Prof<sup>o</sup>. Rafael Moreira pela ajuda nos espectros no Infravermelho.

A todas as pessoas que colaboraram direta ou indiretamente para realização e concretização deste sonho.

À Universidade Federal da Bahia, por intermédio do Instituto de Química, à FABESB, INCT e ao CAPES por terem permitido a realização do trabalho.

UCHÔA, José Evilazio. Biotransformações empregando *Dioscorea Trifida* L. (Inhambu) e *Opuntia ficus-indica* L. (Palma) em reduções enantiosseletivas de  $\beta$ -cetoésteres. ... 2016. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

## RESUMO

O presente trabalho descreve a obtenção de derivados de  $\beta$ -hidróxi ésteres quirais, obtidos pela combinação de síntese química e biotransformação. O estudo foi motivado pela perspectiva de identificar vegetais da flora baiana, como biorredutores, e de derivados de  $\beta$ -cetoésteres, como substratos, que juntos levem aos  $\beta$ -hidróxi ésteres quirais com alta enantiosseletividade e induza desenvolvimento econômico, social e científico. Foram preparados por síntese química três  $\beta$ -cetoésteres: 5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila, acetoacetato de ciclo-hexila e acetatoacetato de octila. O primeiro foi preparado, em quatro etapas, a partir do 3-oxoglutarato de dimetila, com rendimento total de 57%. Os dois últimos foram obtidos por transesterificação, a partir de acetoacetato de etila, obtendo-se o acetoacetato de ciclo-hexila em 77% de rendimento e acetoacetato de octila em 87% de rendimento. Na sequência, foram submetidos à biorredução os quatro  $\beta$ -cetoésteres citados, empregando-se *Dioscorea trifida* L. e *Opuntia ficus-indica* L. como biocatalisadores, obtendo-se melhor resultado quando se empregou *O. ficus-indica*. O acetoacetato de etila, quando se empregou *O. ficus-indica*, foi convertido completamente em 72 horas de reação, obtendo-se excesso enantiomérico de 81% do (S)-3-hidroxi-butanoato de etila. Quando se utilizou *D. trifida*, o acetoacetato de etila apresentou conversão de 88% e excesso enantiomérico de 60% do enantiômero (S)-3-hidroxi-butanoato de etila, em 48 horas de reação. Após 72 horas, obteve-se a conversão completa e excesso enantiomérico de 53% de (S)-3-hidroxi-butanoato de etila. O acetoacetato de ciclo-hexila, quando biorreduzido por *Dioscorea trifida*, foi convertido completamente em 120 horas, resultando no álcool (S)-3-hidroxi-butanoato de ciclo-hexila em 53% de excesso enantiomérico. Quando empregado *Opuntia ficus-indica*, resultou em conversão completa em 96 horas e excesso enantiomérico de 60% para o (S)-3-hidroxi-butanoato de ciclo-hexila. O acetoacetato de octila não apresentou resultado satisfatório para biorredução empregando os vegetais estudados, resultando baixas velocidade de conversão e enantiosseletividade. A biorredução do 5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila apresentou melhor resultado após 72 horas de reação, alcançando conversão de 87% e excesso enantiomérico de 41%, quando empregado *Opuntia ficus-indica*. E conversão de 83% e 32% de excesso enantiomérico quando se utilizou *Dioscorea trifida* L.. Em ambas situações, obteve-se excesso do enantiômero (R)-5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-hidroxi-pentanoato de metila.

Palavras chave:  $\beta$ -cetoésteres,  $\beta$ -hidróxi ésteres quirais, *Dioscorea trifida* L., *Opuntia ficus-indica* L., biorredução.

UCHÔA, José Evilazio. Biotransformations employing *Dioscorea trifida* L. (Inhambu) and *Opuntia ficus-indica* L. (Palma) in enantioselective reductions of  $\beta$ -keto esters. ... 2016. Dissertation (Masters) - Chemistry Institute, Federal University of Bahia, Salvador, 2016.

### ABSTRACT

*This work describes obtaining derivatives of chiral  $\beta$ -hydroxy esters obtained by the combination of chemical synthesis and biotransformation. The same was motivated by the prospect of identifying plant baiana flora, as bioreductive, and derivatives of  $\beta$ -keto esters, as substrates, leading to  $\beta$ -chiral hydroxy esters with high enantioselectivity. The goal is to encourage economic, social and regional scientific development through synergy of  $\beta$ -keto ester and vegetable. Three  $\beta$ -keto esters were prepared by chemical synthesis: methyl 5-(tert-butyldimethylsilyloxy)-3-oxopentanoate, cyclohexyl acetoacetate and octyl acetoacetate. The first was prepared in four steps, from dimethyl 3-oxoglutarate, with a total yield of 38%. And the last two were prepared by transesterification from ethyl acetoacetate, to give the cyclohexyl acetoacetate in 77% yield and octyl acetoacetate in 87% yield. Following, underwent bioreduction the above four  $\beta$ -keto esters, using *Dioscorea trifida* L. and *Opuntia ficus-indica* L. as biocatalysts, obtaining better results when *Opuntia ficus-indica* L. was employed. The ethyl acetoacetate, when *O. ficus-indica* was employed, was completely converted in 72 hours of reaction, yielding an enantiomeric excess of 81% of the ethyl (S)-3-hydroxybutanoate. When using *D. trifida*, the ethyl acetoacetate showed 88% conversion and 60% enantiomeric excess of the enantiomer ethyl (S)-3-hydroxybutanoate, in a 48 hours reaction, and after 72 hours, it was obtained a complete conversion and a enantiomeric excess of 53% ethyl (S)-3-hydroxybutanoate. The acetoacetate cyclohexyl, when reduced by *D. trifida*, was completely converted by 120 hours resulting in the alcohol (S)-3-cyclohexyl hydroxybutanoate in 53% enantiomeric excess, and when employed *Opuntia ficus-indica* the conversion resulted complete in 96 hours and 60% enantiomeric excess for the (S)-3-hydroxybutanoate cyclohexyl. The acetoacetate octyl did not present a satisfactory result for bioreduction employing the vegetables studied, with low conversion rate and enantioselectivity. The bioreduction of 5-(tert-butyldimethylsilyloxy)-3-oxopentanoate Methyl showed better results after 72 hours of reaction, reaching 87% conversion and 41% enantiomeric excess, when employed *O. ficus-indica*, and 83% conversion and 32% enantiomeric excess when used *D. trifida*. In both situations, the enantiomeric excess was obtained for the enantiomer (R)-5-(tert-butyldimethylsilyloxy)-3-hydroxypentanoate methyl.*

*Key words:  $\beta$ -keto esters,  $\beta$ -hydroxy chiral esters, *Dioscorea trifida* L., *Opuntia ficus-indica* L. bioreduction.*

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Transferência de hidreto da coenzima para o substrato .....	24
Esquema 2: Reciclagem do NADH.....	25
Esquema 3: Regra de Prelog para $\beta$ -cetoésteres .....	26
Esquema 4: Separação de enantiômeros por hidrolases .....	29
Esquema 5: Algumas reações catalisadas por lipases .....	30
Esquema 6: Otimização enzimática através da tecnologia do DNA recombinante .....	31
Esquema 7: Efeito do número de carbono da cadeia do grupo alcóxi na enantiosseletividade .....	34
Esquema 8: Tratamento de <i>G. candidum</i> para aumento de enantiosseletividade .....	35
Esquema 9: Substratos e produtos das reações, empregando-se cultura de células de <i>Marchantia polymorpha</i> , <i>Marchantia plicata</i> , <i>Riccia fluitans</i> e <i>Asterella blumeana</i> .....	37
Esquema 10: Substrato e produtos das reações com vegetais.....	38
Esquema 11: Substrato e produtos das reações com vegetais.....	39
Esquema 12: Substrato (S) e produto (P) das reações com vegetais.....	40
Esquema 13: Bio-hidrólise de acetato de 1-fenilpropanol empregando plantas secas em pó .....	47
Esquema 14: Preparação do acetoacetato de ciclo-hexila ( <b>16</b> ) e acetoacetato de octila ( <b>17</b> ) .....	79
Esquema 15: Equilíbrio cetoenólico para acetoacetato de ciclo-hexila e valores de deslocamento químico no espectro de RMN de $^1\text{H}$ .....	81
Esquema 16: Equilíbrio cetoenólico para acetoacetato de ciclo-hexila e valores de deslocamento químico no espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ .....	81
Esquema 17: Equilíbrio cetoenólico para acetoacetato de octila e valores de deslocamento químico no espectro de RMN de $^1\text{H}$ .....	84
Esquema 18: Equilíbrio cetoenólico para acetoacetato de octila e valores de deslocamento químico no espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ .....	84
Esquema 19: Estratégia sintética do 5-( <i>terc</i> -butildimetilsililóxi)-3-cetopentanoato de metila .....	86
Esquema 20: Redução química do 3-oxopentanoato de dimetila .....	86
Esquema 21: Redução química do 3-hidroxipentanoato de metila .....	88
Esquema 22: Proteção do álcool primário no $\beta,\delta$ -di-hidroxipentanoato de metila .....	91
Esquema 23: Oxidação do 5-( <i>terc</i> -butildimetilsililóxi)-3-hidroxipentanoato de metila .....	93
Esquema 24: Proporção ceto e enólico para 5-( <i>terc</i> -butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila e valores de deslocamento químico no espectro de RMN de $^1\text{H}$ .....	95
Esquema 25: Equilíbrio cetoenólico para 5-( <i>terc</i> -butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila e valores de deslocamento químico no espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ .....	96
Esquema 26: Equilíbrio cetoenólico para 5-( <i>terc</i> -butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila e valores de bandas de estiramentos ( $\nu$ ) no infravermelho .....	96
Esquema 27: Biorredução do acetoacetato de etila .....	97
Esquema 28: biorredução de acetoacetato de ciclo-hexila ( <b>16</b> ) e acetoacetato de octila ( <b>17</b> ) .....	102
Esquema 29: Biorredução do 5-( <i>terc</i> -butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila ( <b>17</b> ) .....	110



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama comparativo de coordenada de reação, entre uma reação não catalisada e outra catalisada por uma enzima.....	19
Figura 2: Representação geral da ligação enzima substrato .....	20
Figura 3: Representação esquemática da seletividade enzimática .....	21
Figura 4: Estrutura química do NADH e NADPH .....	24
Figura 5: Imagens da planta <i>Dioscorea trifida</i> L.(Inhambu).....	43
Figura 6: Imagem de <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mil (palma).....	45
Figura 7: Imagem dos vegetais utilizados nas reações de biorredução.....	58
Figura 8: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 3-hidroxipentanoato de dimetila ( <b>12</b> ) .....	60
Figura 9: Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 3-hidroxipentanoato de dimetila ( <b>12</b> ) .....	61
Figura 10: Espectro no Infravermelho de 3-hidroxipentanoato do dimetila ( <b>12</b> ) .....	62
Figura 11: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 3,5-di-hidroxipentanoato de metila ( <b>13</b> ).....	63
Figura 12: Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 3,5-di-hidroxipentanoato de metila ( <b>13</b> ).....	64
Figura 13: Espectro no infravermelho do 3,5-di-hidroxipentanoato de metila ( <b>13</b> ) .....	65
Figura 14: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 5-( <i>terc</i> -butildimetilsililóxi)-3-hidroxipentanoato de metila ( <b>14</b> ).....	66
Figura 15: Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 5-( <i>terc</i> -butildimetilsililóxi)-3-hidroxipentanoato de metila ( <b>14</b> ).....	67
Figura 16: Espectro no infravermelho do 5-( <i>terc</i> -butildimetilsililóxi)-3-hidroxipentanoato de metila ( <b>14</b> ).....	68
Figura 17: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 5-( <i>terc</i> -butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila ( <b>15</b> ).....	69
Figura 18: Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 5-( <i>terc</i> -butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila ( <b>15</b> ).....	70
Figura 19: Espectro no infravermelho do 5-( <i>terc</i> -butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila ( <b>15</b> ).....	71
Figura 20: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do acetoacetato de ciclo-hexila ( <b>16</b> )	72
Figura 21: Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do acetoacetato de ciclo-hexila ( <b>16</b> )	73
Figura 22: Espectro no infravermelho do acetoacetato de ciclo-hexila ( <b>16</b> ) .....	74
Figura 23: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do acetoacetato de octila ( <b>17</b> ).....	75
Figura 24: Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do acetoacetato de octila ( <b>17</b> ).....	76
Figura 25: Espectro no infravermelho do acetoacetato de octila ( <b>17</b> ).....	77
Figura 26: Atribuição do multiplete do hidrogênio carbinólico no espectro de RMN de <sup>1</sup> H do acetoacetato de ciclo-hexila. ....	80
Figura 27: Sinal de impureza no RMN de <sup>1</sup> H na amostra do acetoacetato de ciclo-hexila ....	80
Figura 28: Representação dos modos de estiramento das ligações C=O e C-O do espectro no infravermelho do acetoacetato de ciclo-hexila .....	82
Figura 29: Atribuições do tripleto e quinteto dos hidrogênios no espectro de RMN de <sup>1</sup> H do acetoacetato de octila.....	83

Figura 30: Representação dos modos de estiramento das ligações C=O e C-O do espectro no IV do acetoacetato de octila .....	85
Figura 31: Atribuições dos sinais do espectro de RMN de <sup>1</sup> H do 3-hidroxi-pentanoato de dimetila .....	87
Figura 32: Atribuições sinais do espectro de RMN de <sup>13</sup> C do 3-hidroxi-dicarboxilato de dimetila .....	88
Figura 33: Atribuições dos sinais do espectro de RMN de <sup>1</sup> H do 3-hidroxi-pentanoato de dimetila .....	89
Figura 34: Atribuições dos sinais do espectro de RMN de <sup>13</sup> C do 3-hidroxi-pentanoato de dimetila .....	91
Figura 35: Atribuições dos singletos do espectro de RMN de <sup>1</sup> H do 5-( <i>terc</i> -butildimetilsililóxi)-3-hidroxi-pentanoato de metila .....	92
Figura 36: Atribuições dos sinais do espectro de RMN de <sup>13</sup> C do 5-( <i>terc</i> -butildimetilsililóxi)-3-hidroxi-pentanoato de metila .....	93
Figura 37: Atribuições dos sinais no espectro de RMN de <sup>1</sup> H do 5-( <i>terc</i> -butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila .....	94
Figura 38: Atribuições dos sinais do espectro de RMN de <sup>13</sup> C do 5-( <i>terc</i> -butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila .....	95
Figura 39: Cromatogramas referentes à redução de acetoacetato de etila por <i>Dioscorea trifida</i> L. (Inhambu) .....	99
Figura 40: Cromatogramas referentes à redução de acetoacetato de etila por <i>Opuntia ficus-indica</i> L. (Palma) .....	100
Figura 41: Cromatogramas referentes à redução do acetoacetato de ciclo-hexila por <i>Dioscorea trifida</i> L. (Inhambu) .....	103
Figura 42: Cromatogramas referentes à biorredução do acetoacetato de ciclo-hexila por <i>Dioscorea trifida</i> L. (Inhambu) e <i>Opuntia ficus-indica</i> L. (Palma) .....	104
Figura 43: Cromatogramas referentes à redução do acetoacetato de octila por <i>Dioscorea trifida</i> L. (Inhambu) .....	105
Figura 44: Cromatogramas referentes à biorredução do acetoacetato de octila por <i>Dioscorea trifida</i> L. (Inhambu) .....	106
Figura 45: Cromatogramas referentes à biorredução do acetoacetato de octila por <i>Opuntia ficus-indica</i> L. (Palma) .....	106
Figura 46: Cromatogramas referentes aos produtos transesterificados a partir dos produtos de biorredução do acetoacetato de ciclo-hexila por <i>Dioscorea trifida</i> L. (Inhambu) e <i>Opuntia ficus-indica</i> L. (Palma) .....	107
Figura 47: Cromatogramas referentes aos produtos transesterificados a partir dos produtos de biorredução do acetoacetato de octila por <i>Dioscorea trifida</i> L. (Inhambu) .....	108
Figura 48: Cromatogramas referentes aos produtos de biorredução do 5-( <i>terc</i> -butildimetilsililóxi)-3-hidroxi-pentanoato de metila por <i>Dioscorea trifida</i> L. (Inhambu) .....	111
Figura 49: Cromatogramas referentes aos produtos de biorredução do 5-( <i>terc</i> -butildimetilsililóxi)-3-hidroxi-pentanoato de metila por <i>Opuntia ficus-indica</i> L. (Palma) .....	112

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classes de enzimas conforme as reações que catalisam .....	22
Tabela 2: Coenzimas utilizadas em biocatálises.....	23
Tabela 3: Classes de enzimas e suas aplicações em processos.....	28
Tabela 4: Tratamento de <i>G. candidum</i> para aumento de enantioseletividade .....	35
Tabela 5: Redução de cetonas e $\beta$ -cetoésteres utilizando cultura de células de <i>Marchantia polymorpha</i> , <i>Marchantia plicata</i> , <i>Riccia fluitans</i> e <i>Asterella blumeana</i> .....	38
Tabela 6: Biotransformação de acetofenona com vegetais.....	39
Tabela 7: Biotransformação de 4-cloroacetofenona com vegetais .....	39
Tabela 8: Preparação de $\beta$ -hidróxi ésteres por biotransformação catalisada por vegetais....	41
Tabela 9: Classificação botânica do <i>Dioscorea trifida</i> L. (Inhambu) .....	42
Tabela 10: Classificação científica da <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mil. (Palma) .....	44
Tabela 11: Usos e aplicações potenciais da <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mil (Palma) .....	46
Tabela 12: Bio-hidrólise de acetato de 1-fenilpropanol utilizando plantas secas em pó por liofilização .....	47
Tabela 13: Hidrólise de acetato de 1-fenilpropanol utilizando pó de plantas secas, por acetona, como bicatalisador .....	48
Tabela 14: Taxa de conversão (%C) e %e.e. em diferentes tempos (t) de reação do acetoacetato de etila .....	98
Tabela 15: Percentual de conversão (%C) e %e.e. em diferentes tempos (t) de reação obtidos a partir do acetoacetato de ciclo-hexila e do acetoacetato de octila.....	102
Tabela 16: Percentual de conversão (%C) e %e.e. em diferentes tempos (t) de reação do 5-( <i>terc</i> -butildimetilsiloxi)-3-oxopentanoato de metila.....	110

## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	12
1. INTRODUÇÃO .....	16
2. OBJETIVOS .....	18
2.1 GERAL .....	18
2.2 ESPECÍFICOS .....	18
3. REVISÃO DA LITERATURA .....	19
4.1 CARACTERÍSTICAS DA CATÁLISE ENZIMÁTICA.....	19
3.2 A BIOCATÁSE COM ENZIMAS ISOLADAS .....	26
3.3 BIOCATÁLISE COM CÉLULAS INTEIRAS DE MICRORGANISMOS .....	32
3.4 BIOCATÁLISE COM CÉLULAS INTEIRAS DE VEGETAIS .....	36
3.4.1 Inhambu ( <i>Dioscorea trifida</i> L.).....	42
3.4.2 Palma forrageira ( <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mil) .....	44
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	49
4.1 MATERIAIS UTILIZADOS.....	49
4.2 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS .....	49
4.2.1 Cromatografia de camada delgada (CCD) .....	49
4.2.2 Cromatografia em coluna por adsorção.....	50
4.2.3 Cromatografia a gás com detector por ionização em chama e coluna quirál .....	50
4.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (IV) .....	50
4.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	51
4.7 SÍNTESE do 5-( <i>terc</i> -BUTILDIMETILSILILÓXI)-3-OXOPENTANOATO DE METILA.....	52
4.7.1 3-hidroxipentanoato de dimetila ( <b>12</b> ).....	53
4.7.2 3,5-di-hidroxipentanoato de metila ( <b>13</b> ).....	53
4.7.3 5-( <i>terc</i> -butildimetilsililóxi)-3-hidroxipentanoato de metila ( <b>14</b> ).....	54
4.7.4 5-( <i>terc</i> -butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila ( <b>15</b> ) .....	54
4.7.5 Acetoacetato de ciclo-hexila ( <b>16</b> ).....	55
4.7.6 Acetoacetato de octila ( <b>17</b> ).....	56
4.7.7 Redução química (produção de racemato) .....	56
4.7.8 Biorredução empregando <i>D. trifida</i> (inhmabu) e <i>O. ficus-indica</i> (palma).....	57
4.7.9 Transesterificação dos produtos de biorredução .....	58
4.7.10 Espectros de RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C e espectros no IV dos substratos preparados.....	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	78
5.1 PREPARAÇÃO DE β-CETOÉSTERES.....	78

5.1.1	Preparação do acetoacetato de ciclo-hexila (16) e acetoacetato de octila (17).....	78
5.2	BIORREDUÇÃO DE $\beta$ -CETOÉSTERES COM <i>Dioscorea trifida</i> L. (INHAMBU) E <i>Opuntia ficus-indica</i> L. (PALMA) .....	97
5.2.1	Biorredução de acetoacetato de etila (4).....	97
5.2.2	Biorredução do acetoacetato de ciclo-hexila e acetoacetato de octila .....	101
5.2.3	Biorredução do 5-( <i>terc</i> -butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila (15) .....	109
6.	CONCLUSÕES.....	114
7.	PERSPECTIVAS .....	116
8.	REFERÊNCIAS.....	117
9.	GLOSSÁRIO .....	125
10.	APÊNDICE .....	126
11.	ANEXO .....	128

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Acetil-CoA	Acetil Coenzima A
AcOEt:	Acetato de etila
$[\alpha]_D$ :	Rotação específica
AlLiH <sub>4</sub> :	Hidreto de Alumínio e Lítio
ATP:	Adenosina Trifosfato
BH <sub>3</sub> Me <sub>2</sub> S:	Borana dimetil sulfeto
C:	Conversão
CaH <sub>2</sub> :	Hidreto de cálcio
CCD:	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl <sub>3</sub> :	Clorofórmio deuterado
CG:	Cromatografia a Gás
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :	Diclorometano
CH <sub>3</sub> OH:	Metanol
$\delta$ :	Deslocamento químico
DCM:	Diclorometano
DMAP:	Para-dimetilamino piridina
e.e.:	Excesso enantiomérico
HPLC:	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IBX:	Ácido iodoxibenzoico
IV:	Infravermelho
<i>J</i> :	Constante de Acoplamento
MgSO <sub>4</sub> :	Sulfato de magnésio
N(Et) <sub>3</sub> :	Trimetilamina
NaBH <sub>4</sub> :	Boro-hidreto de sódio
NaCl:	Cloreto de sódio
NADH:	Dinucleotídeo de Nicotinamida Adenina
NADPH:	Dinucleotídeo de Nicotinamida Adenina Fosfato
[PM]:	Peneira molecular
ppm:	Parte por milhão
RMN <sup>13</sup> C:	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN <sup>1</sup> H:	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
SAM:	S-adenosil metionina
TBS	<i>tert</i> -butildimetil silano
TBSCl:	Cloreto de <i>tert</i> -butildimetil silano
THF:	Tetra-hidrofurano
TMS	Trimetil silano
t <sub>R</sub> :	Tempo de retenção

## 1. INTRODUÇÃO

A biocatálise é um tipo de biotransformação que consiste no uso de catalisadores naturais, as enzimas, que realiza transformações químicas em compostos orgânicos. As enzimas são macromoléculas complexas unidas por ligações peptídicas, que estão presentes nas células de todos os organismos vivos (OMORI et al., 2012).

Inconscientemente, o homem utiliza a biocatálise há milhares de anos, pois à fermentação de cereais para obtenção de vinho pelos sumérios e babilônicos já ocorria há cerca de 5.000 a.C. É desta época também os relatos sobre biotransformações para obtenção de vinho e ácido acético por nossos ancestrais na Babilônia (Mesopotâmia), Egito antigo e México (civilização asteca). A fermentação para fabricação do pão era utilizada no Egito antigo há 2.000 a. C. Além disso, a hidrólise da caseína presente no leite para produção de queijo já ocorria há 800 a.C. (LERESCHE e MEYER, 2006).

A partir do século XIX a biocatálise passou ser utilizada com base científica e suas aplicações não pararam de crescer. Em 1833, os franceses Payen e Persoz isolaram a diástase, um complexo enzimático do malte. Poucos anos depois o químico sueco Jöns Jacob Berlelius realizou a hidrólises de amido empregando a diástase, e ainda hoje é o método utilizado para este processo. A partir de 1858, com trabalhos do químico e biologista francês, Louis Pauster e em 1897, dos químicos Eduard Buchner e Hans Buchner ficou evidenciado que as enzimas presentes nas células da levedura eram responsáveis pelo processo de fermentação (GHANEM, 2007).

Atualmente a biocatálise apresenta importante papel na produção de compostos agroquímicos, farmacêuticos e nutricionais. Isso porque a biocatálise tem a vantagem de ser geralmente mais seletiva e proporcionar uma tecnologia compatível com o meio ambiente, inserindo-se nos princípios de química verde. A seletividade das reações de biocatálises está relacionada com a natureza quiral das enzimas, que se tornam imprescindíveis quando se necessita de compostos enantiomericamente puros. No entanto, a biocatálise apresenta algumas desvantagens devido à instabilidade das enzimas à temperatura e pH, longo tempo



reacional, a não disponibilidade comercial e necessidade de cofator. Porém, nos últimos tempos, o desenvolvimento de novos biocatalisadores através da tecnologia do DNA recombinante, já produziu vasta quantidade de enzimas recombinantes e grandes quantidades de dados de material genético com diferentes características catalíticas, que podem ser rapidamente geradas, dando origem a novas enzimas que tem superado as limitações (CHEN et al, 2012).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Obter ésteres  $\beta$ -hidroxilados quirais a partir da biorredução enantiosseletiva de acetoacetato de etila, acetoacetato de ciclo-hexila, acetoacetato de octila e 5-(*terc*-butildimetilsilóxi)-3-oxopentanoato de metila, empregando-se *Dioscorea trifida* L. (Inhambu) e *Opuntia ficus-indica* L.(Palma) como biocatalisadores.

### 2.2 ESPECÍFICOS

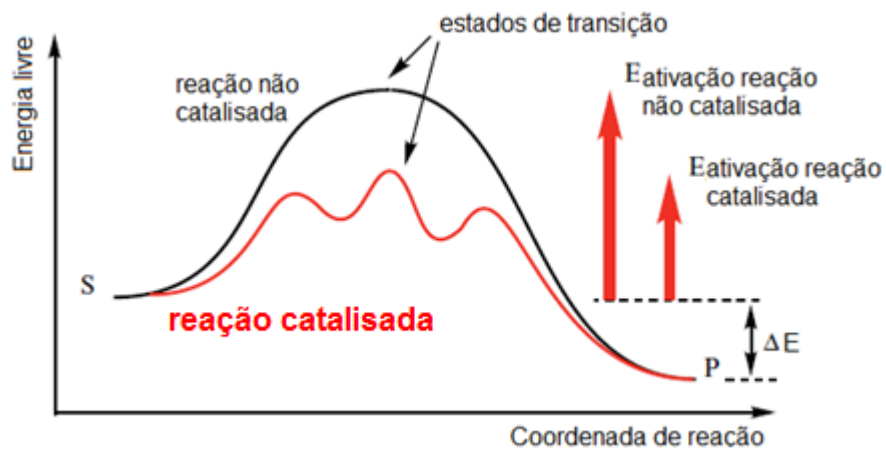
- ✓ Preparar  $\beta$ -hidróxi ésteres e verificar a influência do tamanho relativo entre os grupos alcóxi e alquilas ligados à carbonila, na enantiosseletividade;
- ✓ Avaliar o emprego de *Dioscorea trifida* L. (Inhambu) e *Opuntia ficus-indica* L. (Palma) na biotransformação de  $\beta$ -cetoésteres;
- ✓ Determinar o rendimento da conversão de  $\beta$ -cetoésteres em ésteres  $\beta$ -hidroxilados quirais por CG;
- ✓ Determinar os excessos enantioméricos dos produtos obtidos por análises de CG quiral e polarímetro (rotação óptica específica);
- ✓ Identificar a configuração absoluta dos enantiômeros em excesso.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 4.1 CARACTERÍSTICAS DA CATÁLISE ENZIMÁTICA

Os catalisadores atuam reduzindo a energia de ativação de uma reação, por estabilizarem o seu estado de transição. Assim, pode-se afirmar que as enzimas, da mesma forma, têm a capacidade catalisadora, porque aceleram as reações por estabilizarem os estados de transição, diminuindo as energias (E) de ativação da reação nas diversas etapas de uma reação química catalisada (BETTELHEIM, BROWN, CAMPBELL, FERREL, 2012) (Figura 1).

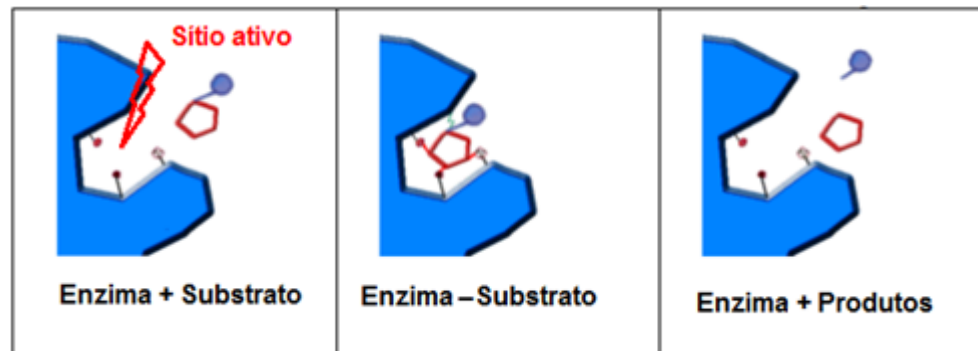
Figura 1: Diagrama comparativo de coordenada de reação, entre uma reação não catalisada e outra catalisada por uma enzima



Fonte: adaptado de Bettelheim et al (2012, p. 574)

A atuação das enzimas, nas mais diversas reações, envolve a interação do substrato com o seu sítio ativo, através de interações físicoquímica, formando um complexo enzima-substrato. Com progresso da reação, as interações são desfeitas, os produtos são formados e a enzima retorna ao seu estado original (Figura 2).

Figura 2: Representação geral da ligação enzima substrato



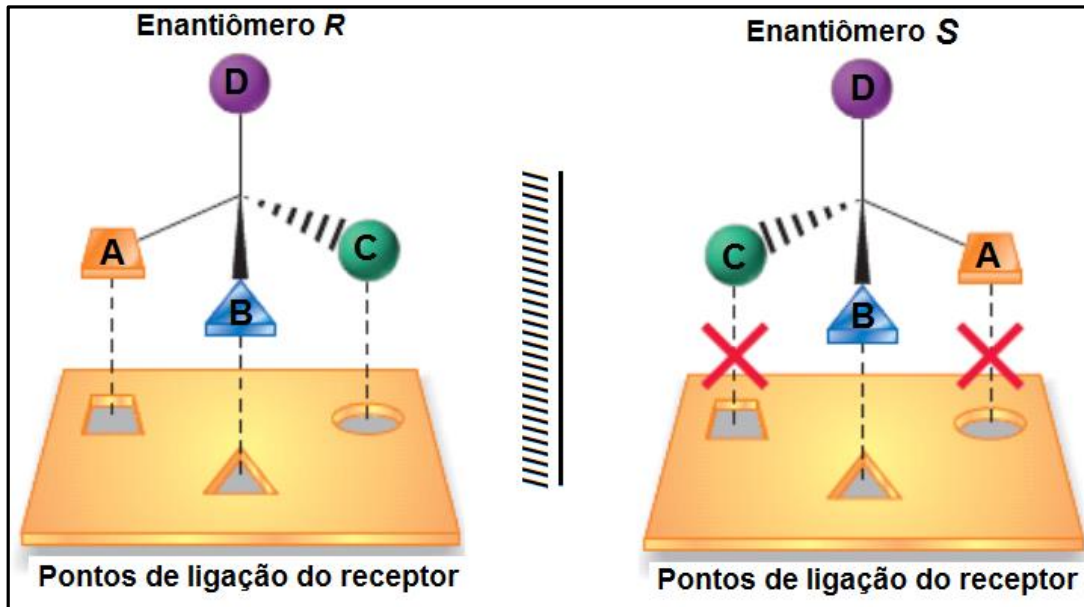
Fonte: adaptado de Kieling e Júnior (2002, p. 8)

Alguns modelos são comumente utilizados para explicar a atuação das enzimas nos sistemas que são empregadas como biocatalisadores. O modelo chave-fechadura proposto por Fischer em 1894, explica que a especificidade da enzima com o substrato é rígida, comparado ao encaixe de uma chave na fechadura. Enquanto o modelo do encaixe induzido proposto por Koshland em 1960, ilustra a especificidade das enzimas devido a um ajuste induzido proporcionado pela aproximação do substrato. O primeiro modelo pode ser melhor aplicado a uma enzima que apresenta uma especificidade absoluta, catalisando a reação de um, e de somente um, substrato para um produto particular. Enquanto, o segundo modelo, aplica-se melhor às enzimas que possuem uma especificidade relativa, catalisando reações de substratos estruturalmente parecidos e originando produtos respectivamente relacionados a cada substrato de partida (BETTELHEIM, BROWN, CAMPBELL, FERREL, 2012).

Finalmente, existem enzimas estereoespecíficas, com especificidades para as quais a atividade ótica tem importância. Neste caso, o sítio ativo da ligação enzima-substrato deve ser assimétrico (Figura 3). Essa situação explica por que a enzima pode levar a produção de apenas um produto, que é um entre dois isômeros possíveis, e não uma mistura de isômeros ópticos.

A Figura 3 ilustra como a disposição espacial de um determinado substrato, no sítio ativo da enzima, determina uma síntese enantiosseletiva, proporcionando um determinado enantiômero, entre dois possíveis (BETTELHEIM, BROWN, CAMPBELL, FERREL, 2012). De acordo com este modelo, para que um dos enantiômeros se forme com alta anantioseletividade deverá existir uma complementaridade entre o sítio ativo da enzima e a estrutura do substrato (CORREIA e BARALDI, 2004).

Figura 3: Representação esquemática da seletividade enzimática



Fonte: adaptado de Correia e Baraldi, 2004

Apesar da especificidade das enzimas, a ação das mesmas pode ser inibida de modo reversível ou irreversível. A inibição irreversível normalmente envolve a formação ou a quebra de ligações covalentes na enzima. Em uma inibição reversível, algum substrato pode ligar-se à enzima e ser subsequentemente liberado. As inibições reversíveis podem ser divididas em dois grupos: os inibidores competitivos, os quais se ligam no sítio ativo e previnem a ligação do substrato; e os inibidores não competitivos, os quais se ligam à enzima em um ponto diferente do sítio ativo, mudando a estrutura da enzima (BETTELHEIM, BROWN, CAMPBELL, FERREL, 2012).

As enzimas podem ser classificadas, conforme as reações que catalisam, em seis principais classes (FABER, 1997): oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (Tabela 1)

Tabela 1: Classes de enzimas conforme as reações que catalisam

<b>Classes de Enzimas</b>	<b>Reações que catalisam</b>
Oxirredutases	Oxidação e Redução
Transferases	Transferência de grupos aldeídos, cetonas, metil e fosforil
Hidrolases	Formação de aminas, epóxidos, nitrilas, lactonas e ésteres
Liases	Adição e eliminação. Adição de halogênios a duplas ligações C=C, C=N, C=O
Isomerases	Clivagem e formação de ligações para produzir isômeros
Ligases	Formação ou clivagem de ligações C-C, C-S, C-O, C-N.

Íons metálicos como o  $Mn^{2+}$ , o  $Mg^{2+}$  e o  $Zn^{2+}$  participam da catálise enzimática e tem um papel preponderante por funcionarem como ácidos de Lewis, ativando o substrato. Estes íons são chamados de cofatores e são regenerados no final da catálise (BETTELHEIM, BROWN, CAMPBELL, FERREL, 2012).

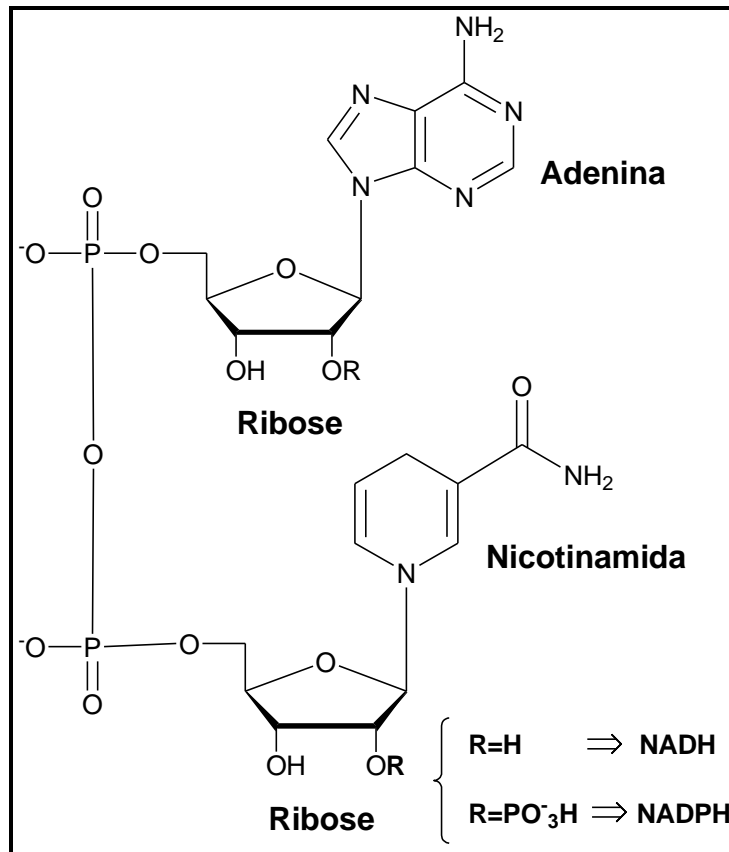
As coenzimas também são consideradas uma outra classe de cofator. Elas são substâncias orgânicas não proteica, sendo que muitas delas são vitaminas ou estão metabolicamente relacionadas a estas. Várias delas estão envolvidas em reações de oxirredução e outras participam das reações de transferência de grupos funcionais. Algumas coenzimas comumente encontradas estão relacionadas na Tabela 2 (OLIVEIRA e MONTOVANI, 2009).

Tabela 2: Coenzimas utilizadas em biocatálises

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

Uma das principais coenzimas, o dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NADH) e o dinucleotídeo de nicotinamida adenina fosfato (NADPH) participam das reações de redução, fornecendo hidretos para o processo de redução do substrato. Sua estrutura (Figura 4) é constituída por três partes: um anel nicotinamida, um anel de adenina e dois grupos de açúcares fosfatados unidos (BETTELHEIM, BROWN, CAMPBELL, FERREL, 2012).

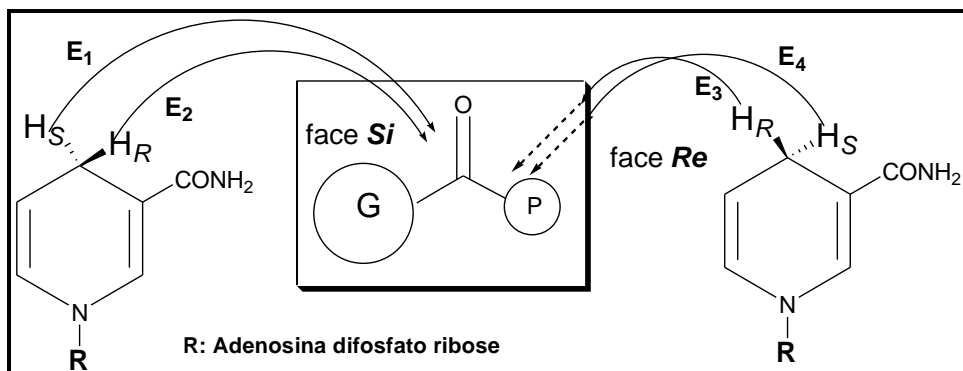
Figura 4: Estrutura química do NADH e NADPH



Fonte: adaptado de (Bettelheim, 2012, p. 678).

Durante a atividade catalítica de redução é imprescindível a participação de coenzimas, tais como NADH ou NADPH, em que um hidreto é transferido para o carbono carbonílico do substrato. Existem quatro caminhos estereoquímicos que permitem a transferência de hidreto da coenzima para o substrato, como apresentado no esquema da Esquema 1.

Esquema 1: Transferência de hidreto da coenzima para o substrato



Fonte: Adaptado de Nakamura et al. (2003, p. 2661)

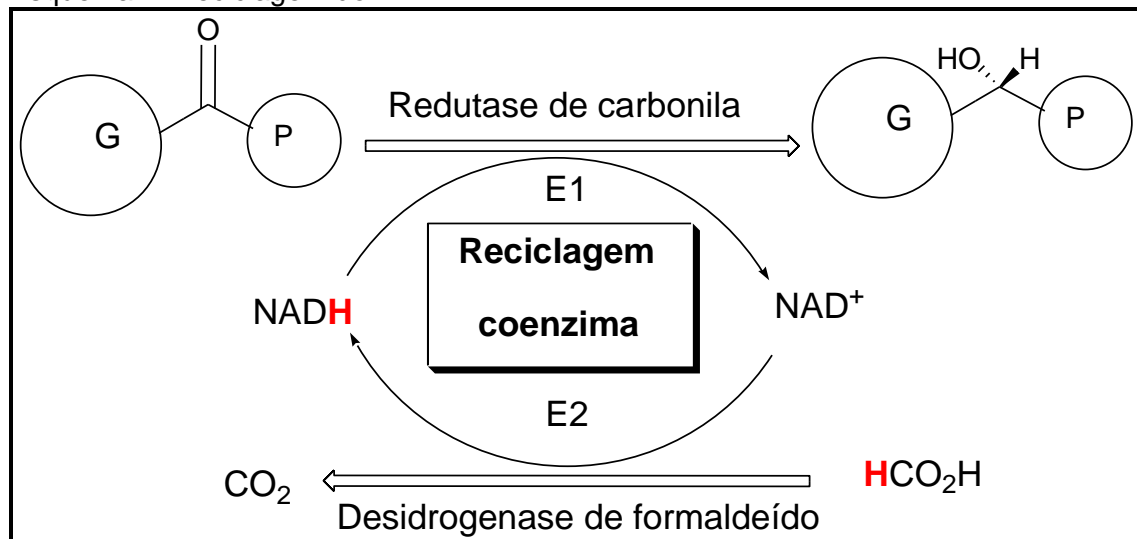


No Esquema 1, **P** é um grupo pequeno e **G** é um grupo grande. O grupo **R** ligado ao anel nicotinamida representa adenosina difosfato ribose. Com as enzimas **E<sub>1</sub>** e **E<sub>2</sub>**, o hidreto ataca a face **Si** do grupo carbonílico, enquanto com as enzimas **E<sub>3</sub>** e **E<sub>4</sub>**, o hidreto ataca a face **Re**, que resulta na formação de (*R*) e (*S*)-álcool, respectivamente (NAKAMURA et al., 2003).

Como as coenzimas são usadas na reação em quantidade estequiométrica, e estas apresentam alto custo, a utilização das mesmas somente se torna viável se forem regeneradas (OLIVEIRA e MONTOVANI, 2009).

As fontes de hidreto para regeneração de coenzima, incluem substâncias, tais como etanol, 2-propanol, glicose, ácido fórmico, entre outros. O esquema 2 ilustra o uso de ácido fórmico como uma fonte de hidreto para regeneração do NADH com desidrogenase de formaldeído (NAKAMURA et al, 2003).

Esquema 2: Reciclagem do NADH



Fonte: Adaptado de Nakamura et al. (2003, p. 2661).

No Esquema 2, pelo caminho E1, o NADH se oxida fornecendo hidreto para redução da cetona em álcool. Enquanto, pelo caminho E2, o formaldeído é oxidado a dióxido de carbono, fornecendo hidreto para redução do NAD<sup>+</sup>, regenerando o NADH.

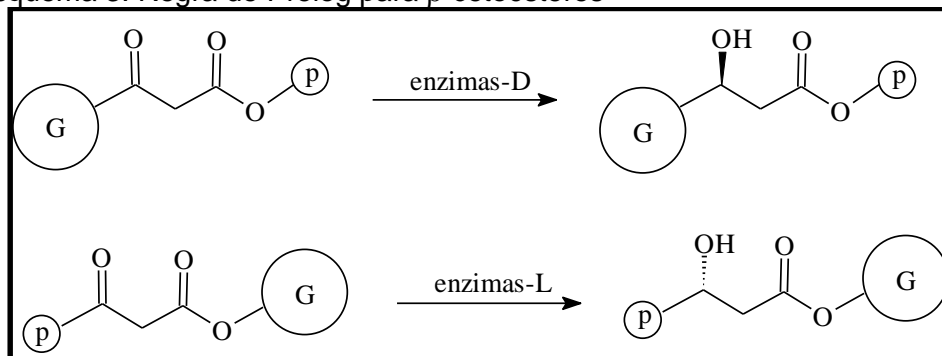
A regeneração da coenzima também viabiliza a síntese por que permite que a reação se processe por completo, previne o acúmulo de subproduto que causa inibição enzimática, facilita o tratamento da reação e promove o aumento da enantiosseletividade (OLIVEIRA e MONTOVANI, 2009).

Nas reduções biocatalíticas, enzimas da classe oxidoreductase catalisam a transferência de hidreto com alta estereosseletividade. Em 1964, Prelog observou que a estereosseletividade na biorredução de cetonas dependia do tamanho dos grupamentos ligados à carbonila (YADAV et al., 2002).

A regra de Prelog foi concebida para redução de decalonas por *Curvularia luneta* e se aplica tanto para cetonas simples, quanto para  $\beta$ -cetoésteres (SIH e CHEN, 1984). Para cetonas simples (Esquemas 1), a regra prediz que quanto maior a diferença entre os grupos ligados à carbonila, maior é a probabilidade de uma enzima doar hidreto pela face *Re* da carbonila.

Enquanto para  $\beta$ -cetoésteres, a regra postula que quando o grupo alcóxi é bem menos volumoso que o grupo vizinho à carbonila, as enzimas que transferem hidreto pela face *Si* (enzimas D) da carbonila são mais rápidas, mas quando o grupo alcóxi é bem mais volumoso que o grupo vizinho a carbonila, geralmente a seletividade se inverte e as enzimas L são mais rápidas. Isso permite controlar com alta estereosseletividade o hidreto a ser transferido para o substrato, em função da escolha do sistema catalítico e do volume dos grupos P e G, que podem ser modificados propositalmente no substrato (esquema 3).

Esquema 3: Regra de Prelog para  $\beta$ -cetoésteres



Fonte: Riatto et al. (2003, p. 2661).

A alta enantiosseletividade só é possível quando a enzima é capaz de selecionar uma das faces da carbonila, para formar um estado de transição de energia consideravelmente menor, em relação a outra face (SIH e CHEN, 1984).

### 3.2 A BIOCATÁSE COM ENZIMAS ISOLADAS

Mais de 90% das enzimas utilizadas em processos biocatalíticos são produzidas por microrganismos através de fermentação. Células procarióticas e eucarióticas são facilmente desenvolvidas em cultura e o processo em escala industrial é bem estabelecido. Vários tipos de fungos, bactérias e leveduras têm sido rastreados para produção de enzimas. Enzimas extracelulares, por exemplo, enzimas hidrolíticas são segregados em cultura líquida e sólida e são relativamente estáveis no meio de cultivo (DRAUZ, GRÖGER e MAY, 2012).

Os 10% restantes das enzimas são originárias de plantas e animais. Entre as oriundas de plantas, pode-se citar as proteases, presentes na papaína, bromelinas e ficina; lipoxigenases de grão de soja e germe de trigo, e peroxidases de rábano. As enzimas de origem animal, entre as mais conhecidas, são esterases e lipases, extraídas de fígado e pâncreas de porco, respectivamente, e a enzima arginase de origem de fígado de bezerro (DRAUZ, GRÖGER, MAY, 2012).

Em geral, a seleção da enzima adequada para atuar como biocatalisador é realizada com base em algumas propriedades, incluindo atividade, especificidade ao substrato, estabilidade a variação da temperatura e pH, enantiosseletividade, ou compatibilidade a outras condições físicas e químicas do meio reacional. Tradicionalmente, as enzimas comercialmente disponíveis são selecionadas a partir de varreduras de microrganismos de diferentes ambientes ou coleção de culturas. Mas infelizmente, a maioria das enzimas tem sido isoladas de poucas espécies de microrganismos, tais como bacilos e pseudomonas devido às limitações das técnicas de cultivos de microrganismos. Por isso, é amplamente reconhecido que 99% das espécies dos microrganismos nunca foram cultivadas e, portanto, nunca foram investigadas (DALBOGE e LANGE, 1998). Mostrando que apesar do enorme sucesso dos biocatalisadores, ainda há um vasto potencial a ser explorado.

As principais técnicas de purificação de enzimas incluem a eletroforese, a centrifugação e a cromatografia. A centrifugação separa enzimas com base nas suas diferenças de massas e formas, enquanto a eletroforese separa enzimas com base nas suas diferenças de carga. A cromatografia líquida separa enzimas com base nas suas diferenças de carga (cromatografia de troca iônica), massa (cromatografia de filtração em gel) e propriedade de interação com a fase estacionária (cromatografia por afinidade) (LODISH et al., 2000).

A vantagem de se utilizar enzimas isoladas ou purificadas pode ser justificada pelas propriedades que as tornam atrativas como biocatalisadores, tais como alta

eficiência catalítica (podem elevar a velocidade de uma reação de  $10^8$  a  $10^{12}$ ), alta seletividade (as enzimas podem ser estereosseletivas, regioseletivas e quimiosseletivas), podem ser empregadas em baixa concentração molar (porcentagem molar de  $10^{-3}$  a  $10^{-4}\%$ ), facilidade na purificação dos produtos e maior produtividade (CASTRO et al., 2004). Além disso, as enzimas são biodegradáveis e, em alguns casos, as transformações podem ocorrer em meio aquoso, evitando o uso de solventes poluentes (FABER, 1997). Contudo, fatores relacionados ao custo, disponibilidade da enzima e inexistência de sistemas apropriados para regeneração de cofatores, podem inviabilizar a sua aplicação (POLLARD e WOODLEY, 2007). Entretanto, processos modernos de engenharia genética desenvolvidos nos últimos tempos propõem superar estas limitações (CHEN, CHEN e WU, 2012).

Dentre as classes de enzimas mais utilizada em síntese orgânica, as enzimas hidrolíticas constituem o grupo com maior aplicação (Tabela 3), por catalisarem reações de biotransformação com alta químio-, régio-, enantiosseletividade e por possuírem a vantagem de não dependerem da regeneração de cofatores (OLIVEIRA e MONTOVANI, 2009).

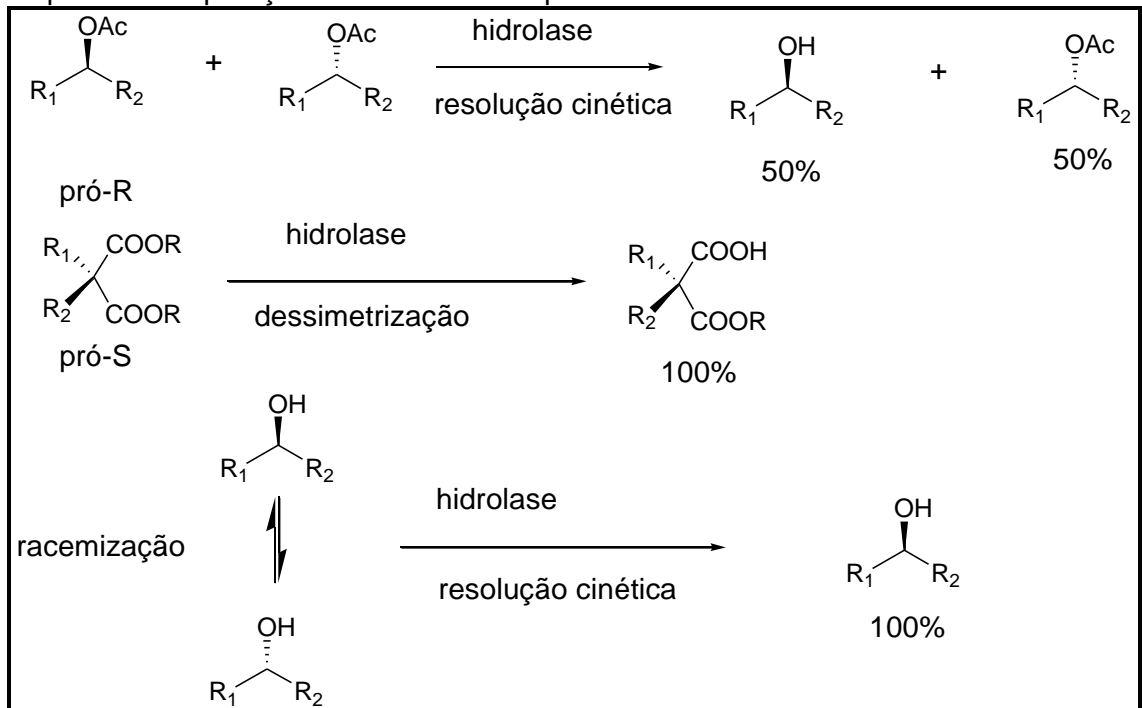
Tabela 3: Classes de enzimas e suas aplicações em processos

Classe de enzimas	Subclasses mais utilizads	Aplicação
Hidrolases	Esterases, lipases, amidases, fosfatases e epóxido hidrolases	60%
Oxidoredutases	Desidrogenases, mono e dioxogenases, peroxidases	25%
Transferases	quinases	5%
Liases	Carboxiliases, amônia-liases, hidroliases	5%
Ligases	Aldolases, transaldolases, glicosidases, transminases	1%
Isomerases	Racemases, epimerases	1%

**Fonte:** adaptado de Oliveira e Montovani, 2009

Dentre as hidrolases, as lipases, são as mais empregadas e muito úteis para resolução de racematos, dessimetriação de compostos *meso* e misturas racêmicas, resultado em produtos enantiomericamente puros (Esquema 4).

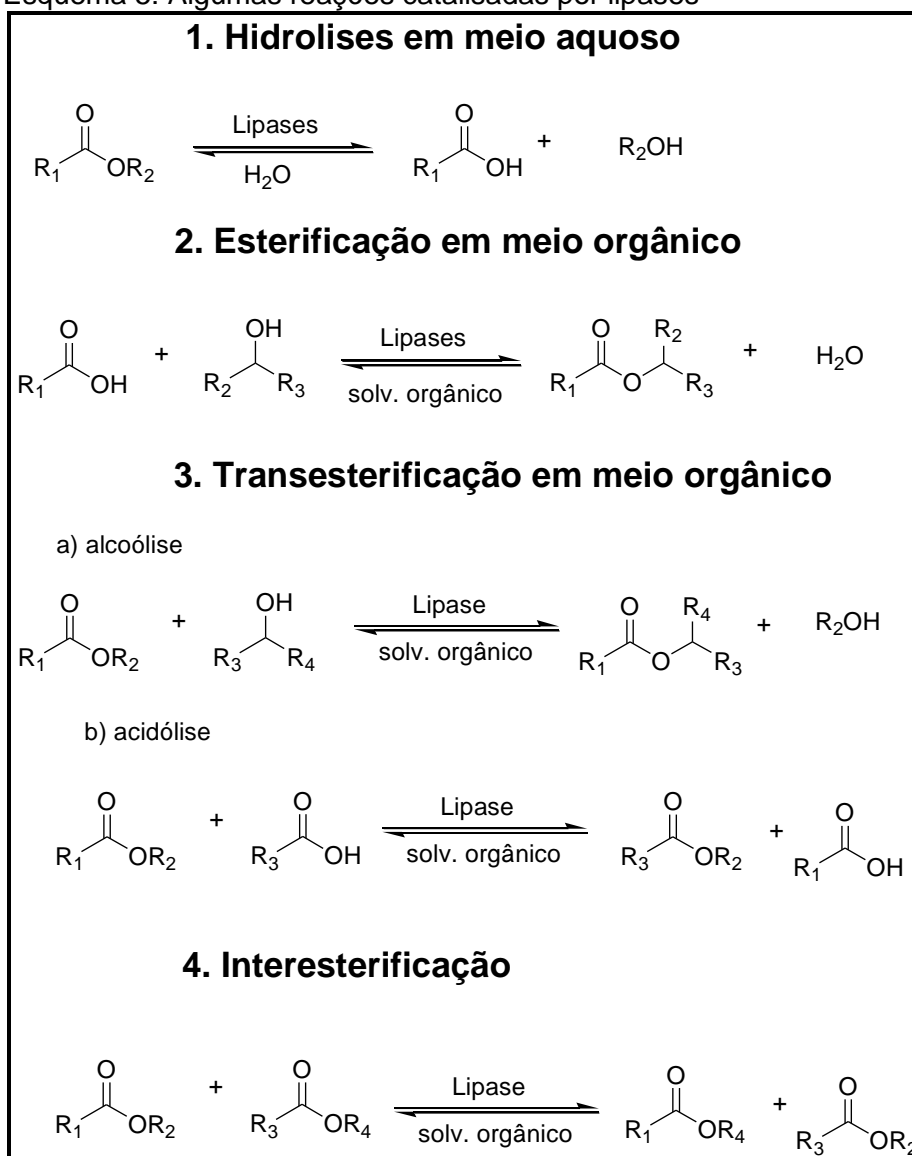
Esquema 4: Separação de enantiômeros por hidrolases



Fonte: Ghanem, 2007

As lipases apresentam grande versatilidade, além de também, catalisarem os processos reversos (esterificação, transesterificação e interesterificação) realizados pelas outras hidrolases. Ainda apresentam a vantagem de permitir a catálise de reação em meio aquoso (Esquema 5), com alto desempenho (HUDLICKY e REED, 2009). Estas enzimas possuem também grande importância biotecnológica por serem capazes de hidrolisar ligações éster em triglicerídeos, processar gorduras ou atuar como detergentes. Na última década, o interesse pelas lipases aumentou consideravelmente, devido sua importância na produção de fármacos, agroquímicos e química fina (BUSTO, 2006).

Esquema 5: Algumas reações catalisadas por lipases



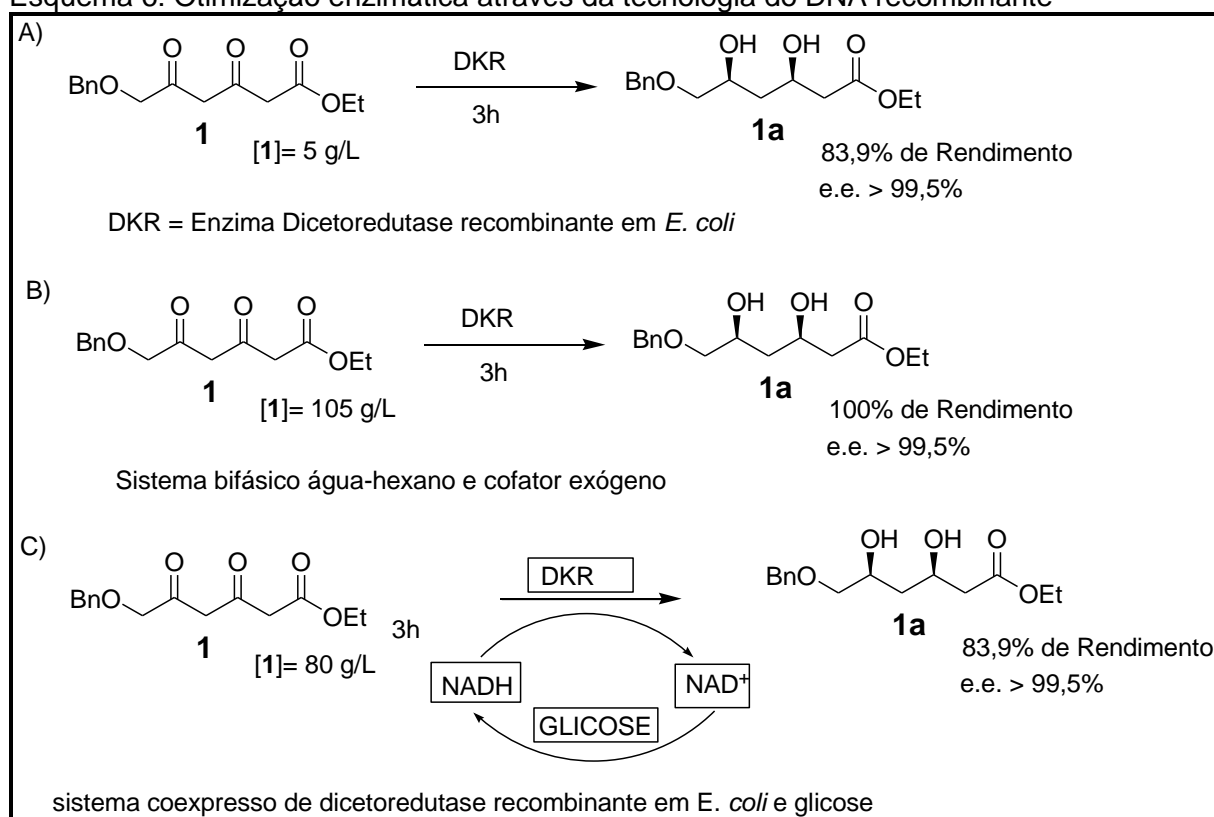
Fonte: Ghanem, 2007

A segunda classe de enzimas mais utilizada em síntese orgânica, as oxirredutases apresentam 25% de aplicação (Tabela 3). A sua utilização não é comum na forma de enzima isolada. Estas enzimas são cofatores dependentes, tais como NADH(P) ou NAD(P)<sup>+</sup> (OLIVEIRA e MONTOVANI, 2009). Estas coenzimas funcionam como doadores e receptores de elétrons para o substrato e cossustrato, respectivamente. Exceções incluem as peroxidases, em que reduções do peróxido de hidrogênio à água, ocorrem com oxidações de dois elétrons do substrato, as oxidases, que reduções do oxigênio ao peróxido de hidrogênio e água ocorrem com oxidação de dois e quatro elétrons substrato, respectivamente (BLANK et al., 2010). Para que o processo biocatalítico das enzimas dependentes de coenzimas seja

viável, economicamente, estes cofatores precisam ser regenerados por um segundo sistema catalítico, em presença de um cossubstrato (Esquema 2).

No entanto, a tecnologia do DNA recombinante pode produzir biocatalisadores com características catalíticas diferentes da enzima original e eficientes para um determinado processo. Um exemplo é a síntese de estatinas e supervastatinas, fármacos que têm a função de redução do nível de colesterol no sangue e um dos medicamentos mais prescritos no mundo (CHEN, CHEN e WU, 2012). Originalmente, para tornar a enzima dicetoreductase recombinante (DKR) viável para a produção em larga escala de supervastatinas, um sistema de células *in situ* foi estabelecido com DKR em *E. coli*, utilizando cofator endógeno e glicose como cossubstrato. Neste sistema, a concentração do substrato foi de 5 g/L e a conversão ocorreu em 3 horas, obtendo **1a** com 83,9% de rendimento (Esquema 6a). Mas para este caso, a desvantagem deste processo é a baixa concentração de substrato e a dificuldade de recuperação do produto do meio reacional.

Esquema 6: Otimização enzimática através da tecnologia do DNA recombinante



Fonte: CHEN, CHEN e WU, 2012, p. 1746.

Subsequentemente, em um sistema bifásico hexano-água (Esquema 6B), **1**, em concentração de 105 g/L, foi convertido completamente em **1a**, na presença de um cofator exógeno (CHEN, 2011d).

A fim de diminuir ainda mais os custos e aumentar a eficiência catalítica, um sistema coexpresso, consistindo de DKR e glicose desidrogenase foi construído e otimizado, transferindo suficientemente hidreto para dicetona através de contínua reciclagem de NADH (Esquema 6C). Este sistema de células recombinantes converteu **1** em **1a** completamente com uma concentração de substrato de 80 g/L, que é 15 vezes maior que o sistema original (CHEN, 2011e).

As transferases catalisam a transferência de grupos funcionais como metila, hidroximetila, formal, glicosila, acila, alquila, fosfato e sulfatos por meio de uma reação de substituição nucleofílica. Elas não são muito utilizadas na indústria. Aparecem com 5% de aplicação (Tabela 3). O exemplo mais importante é a utilização de glicosiltransferases para a síntese de oligossacarídeos (GINSBURG e ROBBINS, 1984). Um outro exemplo é o uso de glicoquinase em combinação com quinase de etila para produção de glicose-6-fosfato (WANDREY, LIESE e KIHUMBU, 2000).

Assim como as transferases, as liases, também aparecem com participação de 5% de utilização nos processos industriais (Tabela 3). Estas enzimas são responsáveis por reações de adição e eliminação, que envolvem a quebra de ligação carbono-carbono, carbono-enxofre e carbono-oxigênio. Nos processos naturais estas enzimas participam do ciclo do ácido cítrico e em síntese orgânica na produção de cianidrinas (Faber, 1997).

### **3.3 BIOCATÁLISE COM CÉLULAS INTEIRAS DE MICRORGANISMOS**

Os processos que envolvem células íntegras se tornam viáveis quando a disponibilidade das enzimas, o processo de purificação e a utilização de cofatores acarretarem alto custo. A aplicação de células inteiras, em geral, envolve custo mais baixo, principalmente em sistemas dependentes de cofator, por que a própria célula possui a capacidade de realizar a regeneração. Além disso, permite a realização de síntese seletivas utilizando matérias primas baratas e abundantes. Embora a ocorrência de reações paralelas indesejadas, reversibilidade, baixa tolerância a substratos e solventes orgânicos, pesem contra o uso de células inteiras em



biocatálises (FABER, 1997). Outras limitações são a exigência de equipamentos complexos e dificuldades no trabalho operacional, devido à necessidade de utilização de grandes volumes, causando baixa produtividade. Porém, em resposta a esses efeitos indesejáveis, o emprego da tecnologia do DNA recombinante facilita o uso de células íntegras em síntese orgânica, representando uma oportunidade mais efetiva para o desenvolvimento de processos, que podem ser aproveitados nas indústrias química e farmacêutica (OLIVEIRA e MONTOVANI, 2009).

Os principais organismos utilizados em processos biocatalíticos são fungos (leveduriformes e filamentosos) e determinados procariotos. As células de plantas e de animais também sintetizam enzimas para a biotransformação, porém são de crescimento mais lento que os microrganismos, de manipulação mais difícil e de maior custo (RAMOS, 2009). O tempo de reprodução de um microrganismo é relativamente baixo. Isso permite que uma grande quantidade de biomassa possa ser produzida rapidamente quando microrganismos são cultivados. Por isso, fungos, leveduras e bactérias são mais empregados. Além disso, os microrganismos formam um grupo de organismos vivos com inúmeras espécies diferentes, com propriedades diversas e grandes variedades de processos metabólicos (OMORI, 2005).

Para Ramos (**Apud** MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2004), uma espécie de microrganismo é adequada a um processo de biotransformação se ela, além de ser capaz de catalisar a reação de interesse, seja geneticamente estável, se multiplique rapidamente, cresça em meio de cultura de custo baixo e não seja patogênico para o homem. Quando a enzima pertencente ao microrganismo é responsável pela biotransformação é intracelular, ainda é necessário que existam mecanismos de transporte adequados para entrada de substrato e a saída de produto da célula. Isso pode aumentar a seletividade do processo, pois muitas proteínas carreadoras reagem com um único tipo de molécula ou grupo funcional, determinando especificidade ao transporte.

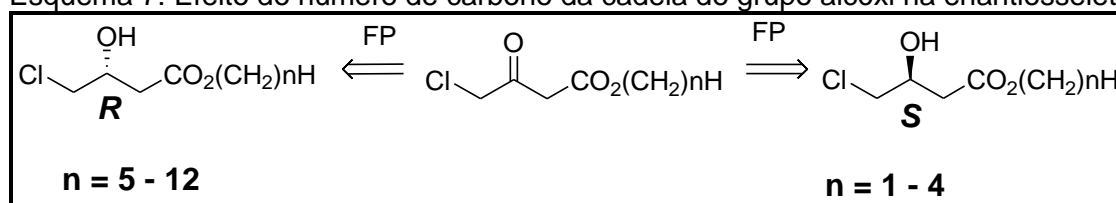
A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, também conhecida como fermento biológico ou fermento de pão (FP) é um dos microrganismos mais utilizados em síntese orgânica por ser um dos biocatalisadores mais versáteis e baratos (WARD, 1995). A grande disponibilidade comercial da levedura, facilidade de obtenção, admitir grande variedade de substrato e facilidade de manuseio, a torna preferida, quando se deseja realizar reações de oxidação-redução (NAKAMURA et al, 2003).

Nakamura e colaboradores (1993) realizaram os primeiros estudos de  $\alpha$ -cetoésteres com FP seco, em benzeno e hexano, e observaram que a quantidade controlada de água (0,4 equivalentes; 1 mL/g FP) na mistura reacional, torna-se indispensável para promover a reação, enquanto o excesso de água, inviabilizava. Este mesmo estudo foi realizado por Smallridge e col. em 1994 para  $\beta$ -cetoésteres, com vários solventes polares e apolares, confirmando o efeito da influência da água na reatividade. Este estudo também constatou que a redução do acetoacetato de etila em solvente orgânico resultou na obtenção do (S)-3-hidroxiacetato de etila com e.e. de 96%. Enquanto Nakamura e col., em 1993, obtiveram para a redução de  $\alpha$ -cetoésteres o enantiômero S, quando em meio aquoso, e para a redução em solvente orgânico foi obtido o enantiômero R.

Um outro exemplo marcante foi constatado na redução de  $\beta$ -cetoésteres por FP (CHEN, C. S. et al, 1984) (Esquema 7). Na redução de derivados de 4-cloro-3-oxobutanoato, quando o número de carbono do grupo alcóxi variou de 1 a 4 carbonos, obteve-se o enantiômero S, enquanto com a cadeia variando de 5 a 12 carbonos, obteve-se o enantiômero R.

Observa-se que estes resultados estão de acordo com a regra de Prelog. O grande mérito da inversão da seletividade observada é a possibilidade de se obter os dois enantiômeros utilizando a mesma reação. Pois, já que o comprimento do substrato controla o curso estereoquímico da reação, é possível obter cada um dos enantiômeros através da escolha do tamanho da cadeia do substrato e após a redução, o grupo éster pode ser mudado por transesterificação sem racemização do centro estereogênico (NAKAMURA, 2003).

Esquema 7: Efeito do número de carbono da cadeia do grupo alcóxi na enantiosseletividade



Fonte: Adaptado de NAKAMURA, 2003

O controle estereoquímico da reação de biocatálise pode ser alcançado também através da otimização das condições reacionais. Nakamura e colaboradores (1996) investigaram redução de cetona com o uso de células tratadas de

*Geotrichum candidum*, cujos os resultados podem ser vistos no Esquema 8, Tabela 4.

Esquema 8: Tratamento de *G. candidum* para aumento de enantiosseletividade

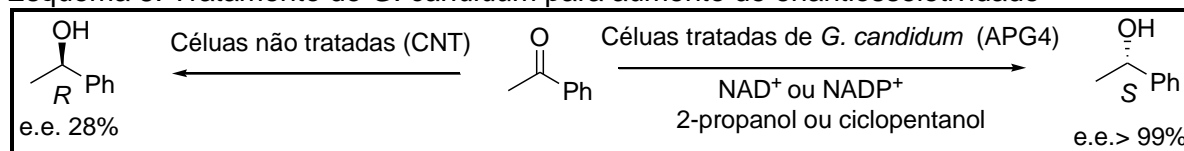


Tabela 4: Tratamento de *G. candidum* para aumento de enantiosseletividade

Entrada	Catálise	Coenzima	Aditivo	Rendimento (%)	e.e. (%)
1	CNT	Não	Não	52	28 (R)
2	APG4	Não	Não	0	-
3	APG4	NAD <sup>+</sup>	Não	1	71 (S)
4	APG4	Não	2-propanol	8	98 (S)
5	APG4	NAD <sup>+</sup>	2-propanol	89	>99 (S)
6	APG4	NAD <sup>+</sup>	ciclopentanol	97	>99 (S)
7	APG4	NAPD <sup>+</sup>	ciclopentanol	86	>99 (S)

Fonte: Adaptado de NAKAMURA, 2003

A discussão que segue se refere os resultados da Tabela 4. A redução da acetofenona catalisada com células não tratadas de *G. candidum* (CNT) resultou em baixa enantiosseletividade, 28% de e.e. para o enantiômero *R* (Tabela 4, entrada 1). Quando a catálise foi realizada por células tratadas de *G. candidum* (APG4) (entrada 2) não foi observado redução, o que indica perda da coenzima necessária à redução e/ou do sistema de regeneração da coenzima durante o tratamento da célula. A adição do NAD<sup>+</sup> (entrada 3) não resultou em efeito significativo sobre o rendimento e a adição de somente o 2-propanol (entrada 4) resultou em baixo rendimento, mas significativo aumento da enantiosseletividade. Supreendentemente a adição simultânea de uma coenzima (NAD<sup>+</sup> ou NADP<sup>+</sup>) e um aditivo (2-propanol ou ciclopentanol) (entrada 5, 6 e 7) resultou em alto rendimento do álcool de configuração *S* enantiomericamente puro. Os autores concluíram que o aumento da enantiosseletividade de 28% (*R*) para > 99% (*S*) foi devido a supressão de várias enzimas que competem pela redução mesmo do substrato, seguido pela indução de

uma enzima específica pró S devido a adição da coenzima e um excesso do aditivo, agente que desloca o equilíbrio reacional em favor da redução do substrato.

Diferentes microrganismos têm sido usados na redução de vários  $\beta$ -cetoésteres. Entre eles, um dos mais estudados é o 4-cloro-3-oxobutanoato de etila. Os enantiômeros R e S do citado substrato foram produzidos por diversos microrganismos. Um exemplo, Kizaki e colaboradores (2001) relataram uso de *Candida magnoliae*, super expressa em *E. coli* para produzir o enantiômero S puro do referido álcool com 85% de rendimento. E em um outro exemplo, Aragozzini e colaboradores (1992) relataram um processo eficiente para produção do enantiômero R puro em 100% de rendimento, utilizando a bactéria *Lactobacillus kefir*. O primeiro enantiômero é útil como intermediário para síntese de estatinas, fármacos usados com o objetivo de diminuir os níveis séricos de lipoproteínas ricas em colesterol e evitar doença arterial coronariana. Enquanto o segundo é um importante bloco construtor quiral na síntese da L-carnitina, um fator essencial para a  $\beta$ -oxidação de ácidos orgânicos em mitocôndrias.

### 3.4 BIOCATÁLISE COM CÉLULAS INTEIRAS DE VEGETAIS

O uso de células vegetais como biocatalisadores tem recebido uma atenção especial pelos pesquisadores, haja vista, que estas células são abundantes e baratas, não requerem uso de cofatores nem de sistemas de regeneração (BERLIN et al., 1998). Além disso, as células vegetais dispõem de enzimas diferenciadas e únicas capazes de realizar as mais diversas bioconversões para a síntese de novas drogas e também modificação estrutural de drogas atuais (PRAS et al., 1995). Os compostos que podem sofrer biotransformação por células de plantas são de natureza variada. Incluem aromáticos, esteroides, alcaloides, cumarinas, terpenoides, e outras espécies moleculares (FRANSSEN e WALTON, 1999). Por isso, além do uso de enzimas derivadas de plantas, culturas de células e plantas intactas para biotransformação tem desfrutado de um considerável sucesso (CORDELL, 2007).

Speicher e colaboradores (2003) realizaram trabalhos de redução com diversos substratos exógenos, usando suspensão de culturas de células de briófitas das espécies *Marchantia polymorpha* (CMP), *Marchantia plicata* (CMpl), *Riccia fluitans*

(CRf) e *Asterella blumeana* (CAb). Os autores apresentaram que as células das plantas estudadas se mostraram eficazes para biorredução enantio- e diastereosseletiva de cetona e  $\beta$ -cetoésteres (Esquema 9). E a redução de cetonas e  $\beta$ -cetoésteres resultou em produtos de acordo com a regra de Prelog, ou seja, o hidreto foi transferido aos substratos, preferencialmente, pelo lado do grupo menos volumoso, como mostra o Esquema 9 e a Tabela 5.

Esquema 9: Substratos e produtos das reações, empregando-se cultura de células de *Marchantia polymorpha*, *Marchantia plicata*, *Riccia fluitans* e *Asterella blumeana*

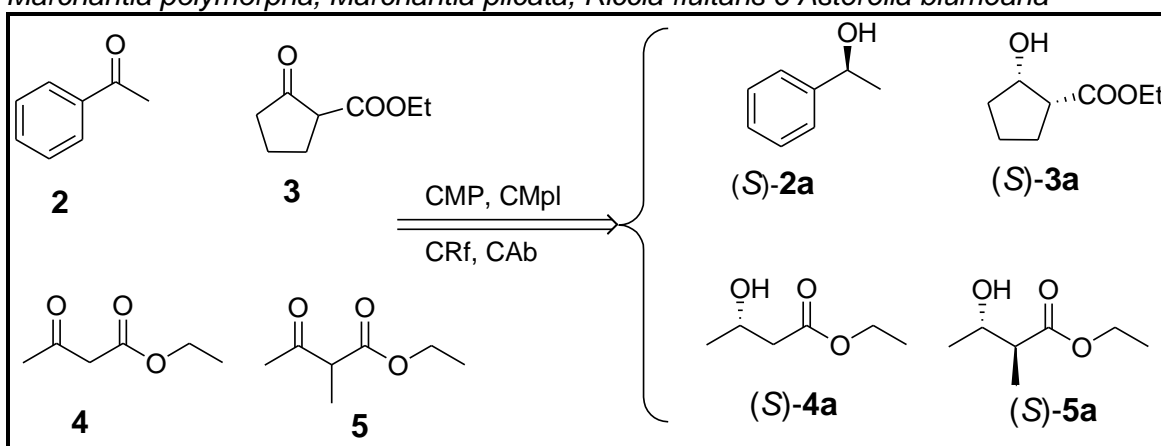


Tabela 5: Redução de cetonas e  $\beta$ -cetoésteres utilizando cultura de células de *Marchantia polymorpha*, *Marchantia plicata*, *Riccia fluitans* e *Asterella blumeana*

Vegetal	Substrato	Produto	Conv.(%)	Rend.(%)	e.e.(%)	d.e.(%)
<i>Marchantia polymorpha</i>	<b>2</b>	(S)- <b>2a</b>	45	-	74	-
	<b>3</b>	(S)- <b>3a</b>	-	90	78	-
	<b>4</b>	(S)- <b>4a</b>	100	90	40	-
<i>Marchantia plicata</i>	<b>2</b>	(S)- <b>2a</b>	70	-	44	-
	<b>3</b>	(S)- <b>3a</b>	-	65	42	88
	<b>4</b>	(S)- <b>4a</b>	100	90	70	-
	<b>5</b>	(S)- <b>5a</b>	100	92	96	>98
<i>Riccia fluitans</i>	<b>2</b>	(S)- <b>2a</b>	60	-	74	-
	<b>3</b>	(S)- <b>3a</b>	-	90	0	64
	<b>4</b>	(S)- <b>4a</b>	100	90	95	-
	<b>5</b>	(S)- <b>5a</b>	100	85	86	98
<i>Asterella blumeana</i>	<b>4</b>	(S)- <b>4a</b>	100	90	93	-
	<b>5</b>	(S)- <b>5a</b>	100	90	68	>97

Yang et al. (2008) utilizaram uma série de vegetais (*M. pumila*, *D. carota*, *C. sativus*, *A. cepa*, *S. tuberosum*, *R. sativus*, *I. batatas*) na redução enantiosseletiva de acetofenona (Esquema 10, Tabela 6), 4-cloroacetofenona (Esquema 11, Tabela 7). Os resultados variam de vegetal para vegetal, com bons rendimentos (>50%) e excessos enantioméricos (>90%) para a maioria dos vegetais.

Esquema 10: Substrato e produtos das reações com vegetais

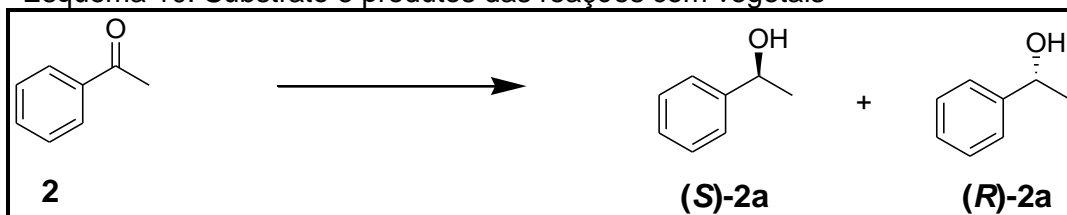


Tabela 6: Biotransformação de acetofenona com vegetais

Vegetal	50h		100h		Confi
	%Rend.	%e.e.	%Rend.	% e.e.	
Maçã ( <i>M. pumila</i> )	39	82	41	81	R
Cenoura ( <i>D. carota</i> )	78	95	79	96	S
Pepino ( <i>C. sativus</i> )	50	75	55	76	S
Cebola ( <i>A. cepa</i> )	53	74	54	74	S
Batata ( <i>S. tuberosum</i> )	28	94	51	92	R
Rabanete ( <i>R. sativus</i> )	72	71	82	73	S
Batata doce ( <i>I. batatas</i> )	42	80	43	80	R

Esquema 11: Substrato e produtos das reações com vegetais

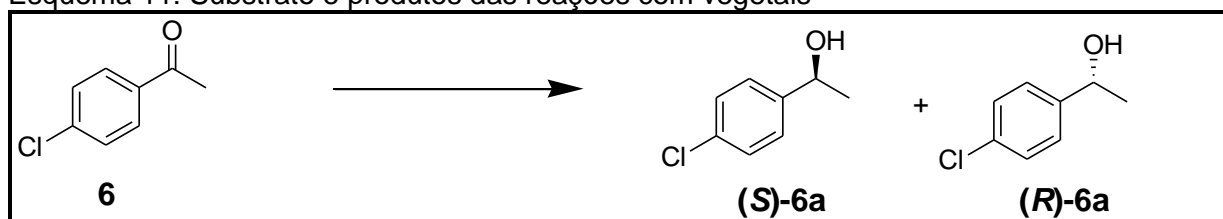


Tabela 7: Biotransformação de 4-cloroacetofenona com vegetais

Vegetal	50h		100h		Confi
	%Rend.	%e.e.	%Rend.	% e.e.	
Maçã ( <i>M. pumila</i> )	59	92	65	93	R
Cenoura ( <i>D. carota</i> )	42	99	43	98	S
Pepino ( <i>C. sativus</i> )	70	94	72	93	S
Cebola ( <i>A. cepa</i> )	58	89	74	90	S
Potato ( <i>S. tuberosum</i> )	50	99	63	99	R
Rabanete ( <i>R. sativus</i> )	55	89	72	90	S
Batata doce ( <i>I. batatas</i> )	53	94	53	93	R

O estudo mostrou que algumas plantas (cenoura, pepino, cebola e rabanete) levaram a produtos com predominância da configuração S, de acordo com a regra de Prelog, enquanto outras (maçã, batata e batata doce) formaram produtos majoritários de configuração R, anti-Prelog. Este fato pode ser traduzido em grande vantagem da biocatálise utilizando vegetais, podendo-se escolher a configuração do álcool pela a escolha do vegetal. Além disso, os autores concluíram que, a

acetofenona quando para-substituída por cloro (grupo retirador de elétrons) aumenta a atividade e a estereosseletividade.

Estudo realizado por Andrade e colaboradores (2006), evidenciou que ao longo do tempo de uma biotransformação pode ocorrer inversão da configuração do produto. Por exemplo, na bio-oxidação de (*RS*)-1-feniletanol por inhame roxo (*Dioscorea alata*) apresentou e.e. de 4% para a configuração *S* em 3 horas de reação e e.e. de 6% para a configuração *R* no tempo de 6 horas. Quando foi utilizado rabanete (*Raphanus sativus*) resultou em e.e. de 89% do álcool de configuração *S* para 3 horas e 98% de e.e. do álcool de configuração *R* para 6 horas de reação. A biorredução da acetofenona por rabanete apresentou e.e. de 15% de *S*-1-feniletanol em 3 horas e e.e. de 79% de *R*-1-feniletanol em 6 horas. Na biorredução de acetofenona empregando batata (*Solanum tuberosum*), o e.e. foi de 24% para *R*-1-feniletanol em 3 horas e 7% para *S*-1-feniletanol em 6 horas de reação. Os autores explicaram esta inversão de configuração, considerando que o mecanismo de bio-oxidação ocorre em duas etapas. Na primeira etapa um enantiômero foi preferencialmente oxidado à correspondente cetona e na segunda etapa esta foi reduzida por uma enzima redutase com característica estereoquímica oposta.

Entre 2008 e 2012, foram realizados diversos estudos sobre biotransformação empregando  $\beta$ -cetoésteres e células de plantas. Isso por que a preparação de álcoois secundários enantiomericamente puros, tornou-se de grande interesse devido suas numerosas aplicações como bloco construtores quirais para fármacos, agroquímicos e produtos nutricionais (DAUSSMANN et al, 2006). O Esquema 12 e a Tabela 8 resumem os estudos descritos na literatura no período citado acima.

Esquema 12: Substrato (S) e produto (P) das reações com vegetais

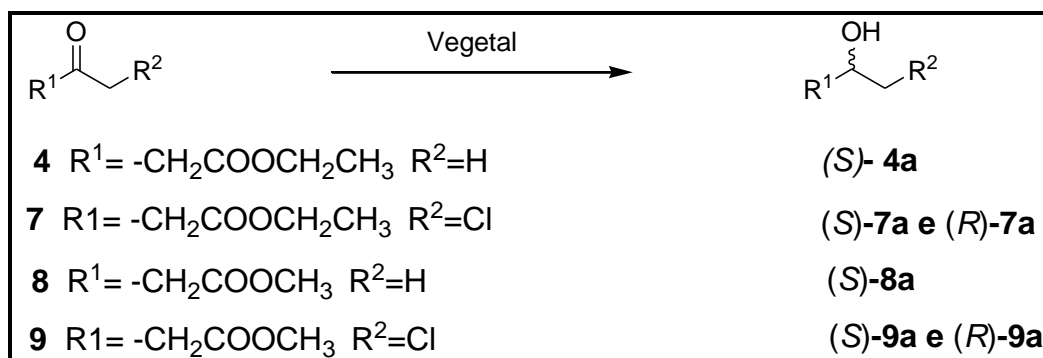




Tabela 8: Preparação de  $\beta$ -hidróxi ésteres por biotransformação catalisada por vegetais

Vegetal	S	%C <sub>v</sub>	%e.e./P	Condições	Referência
Aipim ( <i>M. dulcis</i> )	4	95	98/(S)-4a	Frasco agitado: 160 rpm, C <sub>vegetal</sub> : 20g/100mL, C <sub>substrato</sub> : 11mmol/L, 72 horas, T. ambiente.	Machado et al., 2008
Mandioca ( <i>M. esculenta</i> )	4	79	97/(S)-4a		
Maçã ( <i>M. pumila</i> )	7	59	85/(S)-7a		
Cenoura ( <i>D. carota</i> )	7	42	90/(S)-7a		
Pepino ( <i>C. sativus</i> )	7	70	75/(S)-7a	Frasco agitado:150 rpm, C <sub>vegetal</sub> :15g/40mL,	Yang et al., 2008
Cebola ( <i>A. cepa</i> )	7	58	70 (R)-7a	C <sub>substrato</sub> :10mmol/L,	
Batata ( <i>S.tuberosum</i> )	7	50	58/(S)-7a	30° C, 50 horas.	
Rabanete( <i>R.sativus</i> )	7	55	69/(S)-7a		
Batata doce ( <i>I.batatas</i> )	7	53	82/(S)-7a		
Água de Coco ( <i>C.nucifera L.</i> )	4	78	99/(S)-4a	Frasco agitado: 160 rpm, C <sub>vegetal</sub> : 300mL de água de coco pura C <sub>substrato</sub> : 5,12mmol/L, 30° C, 72 horas.	Fonseca et al., 2009
Feijão de corda ( <i>Vigna unguiculata</i> )	8	83	99/(S)-8a	Frasco agitado: 250 rpm, C <sub>vegetal</sub> :1g/3mL,	Bizerra et al., 2010
Feijão de corda ( <i>Vigna unguiculata</i> )	9	88	99/(R)-9a	C <sub>substrato</sub> : 13mmol/L, C <sub>aditivo</sub> : 2% v <sup>-1</sup> iPrOH 48 horas, 30° C	
Soja ( <i>Glycine max</i> )	4	77	73/(S)-4a	Frasco agitado: 175 rpm, C <sub>vegetal</sub> :23/150mL, C <sub>substrato</sub> : 10mmol/L, 72 horas, T. ambiente	Bertini et al., 2012

Legenda: C – concentração; %C<sub>v</sub> – conversão de produto; S – substrato; P - Produto

### 3.4.1 Inhambu (*Dioscorea trifida* L.)

*Dioscorea trifida* L. é uma planta originária do Norte da América do Sul conhecida por várias denominações no Brasil, como Inhambu, Cará roxo, Cará doce, Cará, entre outras e cultivada em várias regiões do nordeste brasileiro (Santos, 1996). Segundo BOUSALEM et al. (2010), *D. trifida* pode ter sido domesticada e propagada pelas mesmas tribos envolvidas no processo de domesticação da mandioca, possivelmente sendo a primeira espécie de Inhame cultivada por povos indígenas na Amazônia (DEGRAS, 1993).

A espécie *D. trifida*, pertence ao gênero *Dioscorea* sp.. Este gênero é constituído de várias espécies, sendo as mais importantes aquelas que produzem túberas comestíveis (*Dioscorea* L.): *Dioscorea cayennensis*, *Dioscorea rotundata*, *Dioscorea alata*, *Dioscorea trifida* e *Dioscorea esculenta* (SANTOS et al, 2006).

A espécie *D. trifida* (Figura 5) é uma planta herbácea trepadeira, caule alado poligonal sem espinho, folhas em formato de palma e que produz pequenas túberas subterrâneas, ovoides e oblongos, com 15 a 20cm de comprimento, pesando de 80 a 150g, com massa feculenta branca, amarela, rosa ou púrpura (Santos, 1996). Obedece a seguinte classificação botânica:

Tabela 9: Classificação botânica do *Dioscorea trifida* L. (Inhambu)

REINO	Plantae
DIVISÃO	Magnoliophyta
CLASSE	Liliopsida
ORDEM	Dioscoreales
FAMÍLIA	Dioscoreaceae
GÊNERO	<i>Dioscorea</i>
ESPÉCIE	<i>Dioscorea Trifida</i>

A cultura de *Dioscorea* sp apresenta importância social e econômica significativa para o Nordeste do Brasil, principalmente para os estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia e Maranhão, por constituir um bom negócio agrícola, em função do alto consumo pela população. As túberas possuem excelente qualidade nutritiva e energética, sendo ricas em vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina, niacina,

adermina), carboidratos (amido principalmente), minerais e propriedades medicinais, além de apresentarem baixos teores de gorduras.

Essas plantas se desenvolvem, satisfatoriamente, em clima tropical quente e úmido, sob condições de regime pluvial de 1.000 a 1.600 mm anuais, com temperatura ótima diária de 24 a 39 °C e umidade relativa do ar de 60 a 70%. Produz bem em solos de textura arenosa e média, profundos, bem drenados e arejados, férteis e ricos em matéria orgânica, com pH de 5,5 a 6,0 (Santos, 1996, Santos et al., 2006). E ainda, segundo MURAYAMA (1999), essas plantas são resistentes ao estresse hídrico, pouco exigente quanto ao tipo de solo e adubação, dispensa a aplicação de fungicida, bem como renovação periódica de sementes.

Embora, cultivada em todas as regiões do Brasil (VEASEY et al., 2010), (VALEZ, 1998), (BRESSAN et al., 2005), a cultura do inhambu se caracteriza por uma agricultura familiar, de subsistência e realizada em pequenas roças, sendo o seu plantio consorciado com outras espécies, sobretudo hortaliças.

Nenhum estudo foi encontrado na literatura científica do emprego de *D. trifida* como biocatalisador.

Figura 5: Imagens da planta *Dioscorea trifida* L.(Inhambu)



Legenda: A) Planta *Dioscorea Trifida* L.; B) Inflorescência; C) Caule alado; D) Folhas palmadas; E) Túberas subterrâneas. Fonte (NASCIMENTO, 2013)

### 3.4.2 Palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mil)

A Palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mil) pertence a família *cactaceae* que possui cerca de 130 gêneros e 1500 espécies, das quais 300 são do gênero *opuntia* Mil (MOHAMED-YASSEEN et al, 1996). O gênero *Opuntia*, bem como *Nopalea* são os mais importantes devido maior utilidade para o homem (VALDEZ e OSÓRIO, 1997).

Segundo Alves (2011) a Palma apresenta dificuldade de caracterização devido suas variações fenotípicas, hibridação, entre outras. E a espécie *O. ficus-indica* pode ter a classificação científica, conforme Tabela 10.

Tabela 10: Classificação científica da *Opuntia ficus-indica* (L.) Mil. (Palma)

REINO	Plantae
DIVISÃO	Magnoliophyta
CLASSE	Magnoliopsida
ORDEM	Caryophyllales
FAMÍLIA	Cactaceae
SUBFAMÍLIA	Opuntioideae
GÊNERO	<i>Opuntia</i>
ESPÉCIES	<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mil

Originária do México, onde é cultivada desde do período pré-hispânico, a *Opuntia ficus-indica* (L.) Mil, (Palma), também conhecida como figueira-da-índia, é um tipo de cactácea bem adaptada às regiões de climas semiáridos e áridos do planeta (HOFFMAN, 1995). Do México, a palma migrou para outros países, e atualmente é cultivada com relativo sucesso nas regiões áridas e semiáridas do México, Estados Unidos, África do Sul e Austrália, tendo sido introduzida no Brasil no estado de Pernambuco em 1880, a partir de mudas do Texas, EUA (DOMINGUES, 1963).

No Nordeste do Brasil pode ser encontrado três tipos diferentes de palmas: a) a gigante, da espécie *O. ficus-indica* (**Figura 6**), b) a redonda, da espécie *Opuntia sp* e a miúda, da espécie *Nopalea cochenilifera*. São espécies que não suportam

umidade excessiva e em solos profundos apresentam extraordinária capacidade de extração de água, a ponto de possuírem cerca de 90 a 93% de umidade, o que as tornam importantíssimas para a região do Brasil denominada de polígono da seca, que compreende as regiões semiáridas dos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Piauí, Pernambuco e Sergipe (SILVA & SANTOS, 2006).

Figura 6: Imagem de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mil (palma)



Fonte: <http://www.cactacea-sesimbra.com>

A palma é a opção de cultura xerófita com maior potencial de exploração no Nordeste, sendo seu cultivo uma das principais estratégias para contornar a queda de produção de forragem nos períodos de seca. Notabiliza-se por ser o complemento mais usualmente utilizado para os animais do semiárido, sendo utilizado largamente no Nordeste, e por ser altamente resistente ao estresse hídrico, suporta grandes períodos de estiagem, devido suas características morfofisiológicas (GUIMARÃES FILHO et al, 1995; SANTOS et al, 1997).

Para Valdez (2003), o fato do Nordeste brasileiro utilizar a palma basicamente como ração animal, deixa de explorar plenamente suas potencialidades, sendo desperdiçadas excelentes oportunidades para melhorias nos índices sociais e econômicos da região, mediante a geração de emprego e renda, oferta de alimentos e preservação ambiental. Mundialmente, a palma é utilizada de diversas formas e várias finalidades. Os principais uso e potencialidades de aplicações da Palma estão resumidos na Tabela 11.

Tabela 11: Usos e aplicações potenciais da *Opuntia ficus-indica* (L.) Mil (Palma)

Usos/Aplicações	Partes da planta
Alimento humano	Frutos: frescos ou processados (passa, sucos, polpa, vinho, licor, compota, melaço, geleia, purê, adoçante líquido, etc.); Cladódios: jovens ou frescos (verdura), processado em salmoura ou em vinagre, pré-cozidos, congelados, geleia, doces; Sementes: óleo comestíveis.
Alimento animal	Cladódios, frutos e sementes: forragem em pastejo ou cocho.
Agrícola	Planta: proteção e conservação do solo, cerca-vivas, quebra-ventos, matéria orgânica.
Medicinal	Raízes: diurese; Cladódios: diarreia, diabete, anti-inflamatório; Fibras e mucilagens: obesidade; Flores: diurese e desintéria.
Energia	Cladódios: etanol, biogás e lenha; Frutos: etanol e biogás.
Cosmética	Cladódios: xampu, sabonete, cremes umectantes, adstringente, loções.
Outros	Planta: ornamental; Cladódios: adesivos, colas, pectinas, fibras, papel, antitranspirante, corante, mucilagem, Frutos: corante.

Fonte: NUNES, 2011

Na Bahia, especificamente em alguns municípios do Sertão baiano e Chapada Diamantina, o broto de palma entra na dieta alimentar da população, a ponto do broto estar sendo empacotado e comercializado nas feiras livres (GUEDES et al, 2002)

Solís e colaboradores (2010) compararam a atividade bio-hidrolítica da folha da palma com outros vegetais, na reação de hidrólise de acetato de 1-fenilpropanol usando vegetais desidratados por duas metodologias diferentes, 48 horas de reação e 25°C. Quando os pesquisadores usaram os vegetais secos por liofilização, a Palma apresentou o melhor resultado entre os vegetais analisados. A conversão do substrato foi de 27% e o e.e. de 72% para o produto (*R*)-**10a**, como mostra o

Esquema 13, Tabela 12, item 2. Quando os pesquisadores usaram vegetais secos por acetona, a folha da Palma apresentou 40% de conversão do substrato e 43% de e.e. para o produto (*R*)-**10a**, conforme Esquema 13, Tabela 13, item 1. Este resultado, embora inferior a maioria dos vegetais, ainda inclui a Palma como uma boa candidata estudos futuros a fim de melhorar o desempenho, segundo os autores.

Esquema 13: Bio-hidrólise de acetato de 1-fenilpropanol empregando plantas secas em pó

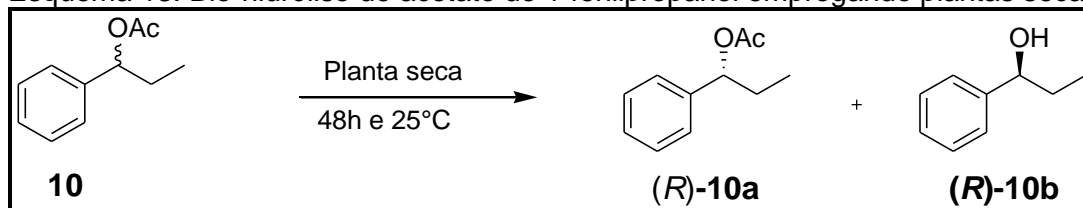


Tabela 12: Bio-hidrólise de acetato de 1-fenilpropanol utilizando plantas secas em pó por liofilização

Item	Nome comum	Nome científico	Conversão (%)	(%)e.e.
1	Pepino <sup>d</sup>	<i>Cucurbita pepo</i>	33	54/(S)-10b
2	Palma <sup>c</sup>	<i>Opuntia ficus-india</i>	27	72/(S)-10b
3	Ervilha <sup>d</sup>	<i>Pisum sativum</i>	25	0
4	Chuchu <sup>d</sup>	<i>Sechium edule</i>	12	46/(S)-10b
5	Abacaxi <sup>d</sup>	<i>Ananas comosus</i>	>5	nd
6	Tomate mexicano <sup>d</sup>	<i>Physalis philadelphica</i>	>5	nd

nd = não determinado; c=folhas; d=fruto; **Fonte:** Adaptado de Solís e colaboradores (2010).

Tabela 13: Hidrólise de acetato de 1-fenilpropanol utilizando pó de plantas secas, por acetona, como bicatalisador

Item	Nome comum	Nome científico	Conversão (%)	(%) e.e.
1	Palma <sup>c</sup>	<i>Opuntia ficus-india</i>	40	43/(S)-10b
2	Graviola <sup>c</sup>	<i>Anona muricata</i>	52	54/(S)-10b
3	Pitaia <sup>c</sup>	<i>Hylocereus undatus</i>	17	46/(S)-10b
4	Tomate mexicano <sup>d</sup>	<i>Fhysalis philadelphica</i>	36	65/(S)-10b
5	Pepino <sup>d</sup>	<i>Cucurbita pepo</i>	28	63/(S)-10b
6	Ervilha <sup>d</sup>	<i>Pisum sativum</i>	>5	nd
7	Cenoura <sup>e</sup>	<i>Daucus carota</i>	>5	nd
8	Graviola <sup>f</sup>	<i>Anona muricata</i>	60	53/(S)-10b
9	Cereja <sup>f</sup>	<i>Prunus avium</i>	50	74/(S)-10b
10	Sapotif <sup>f</sup>	<i>Pouteria sapota</i>	30	28/(S)-10b
11	Ameixa vermelha <sup>f</sup>	<i>Prunus domestica</i>	27	75/(S)-10b
12	Cereja da Virgínia <sup>f</sup>	<i>Prunus capuli</i>	26	66/(S)-10b
13	Amêndoa <sup>f</sup>	<i>Prunus dulcis</i>	23	35/(S)-10b
14	Pêssego <sup>f</sup>	<i>Prunus persica</i>	>5	nd
15	Damasco <sup>f</sup>	<i>Prunus armeniaca</i>	>5	nd

nd = não determinado devido baixa conversão; c = folha; d = fruto; e = raiz; f = semente **Fonte:** Adaptado de SOLÍS et al, 2010.

Ainda segundo Solís e colaboradores (2010), uma das mais importantes contribuições de sua pesquisa, deve-se a constatação de que as células das plantas não perdem suas atividades biocatalíticas quando submetidas a desidratação, podendo assim serem estocadas por longos períodos.



## 4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.1 MATERIAIS UTILIZADOS

O acetoacetato de etila (**4**) e o 3-oxoglutarato de dimetila (**11**) foram adquiridos da Aldrich e utilizado para síntese dos substratos empregados nos ensaios de biorredução. A partir do acetoacetato de etila foram sintetizados o acetoacetato de ciclo-hexila (**16**) e o acetoacetato de octila (**17**). Enquanto, a partir do 3-oxoglutarato de dimetila, sintetizou-se o 5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila (**15**).

As reações de redução químicas envolvendo a síntese de  $\delta$ -hidróxi- $\beta$ -ceto-ésteres foram realizadas em atmosfera de argônio, em balão previamente seco em estufa e dessecador. Todos os reagentes utilizados na síntese de  $\delta$ -hidróxi- $\beta$ -ceto-ésteres foram utilizados sem purificação prévia, exceto os álcoois usados nas transesterificações que foram destilados antes do uso.

Os solventes utilizados nas reações foram tratados previamente, exceto, o metanol (CH<sub>3</sub>OH), que foi usado grau HPLC. Tetraidrofurano (THF) e tolueno foram tratados sob sódio metálico e destilados imediatamente antes do uso. O diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) foi tratado sob hidreto de cálcio (CaH<sub>2</sub>) ou sob hidreto de alumínio e lítio (AlLiH<sub>4</sub>) e destilado antes do uso.

Todos os reagentes, agentes secantes, redutores, oxidantes e solventes foram adquiridos de fornecedores especializados com grau de pureza P.A..

O Inhambu (*D. Trifida*) empregado nos ensaios de biorredução foi adquirido do mesmo fornecedor na feira do São Raimundo, Politeama, Salvador, Bahia. Enquanto a Palma (*Opuntia ficus-indica* L. Mill) foi coletada no município de Jequié, Bahia, coordenadas (-13,875654; -40,100632).

### 4.2 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

#### 4.2.1 Cromatografia de camada delgada (CCD)

As análises de cromatografia de adsorção em camada delgada (CCD), utilizadas para monitoramento das reações, foram realizadas em placas de alumínio

de procedência Whatman®, 20 x 20cm de dimensões, recobertas por sílica gel de 250µm de espessura e cortadas em placas de 1 x 5cm antes do uso. As substâncias foram reveladas nas placas de CCD em solução de permanganato de potássio (KMnO<sub>4</sub>), seguido de aquecimento em estufa acima de 100°C, por aproximadamente dois minutos.

#### **4.2.2 Cromatografia em coluna por adsorção**

As separações através de cromatografia em colunas foram realizadas em sílica gel 60 de procedência da *Acros Organics* (0,060-0,200mm). Os eluentes foram preparados a partir de solventes oriundos de fornecedores especializados, todos de grau analítico. A quantidade de sílica utilizada na coluna variou entre 30 e 35g por grama de amostra a ser purificada.

#### **4.2.3 Cromatografia a gás com detector por ionização em chama e coluna quiral**

Para determinar o excesso enantiomérico e os valores de conversão das reações de biotransformação foi utilizado o cromatógrafo a gás, marca *Agilent Technologies*, modelo 7820A, com detector por ionização em chama e injetor automático. Os substratos e produtos de redução foram separados em coluna quiral cyclosil B 30% heptakis (2,3-di-O-metil-6-O-*terc*-butil-dimetilsilício) β-ciclodextrina com dimensões de comprimento que variou de 30m a 28,5m e 0,25mm de diâmetro interno, 0,25µm de espessura de filme e limites de temperatura entre 10 a 250°C.

A temperatura do detector e do injetor foram mantidos em 220°C., com o injetor em modo *split* 1/10. A vazão do gás de arraste (N<sub>2</sub>) em 1,18 mL/min.

Os métodos de CG usados, especificando as variáveis de temperatura e tempo na coluna, estão relacionados aos respectivos substratos e produtos analisados (APÊNDICE A).

### **4.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (IV)**

As análises por espectroscopia no IV foram realizadas no Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, no espectrômetro *Shimadzu* com transformada de *Fourier Affinity-1*, modelo 01645. As amostras líquidas, que correspondem às amostras de todos os produtos reacionais, exceto as amostras do oxidante, ácido iodoxibenzoico (IBX), foram realizadas na forma de filmes finos puros entre um par de janela de cloreto de sódio (NaCl), previamente polidas e limpas com clorofórmio. As amostras de IBX foram analisadas em pastilhas prensadas de brometo de potássio (KBr).

#### **4.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)**

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foram realizados no Laboratório Baiano de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal da Bahia (LABAREM-UFBA), utilizando-se Espectrômetro Varian Inova 500 de 11,5 Tesla, operando na frequência de 500 MHz para Hidrogênio e 125 MHz para Carbono. O solvente utilizado para registro dos espectros foi clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ).

#### **4.5 ROTAÇÃO ESPECÍFICA**

As rotações específicas das amostras foram medidas em um polarímetro digital automático de marca *Perkin Elmer*, modelo 343, pertencente a Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia. As medidas foram feitas no comprimento de onda da radiação do sódio ( $D=589\text{nm}$ ), a uma temperatura de  $20^\circ\text{C}$  e usando clorofórmio como solvente.

#### **4.6 DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE CONVERSÃO (C), EXCESSOS ENATIOMÉRICOS (e.e.) E CONFIGURAÇÕES ABSOLUTAS DOS ÁLCOOIS (R/S)**

Os valores de conversão e e.e. foram calculados automaticamente pelo CG. Os valores conversão foi determinada comparando as áreas do pico remanescente do reagente e dos álcoois obtidos no fim da reação. E os dados de e.e. foram

determinados pela diferença percentual das áreas dos picos dos álcoois enantioméricos formados a partir de cada substrato (ANEXO A).

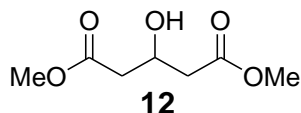
As configurações absolutas dos álcoois (*R/S*)-3-hidroxiubanoato de etila (*R-4a* e *S-4a*) e (*R/S*)-5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-hidroxipentanoato de metila (*R-15a* e *S-15a*) foram determinadas comparando a rotação específica ( $[\alpha]_D$ ) do resultado obtido, em diferentes tempos de reação em horas,  $t(h)$ , com o  $[\alpha]_D$  do mesmo álcool e nas mesmas condições encontradas na literatura (apêndice B). Quando o sinal da  $[\alpha]_D$  do álcool obtido e o sinal do mesmo álcool relatado na literatura, coincidem, indica presença majoritária do mesmo enantiômero. E quando os sinais da  $[\alpha]_D$  do álcool obtido e do mesmo álcool na literatura são diferentes, significa presença majoritária do enantiômero oposto ao registrado na literatura (SOUZA, 2013).

Como não foram encontrados, na literatura, dados de  $[\alpha]_D$  dos álcoois (*R/S*)-3-hidroxiubanoato de ciclo-hexila (*R-16a* e *S-16a*) e (*R/S*)-3-hidroxiubanoato de octila (*R-17a* e *S-17a*) e a coluna quiral utilizada não foi eficiente na separação dos mesmos (item 5.2.2, Figura 41, 42, 43 e 44), estes foram transesterificados, conforme item 4.7.9, para (*R/S*)-3-hidroxiubanoato de etila (*R-4a* e *S-4a*), que o dado de  $[\alpha]_D$  foi encontrado na literatura (Apêndice B)) e a separação na coluna quiral foi melhor resolvida. Como a reação de transesterificação não altera a configuração do carbono assimétrico das substâncias, pode-se afirmar que, a configuração do enantiômero em excesso no produto transesterificado é mesma do produto antes da transesterificação. Assim, as configurações absolutas dos álcoois obtidos a partir de **16** e **17** foram determinadas, indiretamente, comparando os tempos de retenções ( $t_{RS}$ ) dos enantiômeros (*R-4a* e *S-4a*) obtidos diretamente do **4** com os  $t_{RS}$  dos enantiômeros obtidos do **16** (*R-16a*, *S-16a*) e do **17** (*R-17a* e *S-17a*), após a transesterificação.

#### 4.7 SÍNTESE do 5-(*terc*-BUTILDIMETILSILILÓXI)-3-OXOPENTANOATO DE METILA

A síntese do 5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila foi realizada a partir de 3-oxoglutarato de dimetila (**11**) e seguiu a rota sintética que corresponde a sequência das substâncias listadas abaixo:

#### 4.7.1 3-hidroxi-pentanoato de dimetila (12)



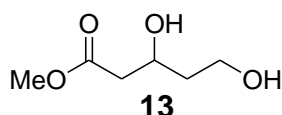
Utilizando-se a metodologia empregada por Victor et al. (2010), para uma solução de 1,0g (5,79mmol) de **11** em 15mL de metanol a 0°C foram adicionados 65,7mg (1,74mmol) de NaBH<sub>4</sub>. A reação foi realizada a temperatura ambiente e após 24 horas foi terminada com adição de ácido cítrico sólido até pH chegar entre 5 e 6. À mistura reacional, adicionou-se 1g de sílica gel e o solvente foi destilado. O resíduo foi purificado por cromatografia de coluna com sílica gel (eluição com acetato de etila: hexano, 1:1), obtendo-se **12**, como um óleo incolor, em 88% de rendimento.

**RMN <sup>1</sup>H** (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 4,46 (dq, *J* = 6,5Hz, *J* = 4,1Hz, 1 H); 3,71 (s, 6 H); 3,40 (d, *J* = 4,1Hz, 1 H); 2,56 (d, *J* = 6,6Hz, 4 H)

**RMN <sup>13</sup>C** (125MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 172,1; 64,7; 51,8; 40,4

**IV** cm<sup>-1</sup> 3500; 2950; 1737; 1440; 1374; 1276; 1286; 1157; 1107; 1045; 992; 872

#### 4.7.2 3,5-di-hidroxi-pentanoato de metila (13)



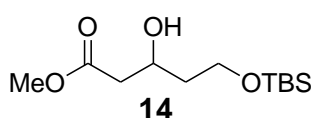
Utilizando-se a metodologia empregada por Victor et al. (2010), para uma solução de 200,1mg (1,14mmol) de **12** em 3mL de THF, sob atmosfera de argônio e temperatura ambiente, foram adicionados 216μL (2,28mmol) de BH<sub>3</sub>.Me<sub>2</sub>S gota a gota. Após 48 horas, a mistura reacional foi diluída com 3mL de metanol com intensa formação de bolhas e misturada por uma hora. O solvente foi destilado e o resíduo purificado por coluna cromatográfica em sílica gel (eluição AcOEt:hexano 4:1 e metanol:AcOEt 1:19), obtendo-se **13**, um óleo incolor em 78% de rendimento.

**RMN <sup>1</sup>H** (500Mz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 4,27 (dquin, *J* = 7,2 e 4,2Hz, 1H); 3,89 – 3,79 (m, 2H); 3,71 (s, 3H); 3,70 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H); 3,59 (d, *J* = 3,0Hz, 1H); 2,55 – 2,50 (m, 2H); 1,79 – 1,67 (m, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C** (125MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm: 173,1; 67,8; 60,9; 51,8; 41,3; 37,9

**IV** cm<sup>-1</sup>: 3460; 2956; 1435; 1738; 1433; 1353; 1286; 1170; 1107; 1004; 885

#### 4.7.3 5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-hidroxi-pentanoato de metila (**14**)



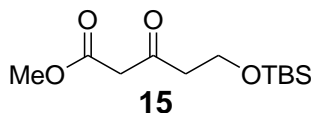
Utilizando-se a metodologia empregada por Green et al., (1999), para uma solução de 1g; (8,46mmol) de **13** em 12mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, a temperatura ambiente, foram adicionados 1,3mL (9,31mmol) de trietilamina, DMAP (10mol%) e 1,40g; (9,31mmol) de TBSCl. A reação foi agitada à temperatura ambiente durante 1 hora e diluída em 50mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A fase orgânica foi lavada com 20mL de NH<sub>4</sub>Cl saturada, 20mL de NaCl saturada e seca sobre MgSO<sub>4</sub>. O solvente foi evaporado à pressão reduzida e o produto bruto purificado por coluna cromatográfica em sílica gel (gel (eluição 2% AcOEt:hexano) e adição de uma gota de trietilamina para cada grama de sílica gel, fornecendo **14**, um óleo incolor com odor característico, em 96% de rendimento.

**RMN <sup>1</sup>H** (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 4,26 (dquin, *J* = 3,9; 7,7 Hz, 1 H); 3,91 – 3,78 (m, 2 H); 3,71 (s, 3 H); 3,61 (d, *J* = 2,9 Hz, 1 H); 2,58 – 2,46 (m, 2 H); 1,79 – 1,67 (m, 2 H); 0,90 (s, 9 H); 0,08 (s, 6 H)

**RMN <sup>13</sup>C** (125MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 172,4; 67,5; 61,3; 51,4; 41,4; 37,9; 25,6; 17,9; -0,3; -5,8.

**IV** cm<sup>-1</sup>: 3500; 2954; 2857; 1736; 1433; 1249; 1160; 1091; 839

#### 4.7.4 5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila (**15**)



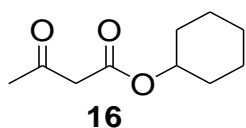
Utilizando-se a metodologia empregada por More et al. (2002), para uma solução de 0,15g (1,00mmol) de **14** em 7mL de AcOEt, a temperatura ambiente, foram adicionados 0,84g (3,00mmol) de IBX. A suspensão resultante foi imersa em um banho de óleo a 80°C e misturado vigorosamente com saída para atmosfera. Após 3 horas a mistura foi esfriada a temperatura ambiente e filtrado através de funil de vidro sinterizado. O resíduo sólido foi lavado com 3 x 2mL de AcOEt e o filtrado foi concentrado. O produto bruto purificado por coluna cromatográfica filtrante em sílica gel (eluição AcOEt:hexano 1:5) e adição de uma gota de trietilamina para cada grama de sílica gel, fornecendo **15**, um óleo incolor com odor característico, em 86% de rendimento.

**RMN <sup>1</sup>H** (500MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  ppm: 3,90 (t,  $J = 6,2$  Hz, 2 H); 3,74 (s, 3 H); 3,51 (s, 2 H); 2,73 (t,  $J = 6,2$  Hz, 2 H); 0,88 (s, 9 H); 0,05 (s, 6 H).

**RMN <sup>13</sup>C** (500MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  ppm: 201,6; 167,3; 77,0; 58,4; 52,0; 49,6; 25,6; 17,9; -0,3; -5,8.

**IV**  $cm^{-1}$ : 2956, 2855, 1750; 1720, 1440, 125, 1092, 833, 796

#### 4.7.5 Acetoacetato de ciclo-hexila (**16**)



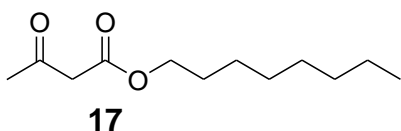
Utilizando-se a metodologia empregada por Koval et al (2008), uma mistura de um equivalente de ciclo-hexanol, recém destilado, um equivalente de acetoacetato de etila (**4**) e tolueno seco foi refluxada sob atmosfera inerte, em sistema soxhlet, contendo peneira molecular para remover o etanol formado. A reação foi monitorada por CCD. O solvente evaporado em rota e o resíduo purificado em coluna cromatográfica filtrante em sílica gel (eluição AcOEt:hexano 1:6) e adição de uma gota de trietilamina para cada grama de sílica gel, fornecendo **16**, um óleo incolor, em 77% de rendimento.

**RMN <sup>1</sup>H (500MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 4,83 (tt,  $J$  = 3,6; 9,1 Hz, 1H); 3,42 (s, 2 H); 2,27 (s, 3 H); 1,91 – 1,82 (m, 2 H); 1,73 (dd,  $J$  = 3,6, 9,1 Hz, 2 H); 1,50 – 1,18 (m, 6 H).

**RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm: 200,5; 166,3; 89,9; 77,0; 73,6; 50,3; 31,2; 29,8; 29,4; 25,0; 23,4; 20,9.

**IV cm<sup>-1</sup>**: 3465, 2937, 2864, 1748, 1719, 1649, 1459, 1373, 1239, 1160, 1047, 803

#### 4.7.6 Acetoacetato de octila (17)



Utilizando-se a metodologia empregada por Koval et al (2008), uma mistura de um equivalente de octanol, recém destilado, um equivalente de acetoacetato de etila (4) e tolueno seco foi refluxada sob atmosfera inerte, em sistema soxhlet, contendo peneira molecular para remover o metanol formado. A reação foi monitorada por CCD. O solvente evaporado em rota e o resíduo purificado em coluna cromatográfica em sílica gel (eluição AcOEt:hexano 3:7), fornecendo **17**, um óleo incolor, em 87% de rendimento.

**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm: 4,14 (t,  $J$  = 6,7 Hz, 2H); 3,45 (s, 2H); 2,27 (s, 3H); 1,64 (quin,  $J$  = 7,1 Hz, 2H), 1,41 – 1,20 (m, 10H), 0,88 (t,  $J$  = 6,7 Hz, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C (125MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  ppm: 200,5; 167,2; 89,7; 65,6; 64,0; 50,1; 31,7; 30,1; 29,1; 28,4; 22,6; 14,0.

**IV cm<sup>-1</sup>**: 3462; 2934; 2848; 1747; 1720; 1450; 1463; 1369; 1309; 1237; 1155; 1043; 723

#### 4.7.7 Redução química (produção de racemato)



Para caracterização dos produtos de biorredução derivado do substrato **15**, no CG quiral, o racemato **14** foi obtido a partir das metodologias descritas nos itens **4.6.1** a **4.6.3**. Para caracterização produtos de biorredução derivados dos substratos **4**, **16** e **17**, estes foram reduzidos com borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) seguindo a seguinte metodologia: Adicionou-se 1g de substrato a 10mL de metanol. Lentamente, sob agitação e em banho de gelo, 0,3g de  $\text{NaBH}_4$  foi acrescentado à mistura. Após 1,5h, a reação foi interrompida com adição de ácido clorídrico a 10%, até que a solução atingisse pH 5. O produto foi extraído com diclorometano. A fase orgânica sofreu secagem com sulfato de sódio anidro, filtração e evaporação do solvente em evaporador rotatório (RAMOS, 2009).

#### **4.7.8 Biorredução empregando *D. trifida* (inhambu) e *O. fícus-indica* (palma)**

No presente estudo, priorizou-se utilizar plantas que ainda não haviam relatos de uso em processo de biorredução e que apresentem potencial para o desenvolvimento econômico regional, através da síntese de produtos químicos de alto valor agregado.

Por isso, escolheu-se *D. trifida* (Inhambu) e *O. fícus-indica* (Palma). A primeira planta não se encontrou na literatura, utilização em qualquer processo de biotransformação. E a segunda foi estudada, apenas, na bio-hidrólise de acetado de 1-fenilpropanol (SOLÍS et al., 2010).

Adaptou-se a metodologia utilizada por Machado et al., (2008). As túberas de Inhambu (Figura 7a) e as folhas de Palma (Figura 7b) foram colocadas em solução de hipoclorito de sódio 5% (10 gotas/L), lavadas com água destilada e em seguida cortadas em pedaços de, aproximadamente,  $1\text{cm}^3$ . Aproximadamente, 10g de biomassa foram adicionados a erlenmeyer de 250mL contendo 100mg de substrato e 70mL de água destilada. A mistura foi posta no incubadora à temperatura de 25 e 30°C e rotação de 180 rpm em diferentes tempos de reação. Depois a mistura foi filtrada a pressão reduzida, utilizando uma camada de Celite no funil de büchner. O filtrado foi extraído com 3 x 30mL de acetato de etila, seco com sulfato de sódio anidro e evaporado em evaporador rotatório. As reduções foram confirmadas por CCD, CG em coluna quiral e rotação específica.

Figura 7: Imagem dos vegetais utilizados nas reações de biorredução



a) *Dioscorea trifida* L. (Inhambu)

b) *Opuntia ficus-indica* L. (Palma)

#### 4.7.9 Transesterificação dos produtos de biorredução

Os álcoois, (*R/S*)-3-hidróxi butanoato de ciclo-hexila (*R-16a* e *S-16a*) e (*R/S*)-3-hidróxi butanoato de octila (*R-17a* e *S-17a*), obtidos por biorredução a partir de **16** e **17**, foram transesterificados para (*R/S*)-3-hidroxibutanoato de etila (*R-4a* e *S-4a*), seguindo a seguinte metodologia: Adicionou-se 10mg de álcool a ser transesterificado e 1mg de ácido *p*-tolueno sulfônico a 1mL de etanol. A mistura foi posta em refluxo, sob agitação, durante 12 horas. Em seguida a mistura foi injetada no CG para confirmação e determinação a configuração absoluta dos enantiômeros formados (KOVAL et al., 2008).

#### 4.7.10 Espectros de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e espectros no IV dos substratos preparados

Figura 8: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 3-hidroxipentanoato de dimetila (12)

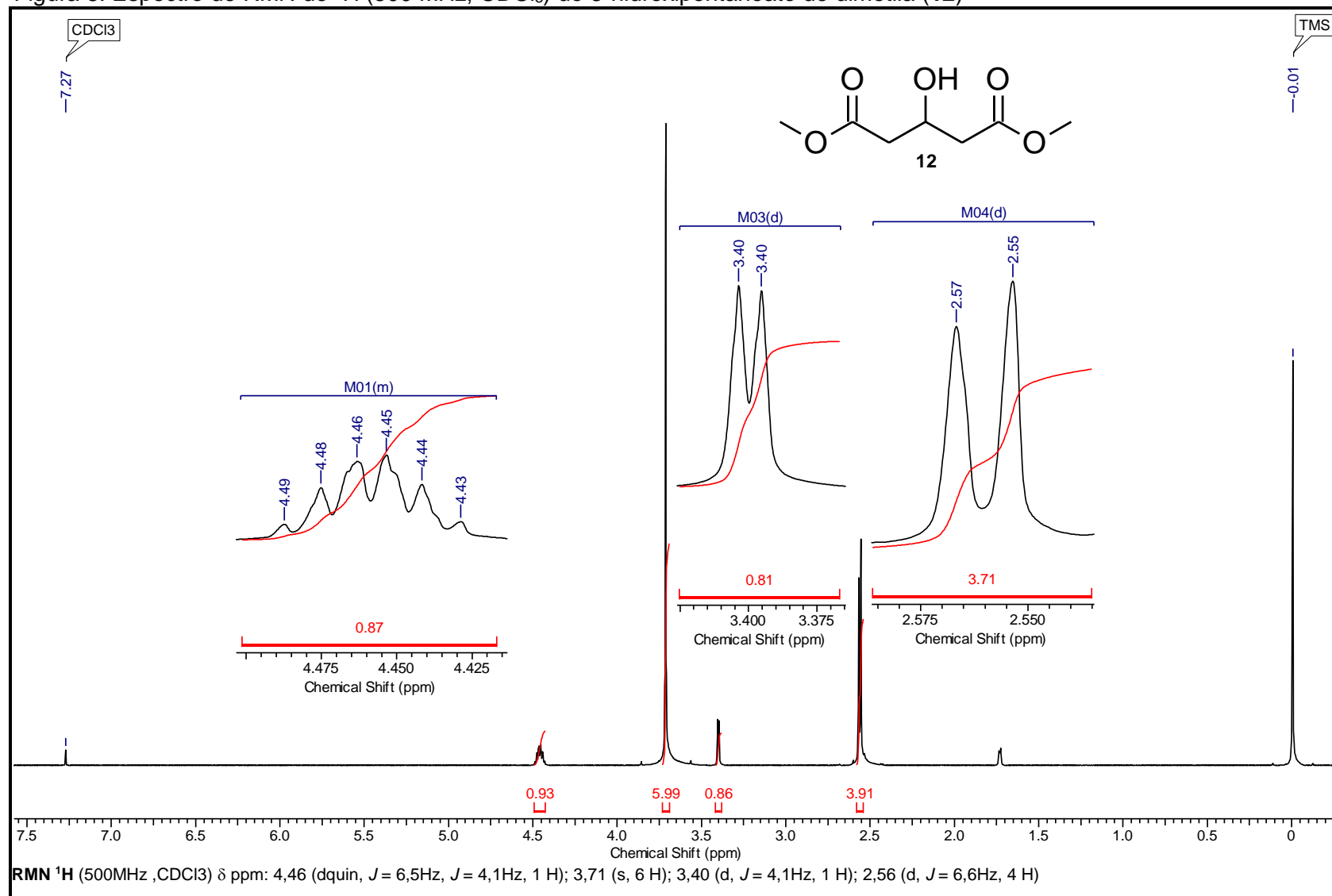


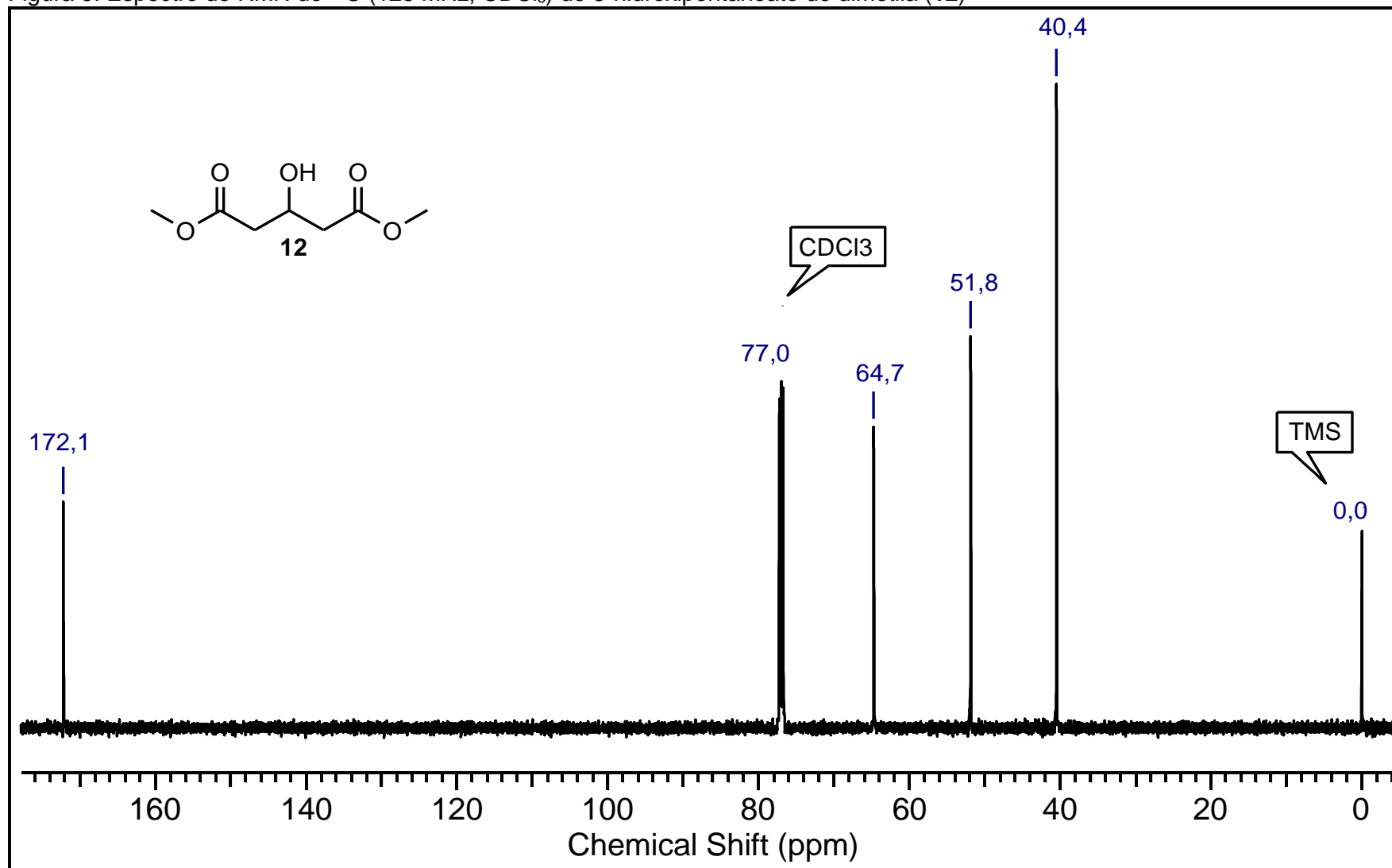
Figura 9: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 3-hidroxipentanoato de dimetila (**12**)

Figura 10: Espectro no Infravermelho de 3-hidroxipentanoato do dimetila (12)

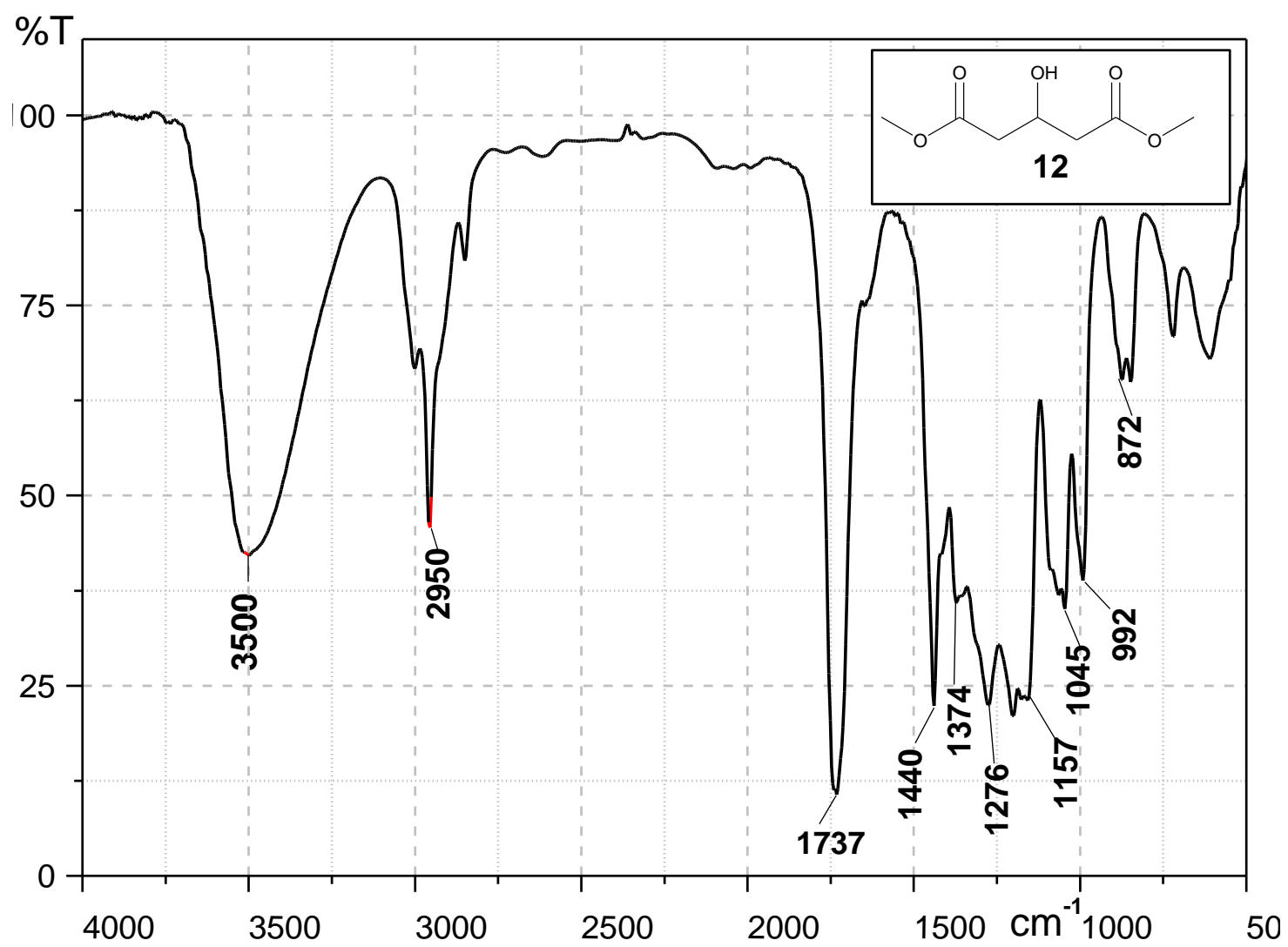


Figura 11: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 3,5-di-hidroxipentanoato de metila (**13**)

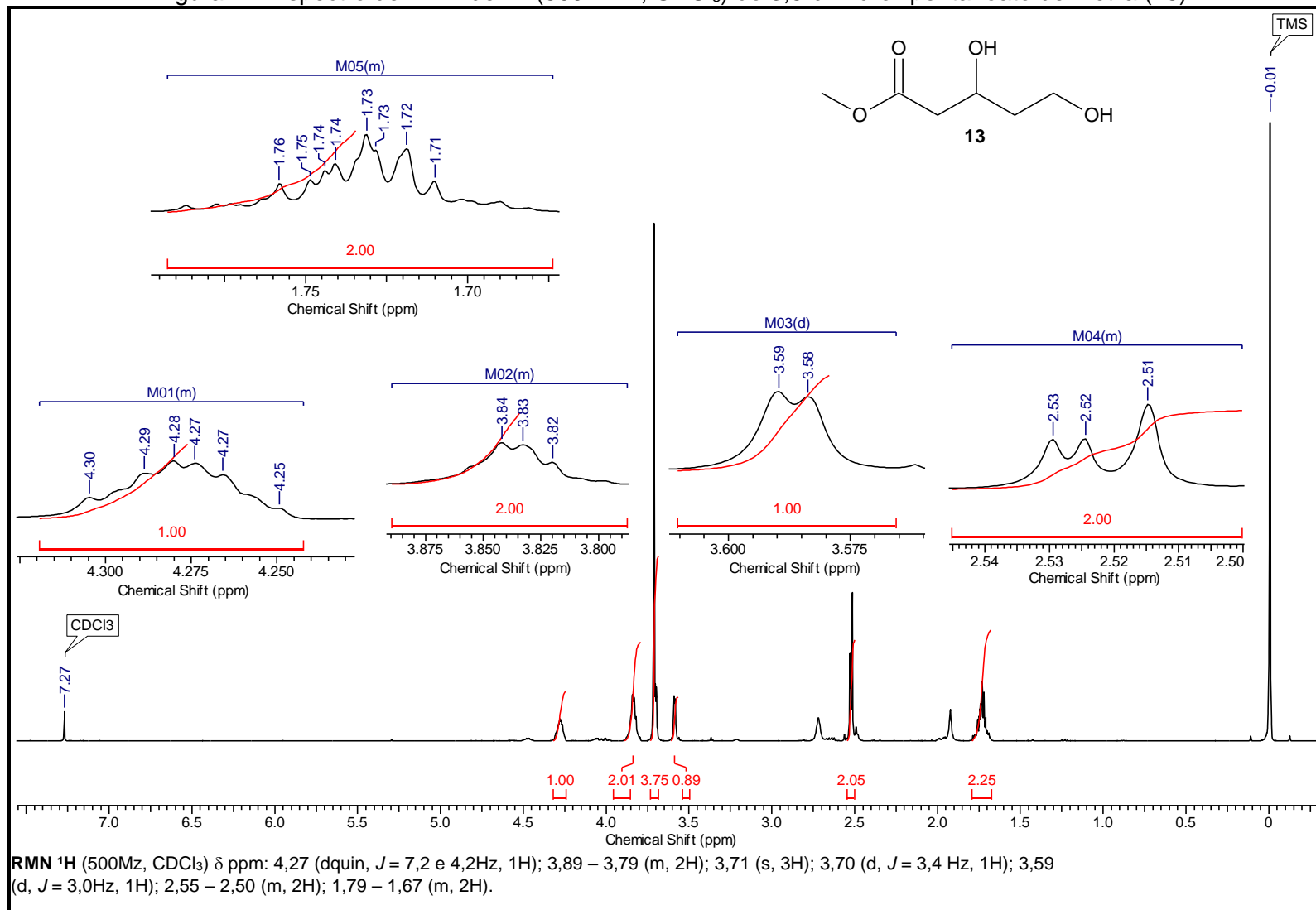


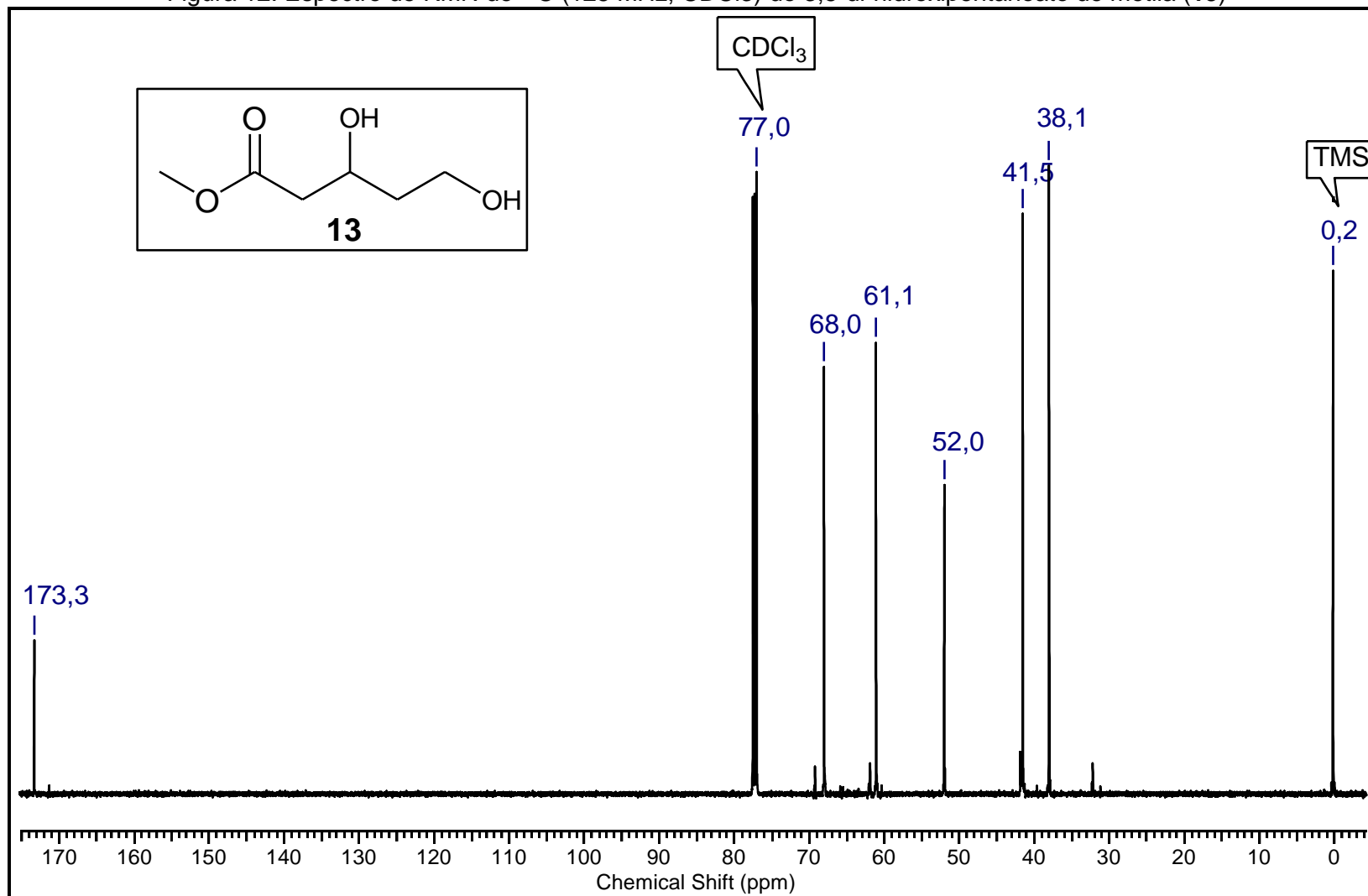
Figura 12: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 3,5-di-hidroxipentanoato de metila (**13**)



Figura 13: Espectro no infravermelho do 3,5-di-hidroxipentanoato de metila (13)

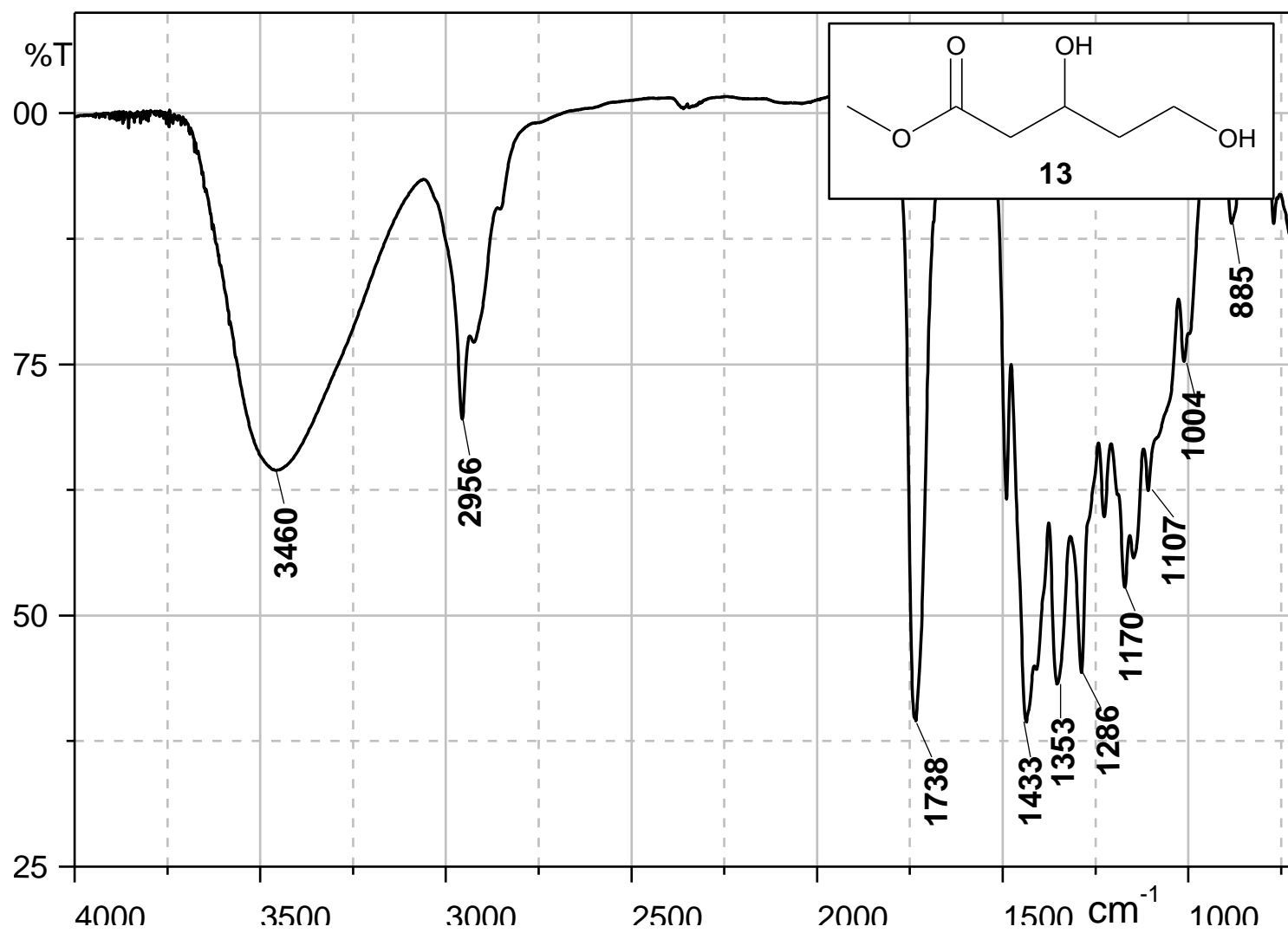


Figura 14: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 5-(*terc*-butildimetilsilóxi)-3-hidroxipentanoato de metila (**14**)

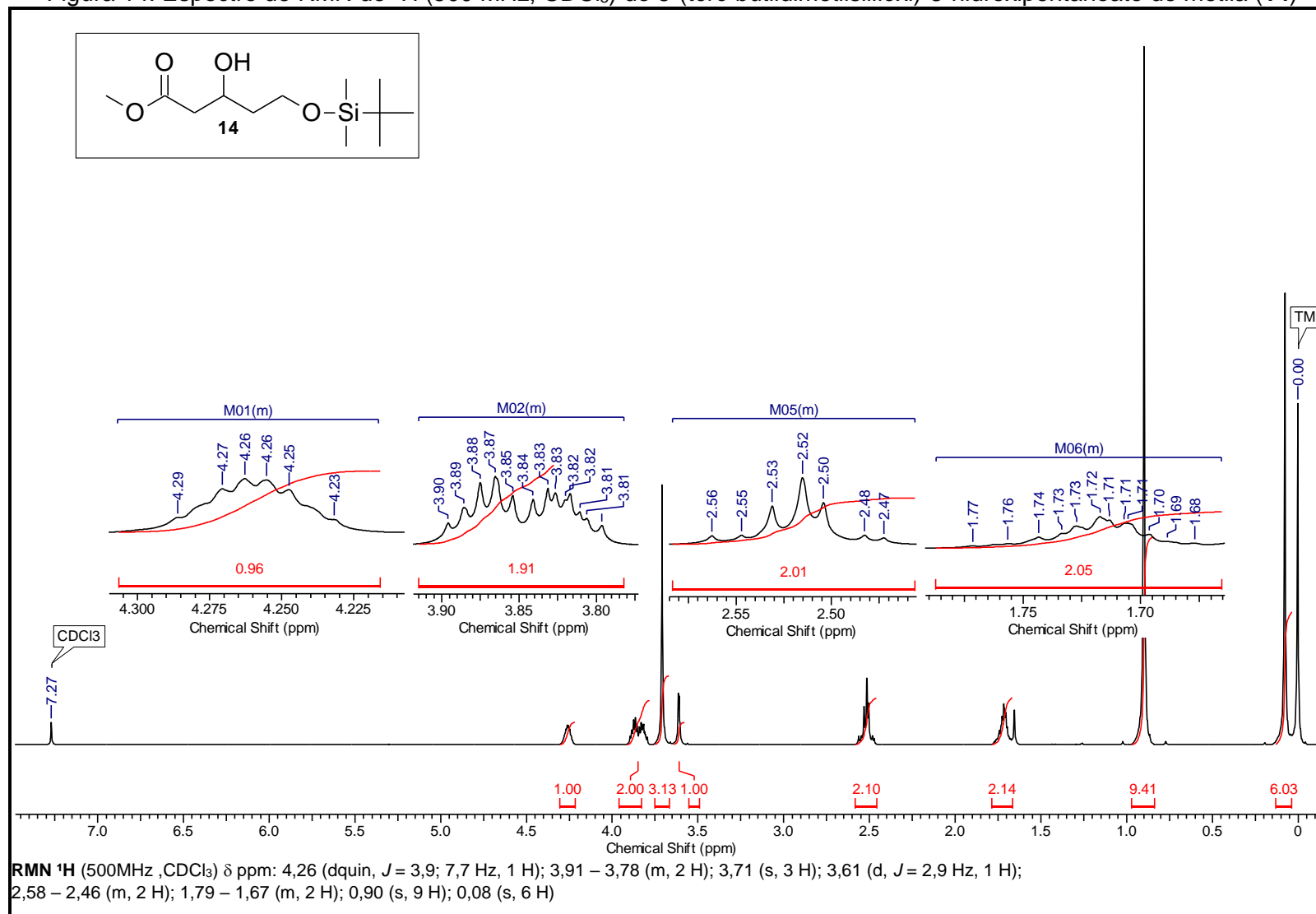


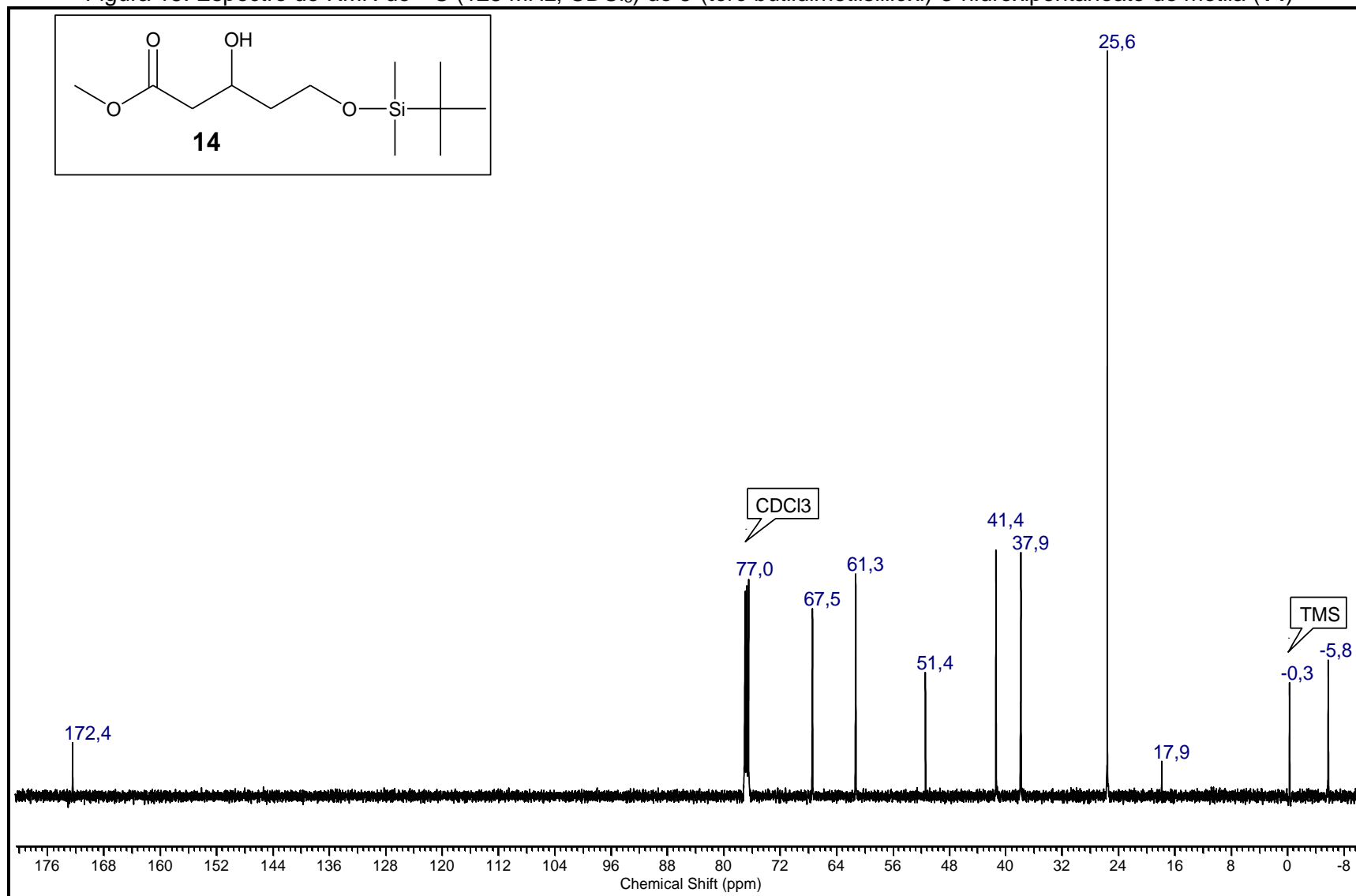
Figura 15: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 5-(*tert*-butildimetilsililóxi)-3-hidroxipentanoato de metila (**14**)

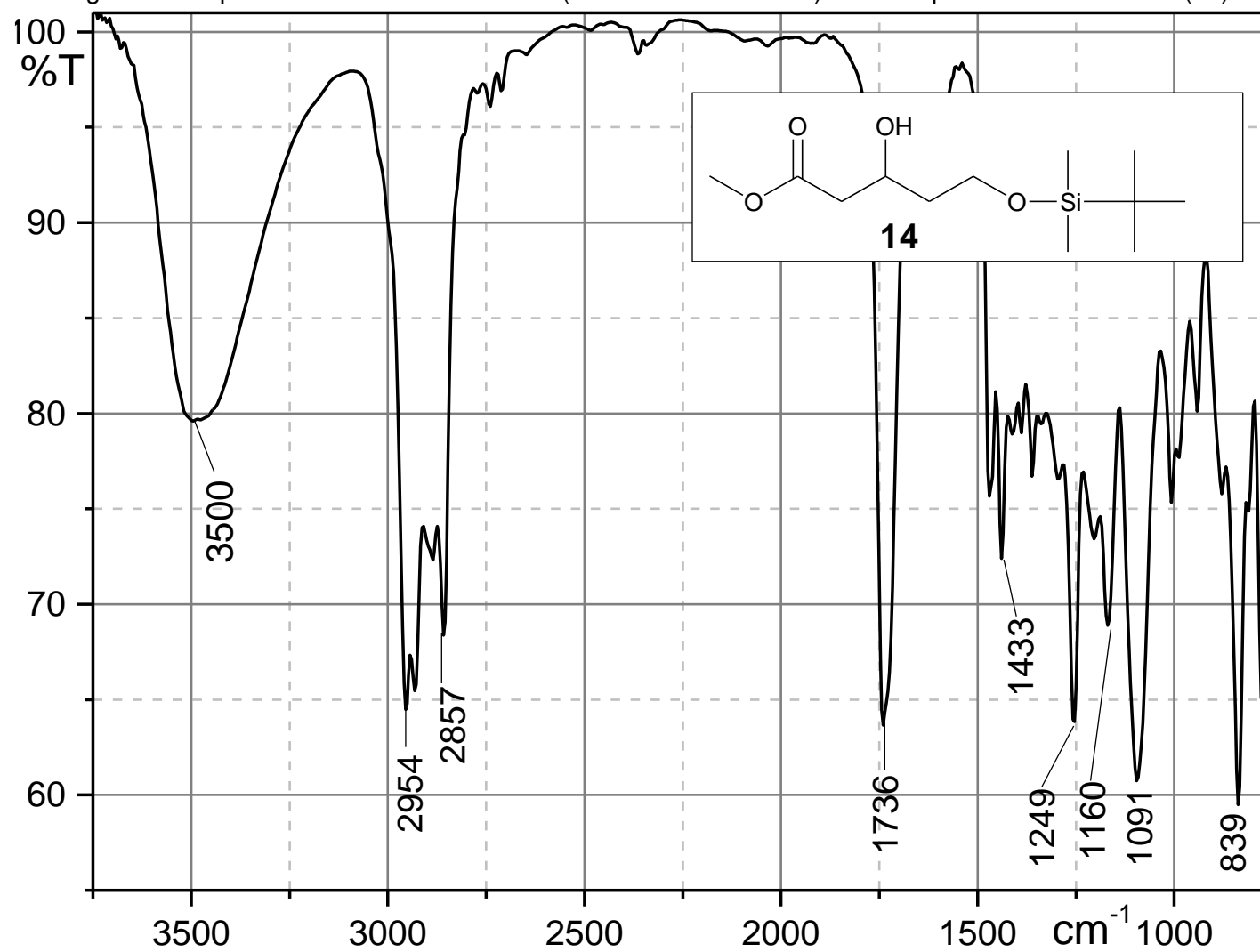
Figura 16: Espectro no infravermelho do 5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-hidroxipentanoato de metila (**14**)

Figura 17: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 5-(*tert*-butildimetilsilóxi)-3-oxopentanoato de metila (**15**)

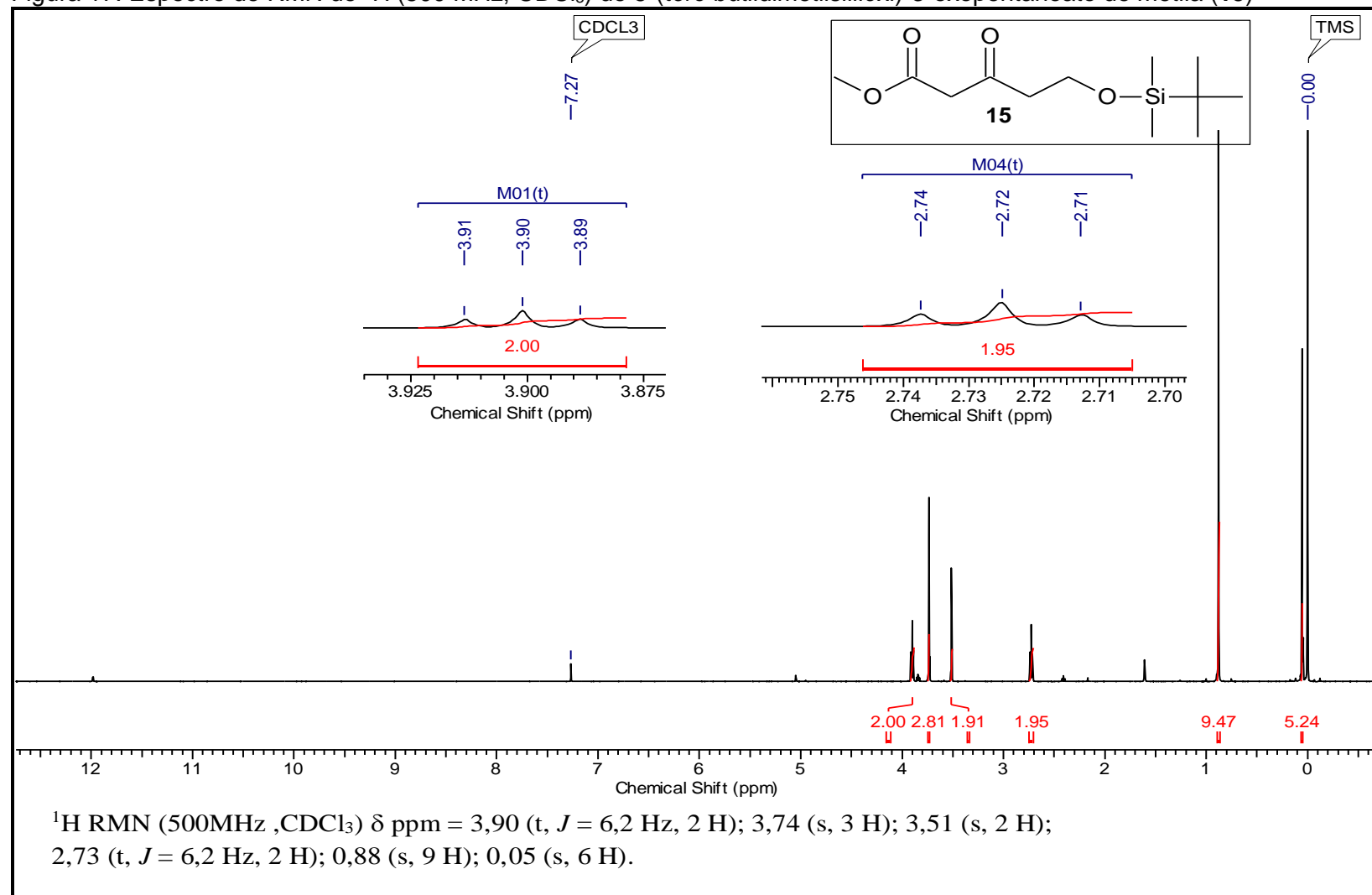


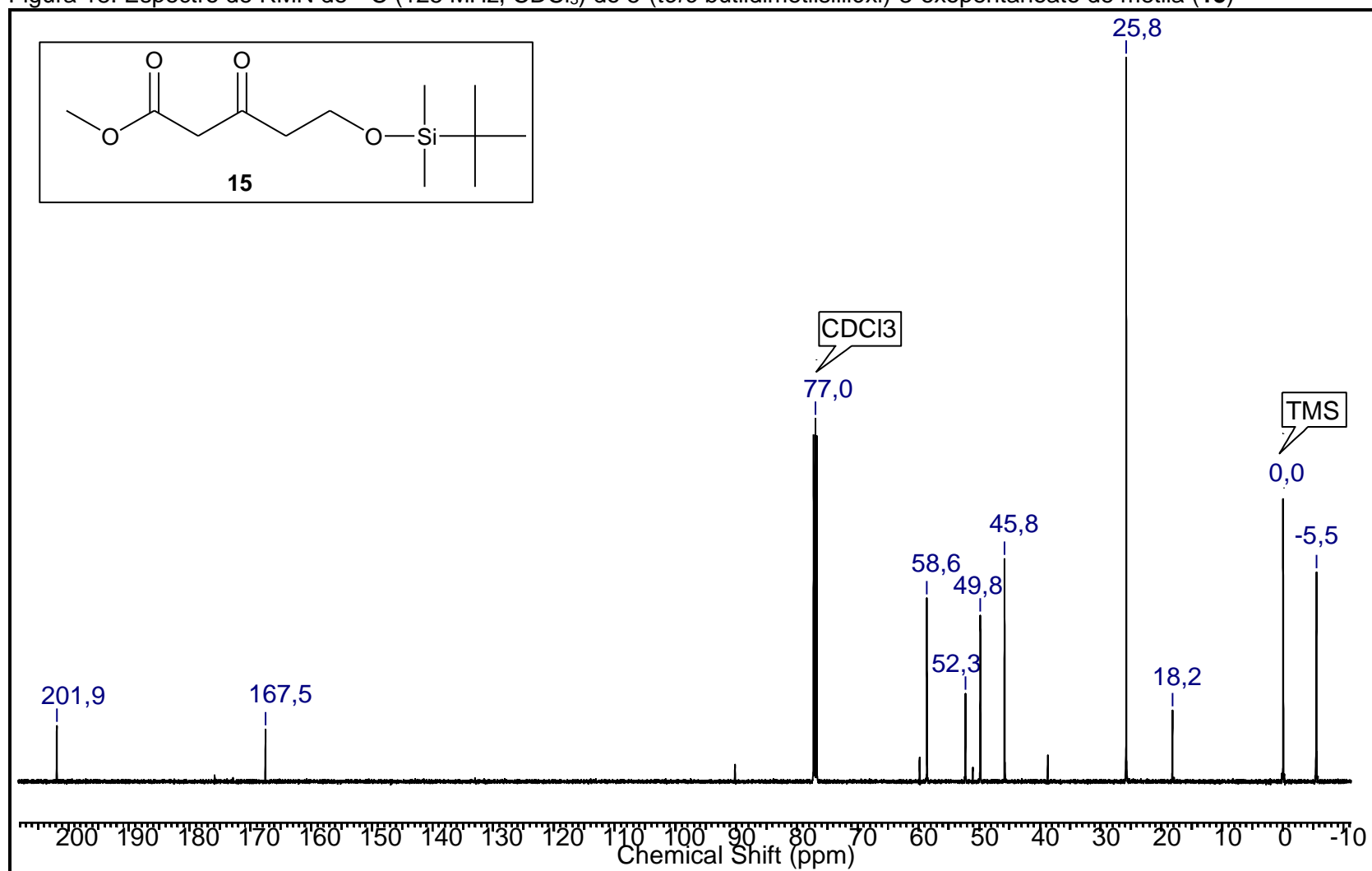
Figura 18: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila (**15**)

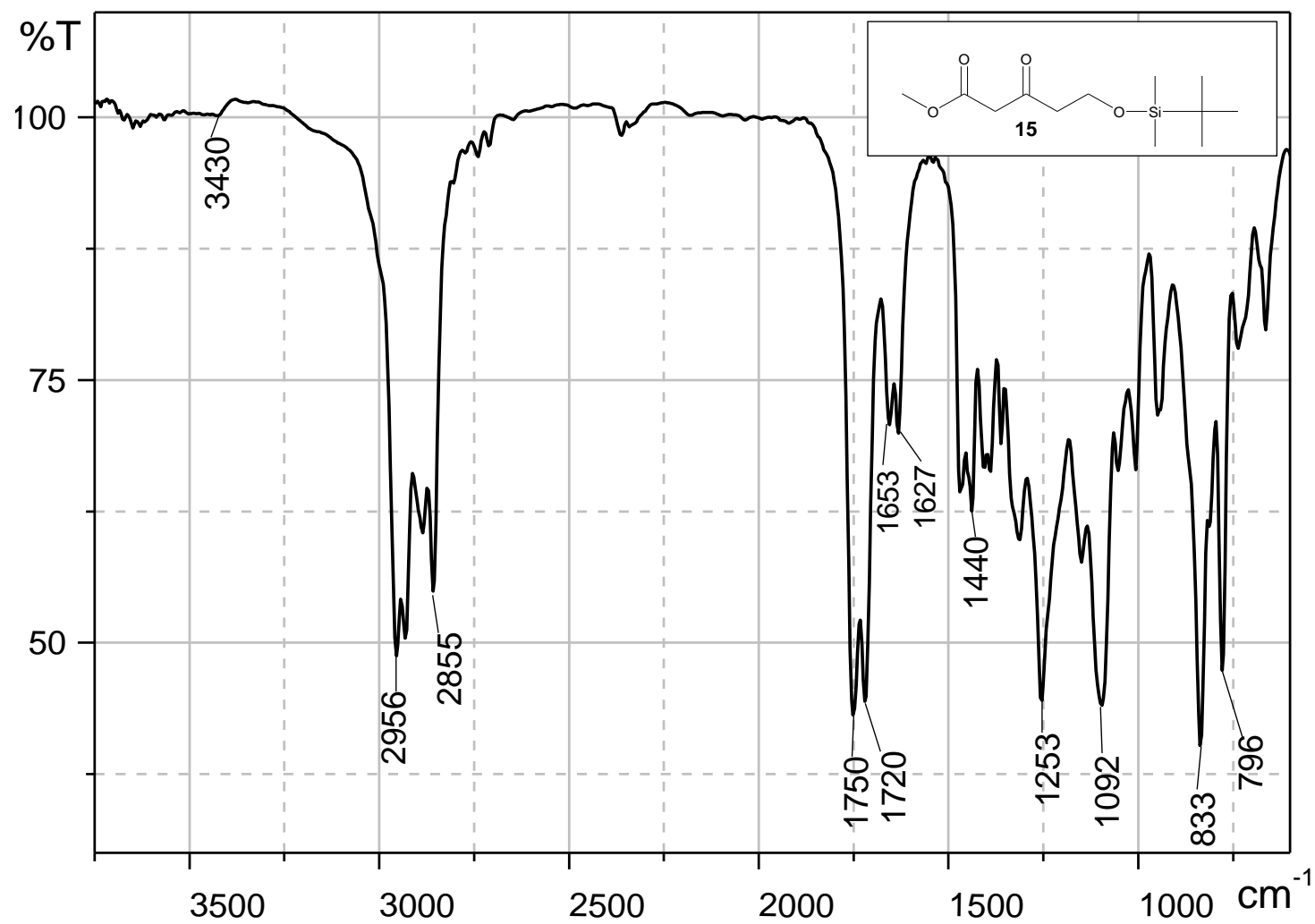
Figura 19: Espectro no infravermelho do 5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila (**15**)

Figura 20: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do acetoacetato de ciclo-hexila (**16**)

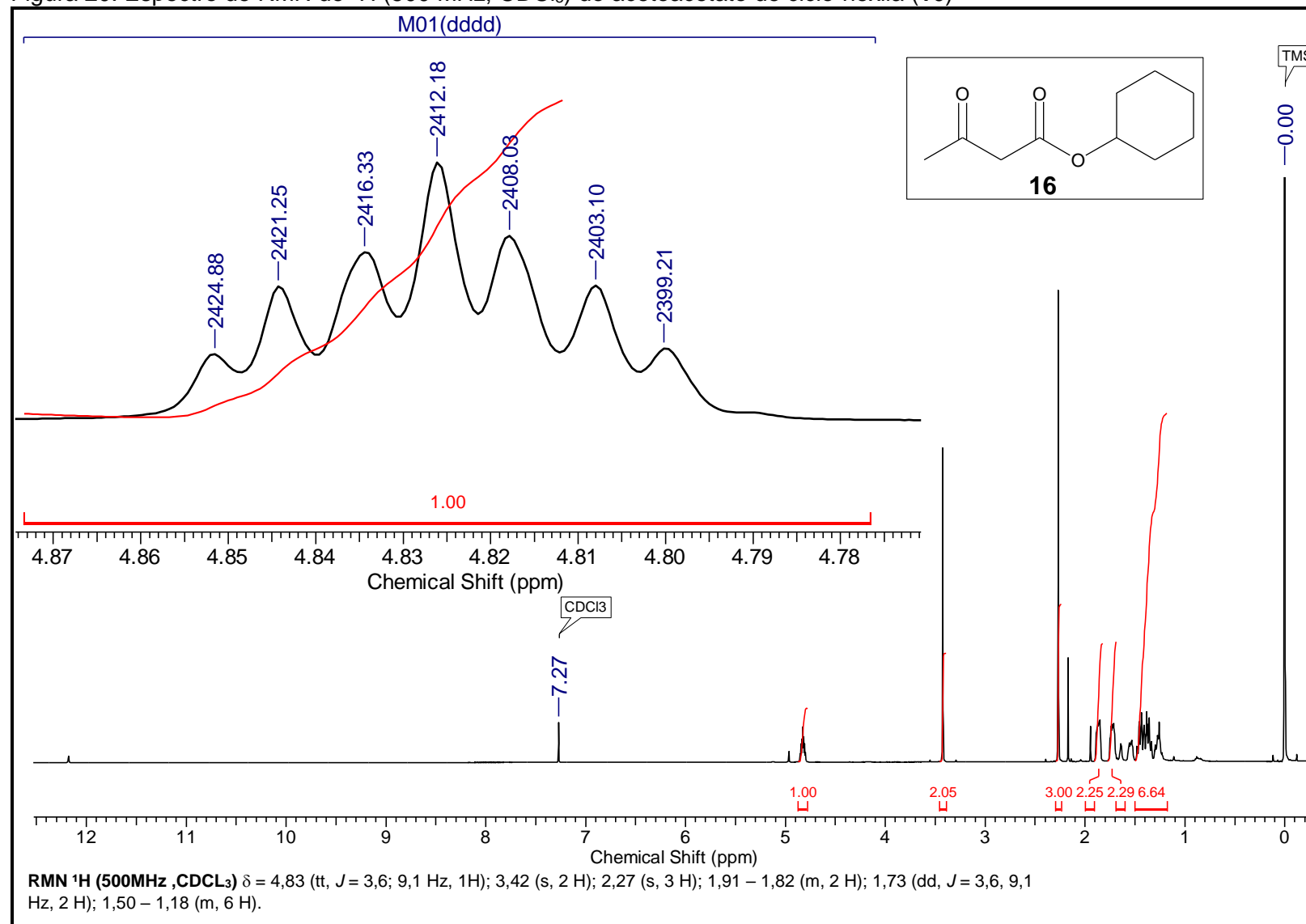




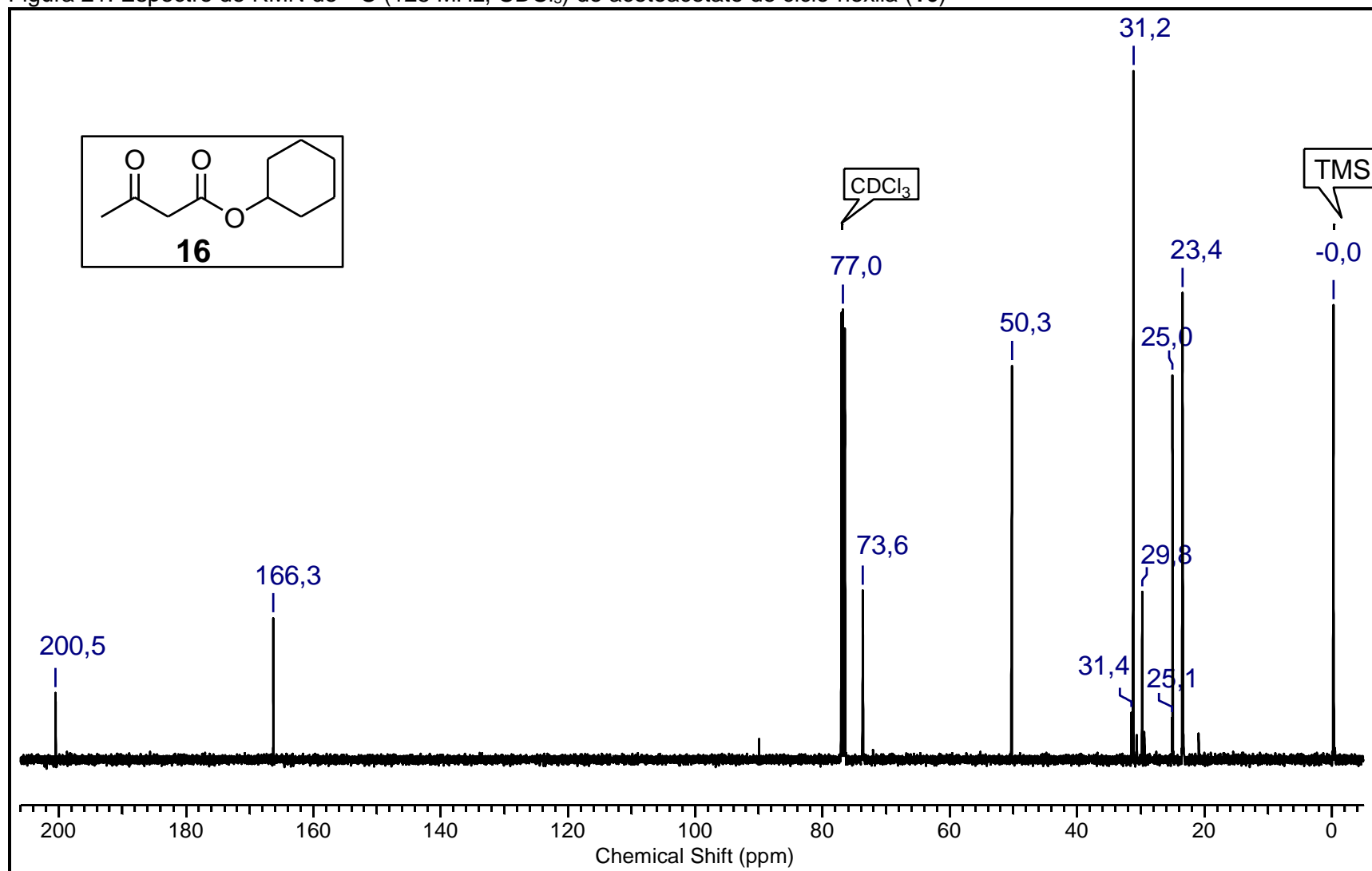
Figura 21: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do acetoacetato de ciclo-hexila (**16**)

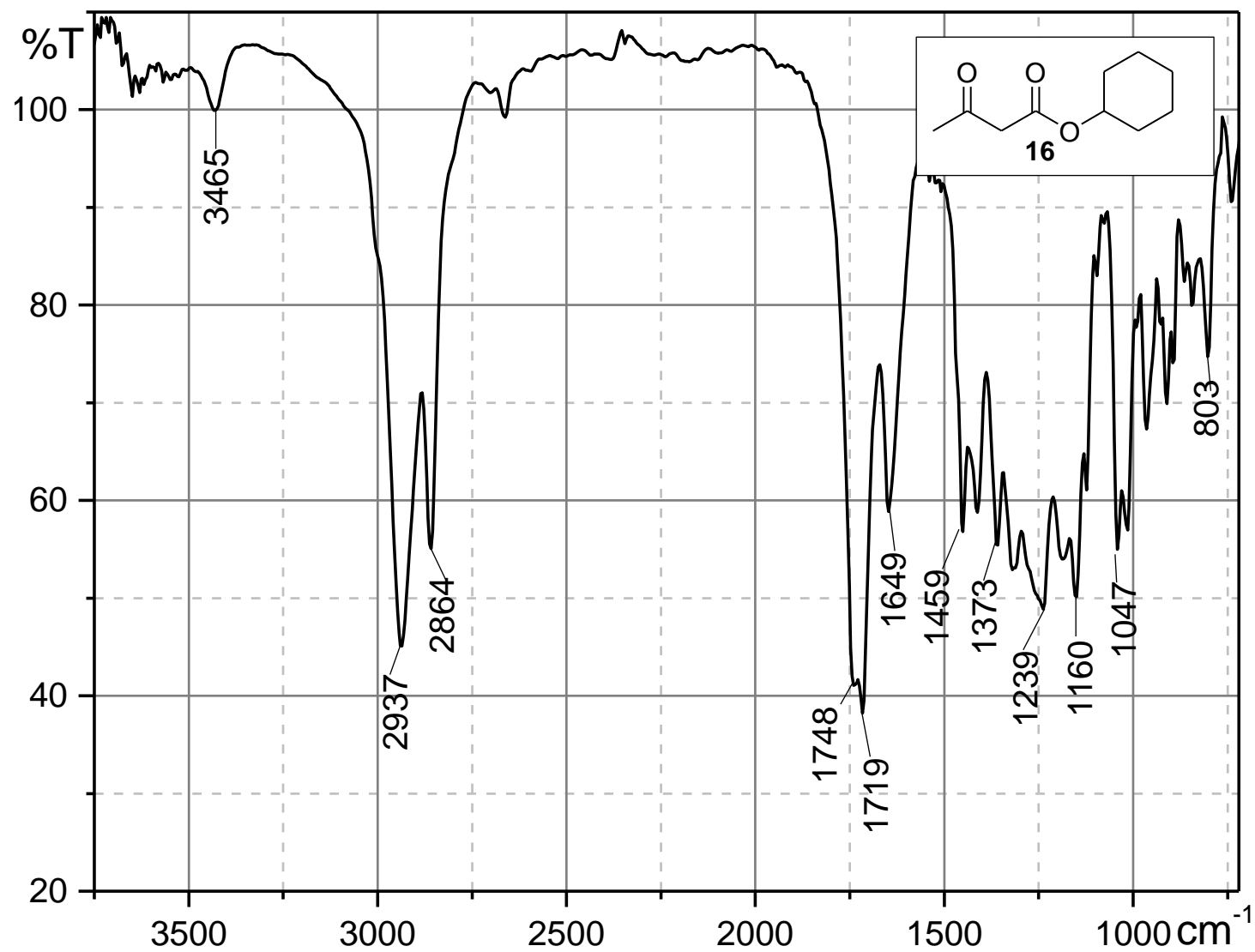
Figura 22: Espectro no infravermelho do acetoacetato de ciclo-hexila (**16**)

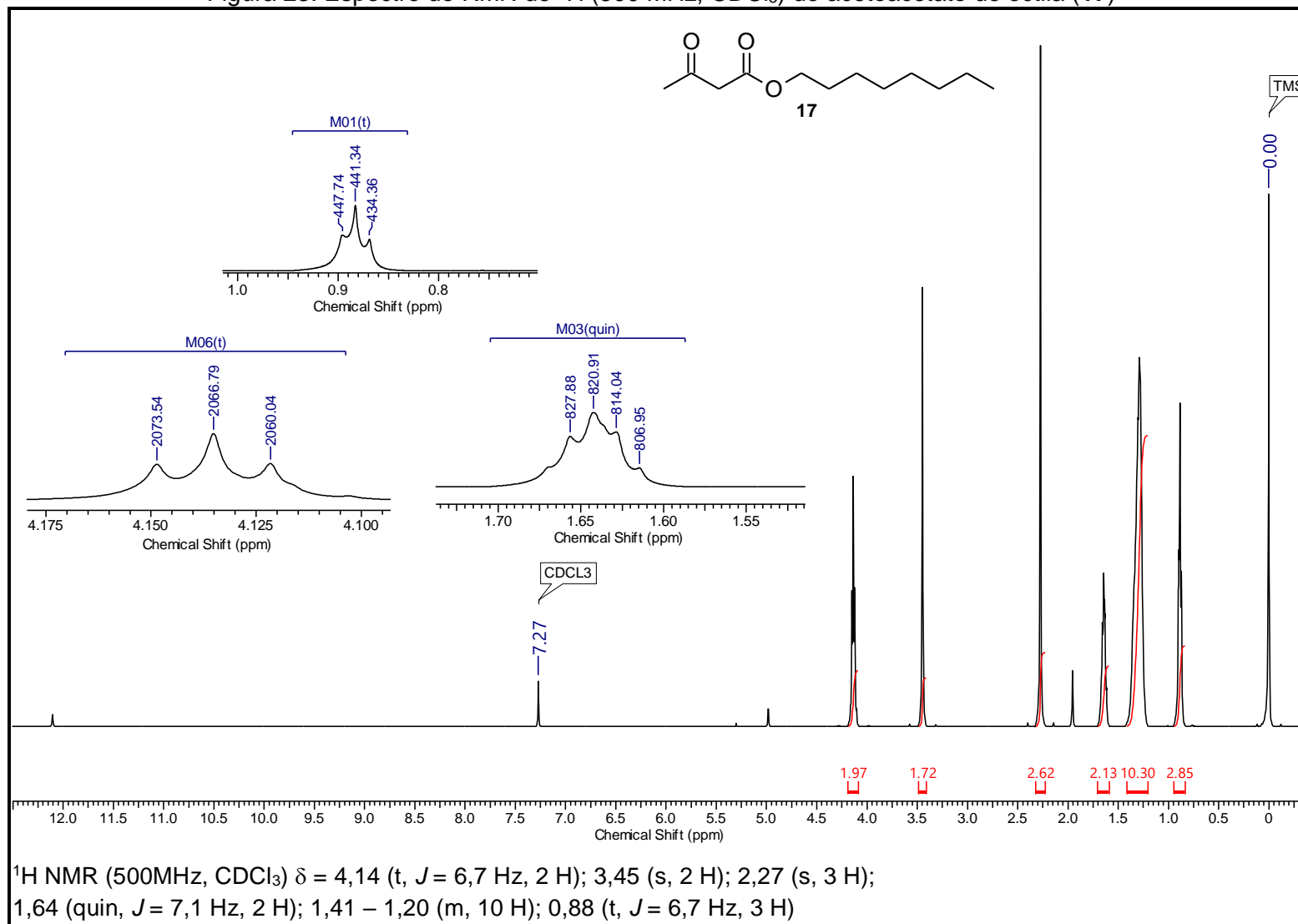
Figura 23: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do acetoacetato de octila (17)

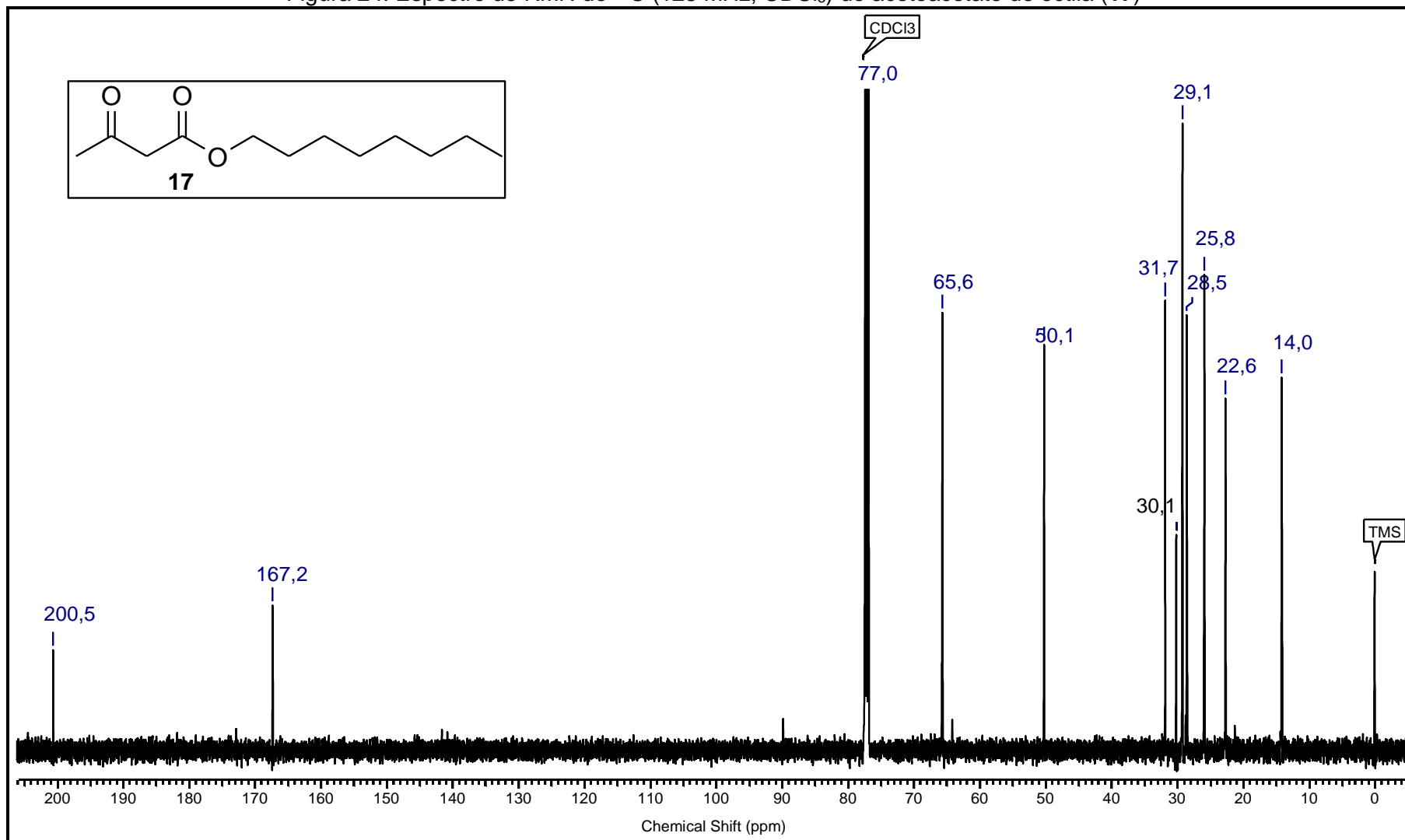
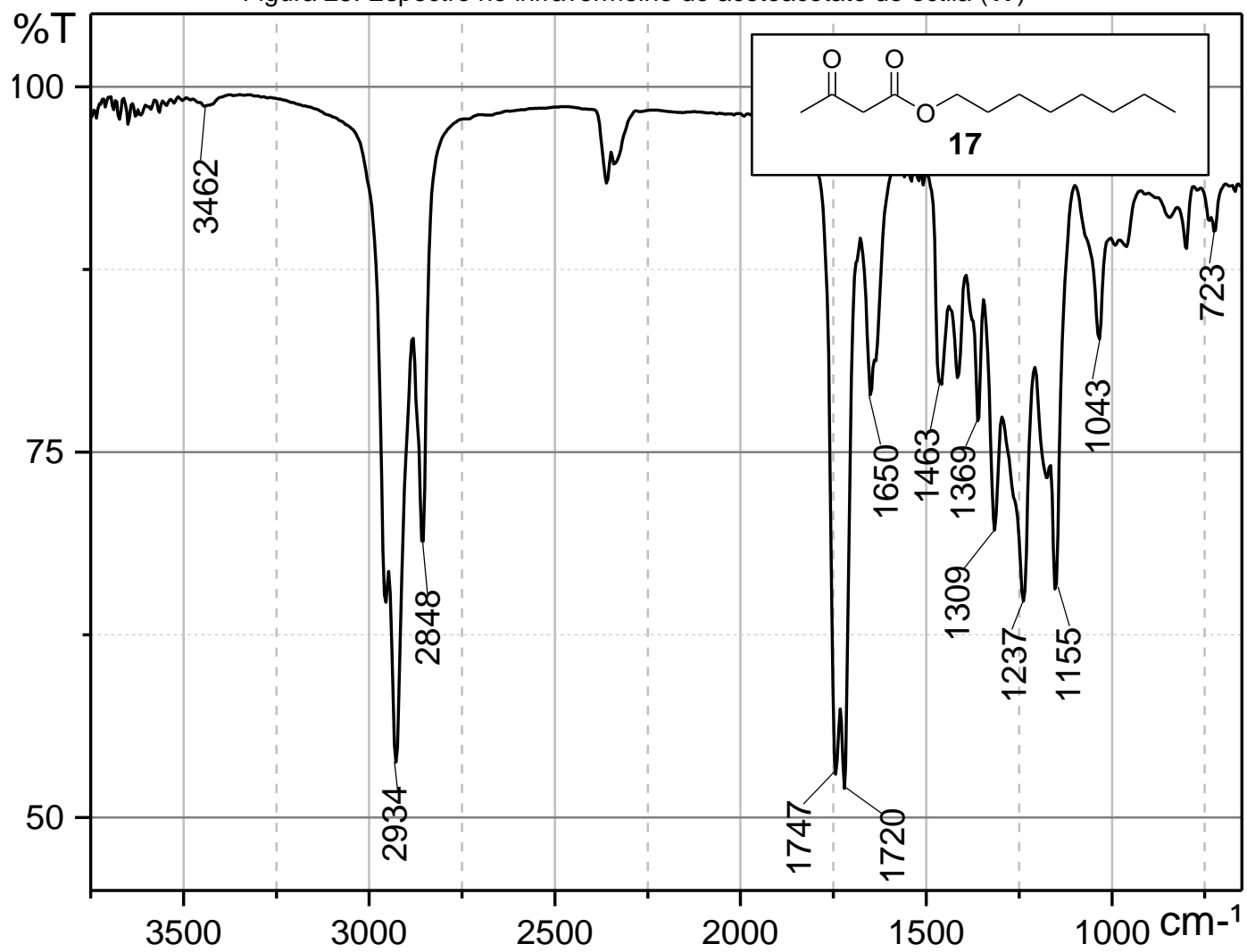
Figura 24: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do acetoacetato de octila (17)

Figura 25: Espectro no infravermelho do acetoacetato de octila (17)



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PREPARAÇÃO DE $\beta$ -CETOÉSTERES

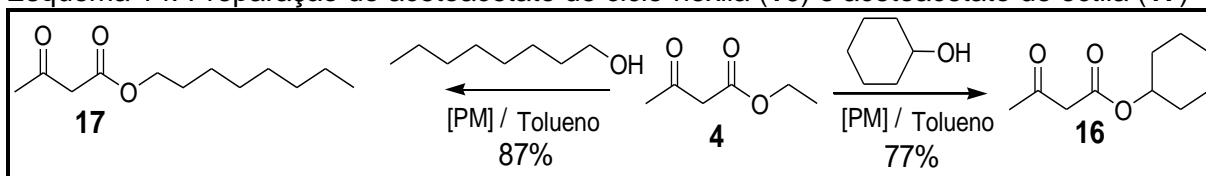
Com o intuito de verificar a influência na enantiosseletividade proporcionada pelo tamanho relativo de grupos alcóxi e alquila, ligados à carbonila do éster e da cetona, respectivamente, nas reações de biorredução empregando os vegetais, quatro  $\beta$ -cetoésteres foram utilizados como substratos: acetoacetato de etila (**4**), acetoacetato de ciclo-hexila (**16**), acetoacetato de octila (**17**) e 5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-pentanoato de metila (**15**).

Destes  $\beta$ -cetoésteres, somente o acetoacetato de etila foi adquirido comercialmente. O acetoacetato de ciclo-hexila e o acetoacetato de octila foram preparados por transesterificação (Koval et al., 2008) a partir do acetoacetato de etila. E **15** foi preparado a partir do 3-oxoglutarato de dimetila, seguindo metodologia de Victor et al., (2010), Green et al., (1999) e More et al., (2002).

As estruturas dos substratos preparados foram confirmadas por cromatografia de camada delgada (CCD), espectroscopia no infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ) e ressonância magnética nuclear de carbono (RMN de  $^{13}\text{C}$ ).

#### 5.1.1 Preparação do acetoacetato de ciclo-hexila (**16**) e acetoacetato de octila (**17**).

Empregando-se peneira molecular ([PM]) para, de acordo com o princípio de Le Chatelier, deslocar o equilíbrio da reação no sentido da formação dos produtos, o acetoacetato de etila (**4**) foi transesterificado, conforme descrito nos itens **4.7.5** e **4.7.6**, obtendo-se acetoacetato de ciclo-hexila (**16**) e acetoacetato de octila (**17**), respectivamente (Esquema 14).

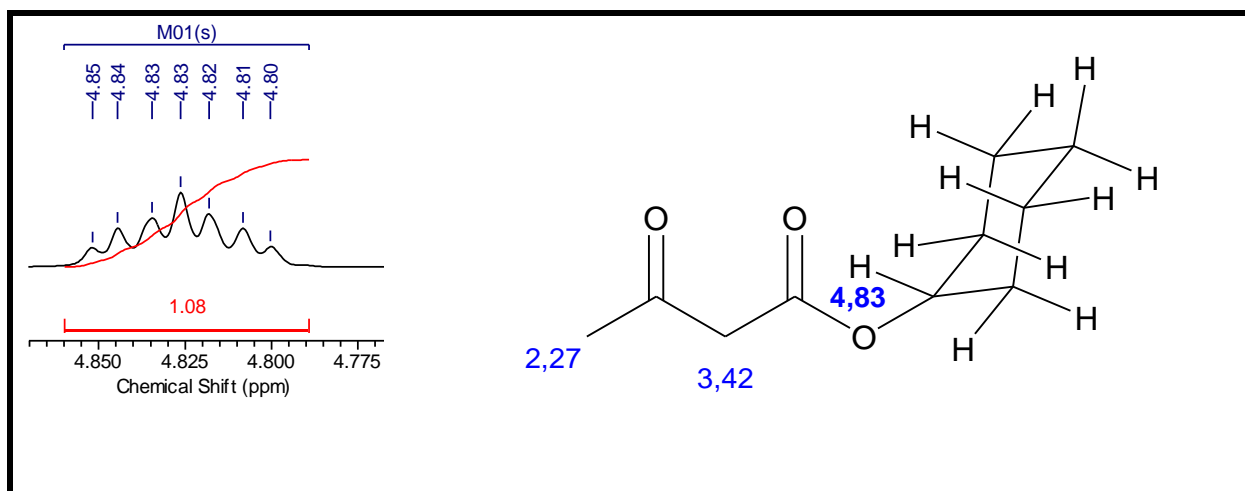
Esquema 14: Preparação do acetoacetato de ciclo-hexila (**16**) e acetoacetato de octila (**17**)

O uso de [PM] para remoção do etanol formado e a utilização dos reagentes em quantidades equimolares para evitar sobra de reagentes no final da transesterificação do **4** permitiram obter **16** e **17** em alto rendimento e pureza, dispensando a necessidade de purificação.

Para confirmar a formação do produto **16**, apresenta-se os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 20), RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 21) e IV (Figura 22) concordantes com os dados da literatura (KOVAL et al., 2008).

No espectro RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 20), destaca-se a presença de vários multipletos característicos do anel ciclo-hexila do **16**, entre, aproximadamente, 1 e 2ppm e 4,83ppm. Devido os hidrogênios metilênicos do anel apresentarem deslocamento químico muito próximo e ainda serem diastereotópicos não é possível confirmar a multiplicidade. É possível visualizar dois singletos (Figura 20), o primeiro em 2,27ppm referente a 3 hidrogênios ligados ao carbono vizinho à carbonila cetônica e o segundo em 3,42ppm referente aos dois hidrogênios  $\alpha$ -carbonílicos. O multipletto em 4,83ppm é atribuído ao único hidrogênio carbinólico. Este multipletto resulta da formação de tripleto de tripleto com constante de acoplamento  $J=9,1\text{Hz}$ , com dois hidrogênios axiais, e constante de acoplamento de  $J=3,6\text{Hz}$ , com dois hidrogênios equatoriais. Este padrão de acoplamento confirma que o hidrogênio carbinólico se encontra na posição axial e o  $\beta$ -cetoéster em posição equatorial em relação ao anel de conformação cadeira (Figura 26). Por ser tripleto de tripleto deveriam aparecer nove picos, mas quatros picos centrais se sobreposaram o que faz parecer um septeto.

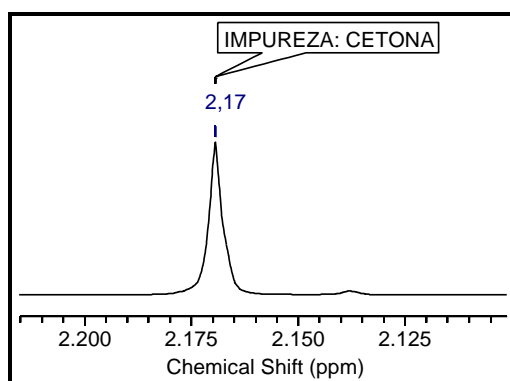
Figura 26: Atribuição do multipeto do hidrogênio carbinólico no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do acetoacetato de ciclo-hexila.



O alto deslocamento químico do hidrogênio carbinólico (4,83ppm) é reforçado pela anisotropia gerada da ligação dupla da carbonila do éster e é uma evidência fundamental e decisiva para confirmar a estrutura **16**.

Ainda analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 20), não se identifica resíduos dos reagentes no espectro. Não há sinal de um tripleto em aproximadamente 1,25ppm e um quarteto em aproximadamente 3,71ppm, que caracterizariam a presença de etanol ou acetoacetato de etila. Porém, é possível identificar no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  um pequeno singlete em 2,17ppm (Figura 27), provável contaminação por acetona, substância utilizada na limpeza do tubo de RMN (GOTTLIEB, KOTLYAR e NULDELMAN, 1997).

Figura 27: Sinal de impureza no RMN de  $^1\text{H}$  na amostra do acetoacetato de ciclo-hexila

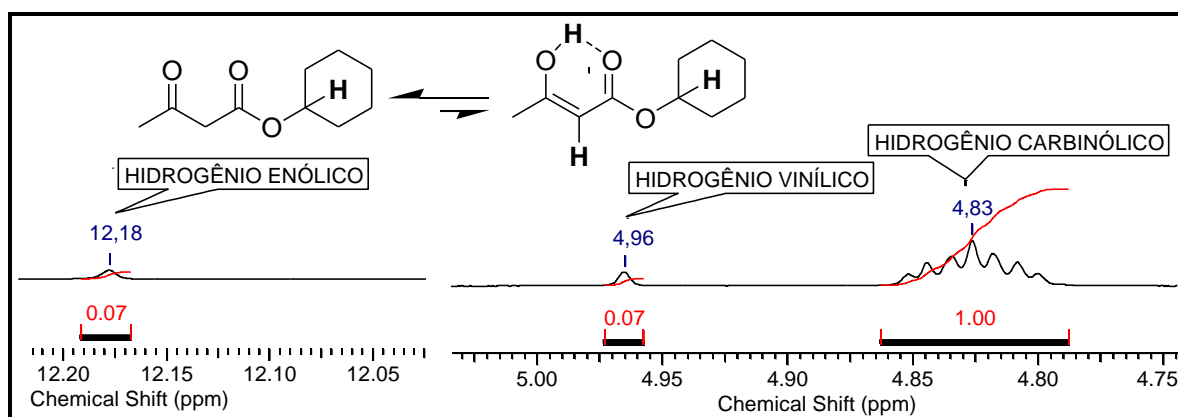


É conhecido que  $\beta$ -cetoésteres exibem pequena enolização (PAVIA et al, 2010). Mesmo assim, é possível atribuir os deslocamentos químicos dos hidrogênios



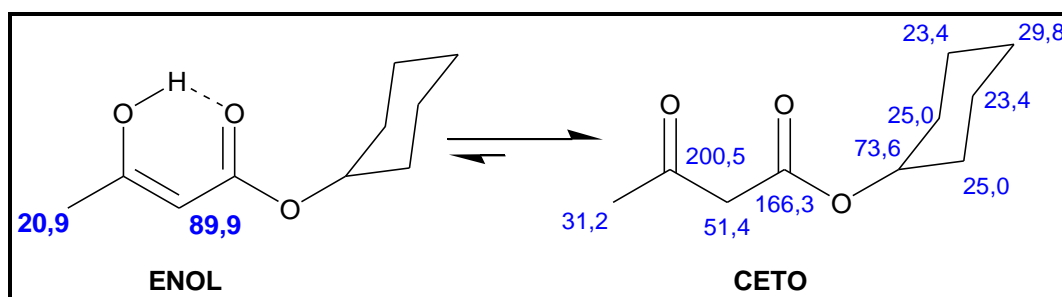
vinílico (4,96ppm) e do hidrogênio enólico (12,18ppm) em ligação de hidrogênio do tautômero enólico. E quando se compara a relação entre as áreas de integrações do hidrogênio enólico ou vinílico, em relação o hidrogênio carbinólico, conclui-se que há 7% da forma enólica na amostra, evidenciando que a forma enólica é menos favorecida no equilíbrio tautomérico cetoenólico do **16** (Esquema 15).

Esquema 15: Equilíbrio cetoenólico para acetoacetato de ciclo-hexila e valores de deslocamento químico no espectro de RMN de  $^1\text{H}$



No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 21), observa-se 12 sinais de átomos de carbonos, enquanto a estrutura **16** apresenta apenas 10 átomos. O fato está relacionado ao fenômeno de tautomeria que ocorre em  $\beta$ -cetoésteres. Os sinais de pequenas intensidades se atribuem à presença do tautômero enol em equilíbrio com a forma ceto. Em 20,9ppm se refere ao carbono da metila e em 89,9ppm ao carbono vinil (forma enol, Esquema 16). Os deslocamentos químicos dos carbonos do anel, incluindo 23,4; 25,0 e 29,8ppm, não foram atribuídos com precisão aos respectivos carbonos (Esquema 16).

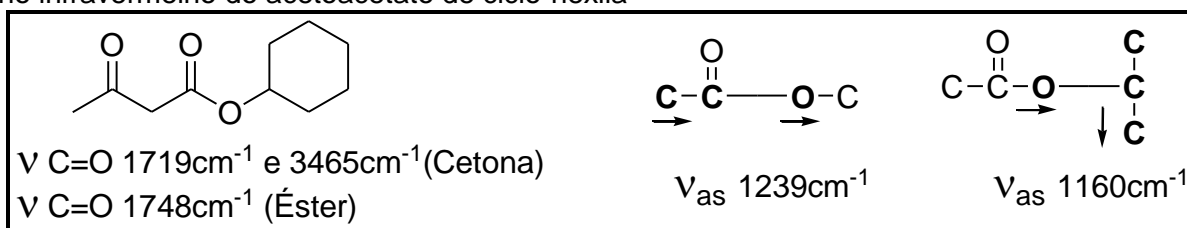
Esquema 16: Equilíbrio cetoenólico para acetoacetato de ciclo-hexila e valores de deslocamento químico no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$



Na análise do espectro no IV do **16** não se identifica presença de sinais dos materiais iniciais usado na reação. O IV (Figura 22) não apresenta banda larga entre 3600 e 3650  $\text{cm}^{-1}$ , característica do estiramento da ligação O-H, via ligação de hidrogênio presente em amostras de cicloexanol, etanol e ausente em  $\beta$ -cetoésteres.

Os modos de estiramentos ( $\nu$ ) das ligações C=O e C-O que caracterizam  $\beta$ -cetoésteres (BARBOSA, 2007) são identificados do espectro no IV do **16** (Figura 22): cetona (1719 $\text{cm}^{-1}$ , estiramento da ligação C=O e 3465 $\text{cm}^{-1}$ , harmônica da banda em 1719 $\text{cm}^{-1}$ ) e éster (1748 $\text{cm}^{-1}$ , estiramento das ligações C=O, 1239 e 1160 $\text{cm}^{-1}$ , vibrações assimétricas ( $\nu_{\text{as}}$ ) das ligações C-C e C-O). A figura 28, abaixo, apresenta em destaque os átomos envolvidos nos estiramentos assimétricos presentes no espectro no IV do **16** (Figura 22).

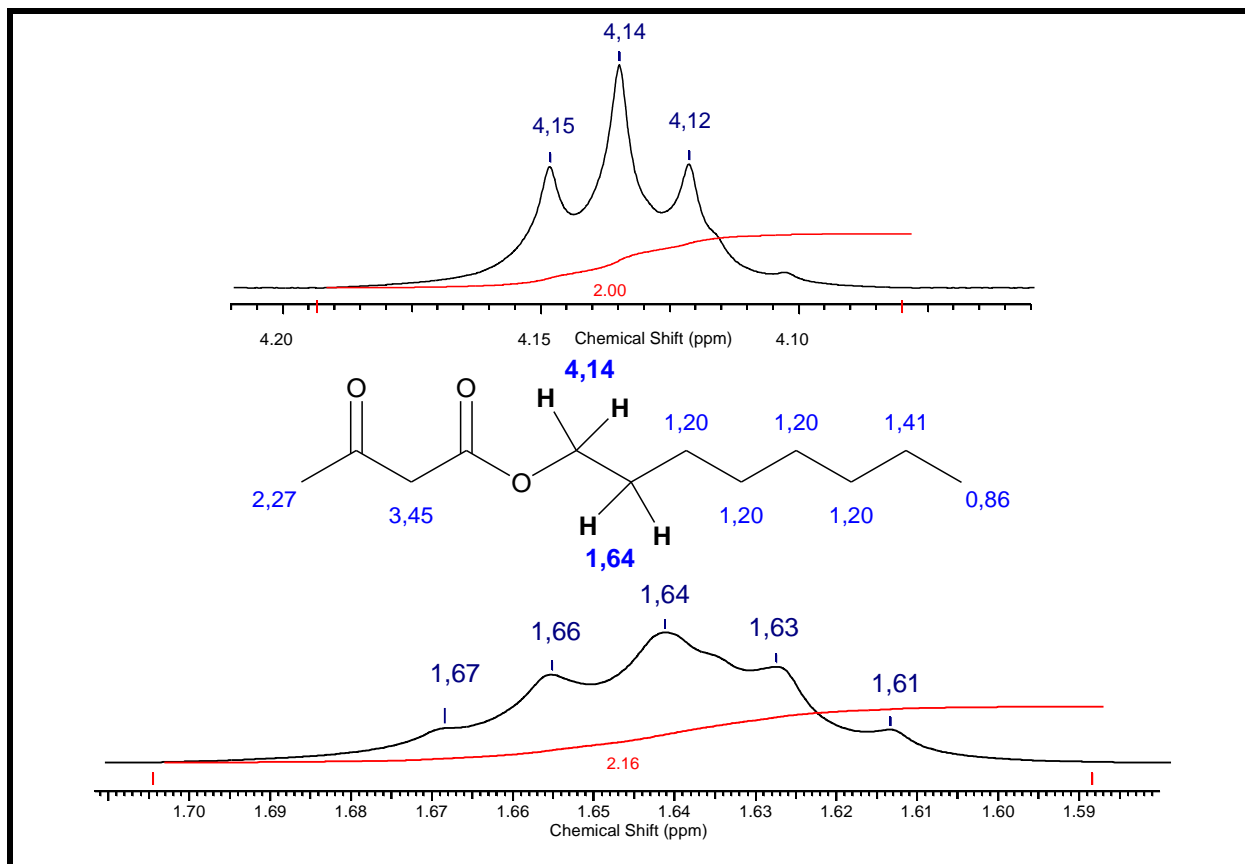
Figura 28: Representação dos modos de estiramento das ligações C=O e C-O do espectro no infravermelho do acetoacetato de ciclo-hexila



A confirmação da formação do **17**, está justificada nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 23), RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 24) e IV (Figura 25).

Do espectro RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 23), atribui-se o tripleto em 4,12ppm aos dois hidrogênios vizinhos ao oxigênio e o quinteto em 1,64ppm aos dois hidrogênios vizinhos a estes (Figura 29). A presença deste quinteto corrobora a obtenção do **17**.

Figura 29: Atribuições do tripleto e quinteto dos hidrogênios no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do acetoacetato de octila

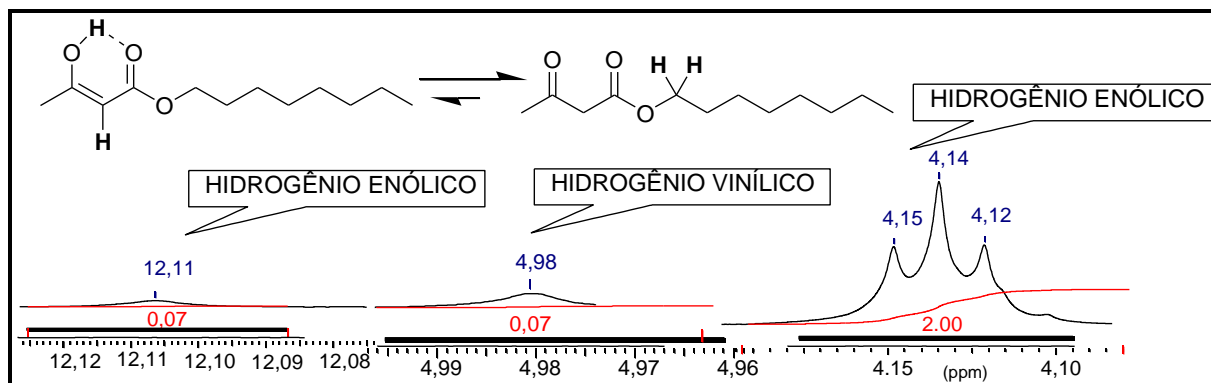


A confirmação da estrutura da substância ainda é reforçada pelos singletos (2,27ppm referentes aos hidrogênios vizinhos à carbolina, 3,45ppm referentes aos hidrogênios ligados ao carbono entre  $\alpha$ -di-carbônicos) e do tripleto em 0,86ppm dos hidrogênios terminais do alcóxi (Figura 23) e em destaque os deslocamentos químicos e estrutura da substância (Figura 29). O multipletto entre 1,21 e 1,41ppm (Figura 23) se deve aos hidrogênios ligados aos carbonos secundários da cadeia do alcóxi, localizados entre o carbono terminal o carbono vizinho ao carbono carbinólico, que devido se localizarem em ambiente químico muito parecido não é possível identificar a multiplicidade, nem atribuir os sinais aos respectivos hidrogênios formando os dez hidrogênios único multipletto (Figura 23 e 29).

Assim como ocorreu no espectro do **16**, também não se identifica resíduos de alguns dos reagentes no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do **17**. Porém, há um pequeno singletto em 1,95ppm que não foi possível identificar a impureza (Figura 23). É possível também atribuir os sinais dos hidrogênios vinílico (4,98ppm) e enólico (12,11ppm) da forma enólica do **17** devido o equilíbrio cetoenólico.

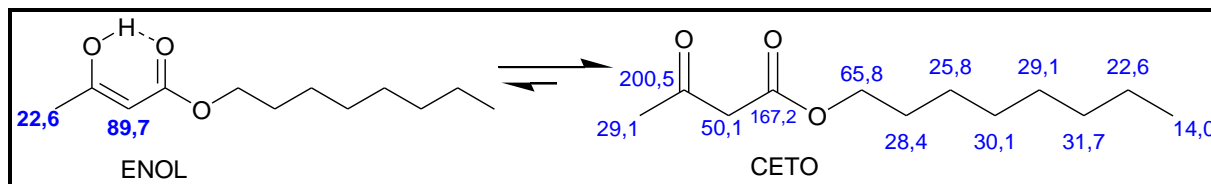
A comparação entre as áreas de integrações do hidrogênio enólico ou vinílico, em relação um hidrogênio carbinólico do **17**, leva a conclusão que há uma proporção da forma enólica (4%) encontrada para **17** no equilíbrio tautomérico cetoenólico (Esquema 17).

Esquema 17: Equilíbrio cetoenólico para acetoacetato de octila e valores de deslocamento químico no espectro de RMN de  $^1\text{H}$



No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 24), observa-se 13 sinais de átomos de carbonos, além de dois sinais sobrepostos, enquanto **17** apresenta apenas 12 átomos de carbonos. Em destaque os deslocamentos químicos dos átomos de carbonos no equilíbrio cetoenólico que aparecem no espectro (Esquema 18). Em 22,6ppm se refere ao carbono da metila da forma enol, que se encontra sobreposto a um dos sinais da forma ceto e em 89,7ppm ao carbono vinil da forma enol. Os sinais entre 25,9 e 31,7ppm não foram atribuídos com precisão aos respectivos átomos de carbono, por que apresentam deslocamentos químicos muito próximo.

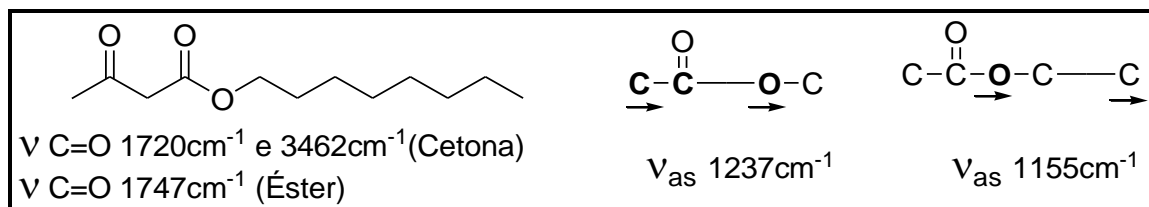
Esquema 18: Equilíbrio cetoenólico para acetoacetato de octila e valores de deslocamento químico no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$



O espectro no IV do **17** (Figura 25), atribui-se à carbonila as bandas  $1720\text{cm}^{-1}$  (estiramentos ( $\nu$ ) das ligações  $\text{C}=\text{O}$ ) e  $3462\text{cm}^{-1}$  (harmônica da banda  $1720\text{cm}^{-1}$ ). E as bandas que caracterizam éster estão atribuídas  $1747\text{cm}^{-1}$  (estiramento das

ligações C=O) e as vibrações assimétricas ( $v_{as}$ ) das ligações C-C—O e O-C—C, em 1235 e 1155 $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente (Figura 30).

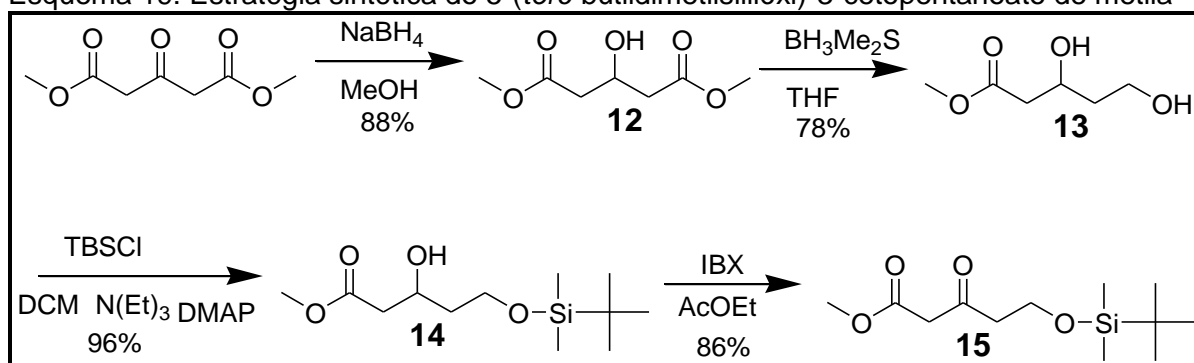
Figura 30: Representação dos modos de estiramento das ligações C=O e C-O do espectro no IV do acetoacetato de octila



### 5.1.2 Preparação do 5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila (**15**)

A metodologia para obtenção do **15** a partir do 3-oxoglutarato de dimetila, até a estrutura **13** já havia sido desenvolvida, conforme procedimentos experimentais **4.7.1** a **4.7.2** (Victor et al., 2011). Nesta pesquisa, realizou-se a proteção do álcool primário da estrutura **13**, obtendo-se **14**, e a oxidação do álcool secundário, obtendo-se **15**.

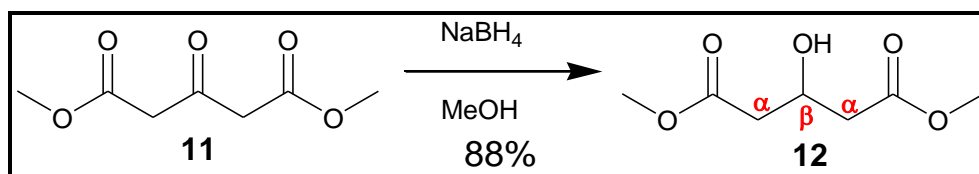
A estratégia sintética foi realizada em quatro etapas e rendimento total de 57% (Esquema 19). Iniciou-se com uma redução quimiosseletiva por boridreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), onde somente a função cetona foi reduzida para obter **12** em rendimento de 88%, seguida de uma redução regiosseletiva, em que somente um grupo ester foi reduzido por borana dimetil sulfeto ( $\text{BH}_3\text{Me}_2\text{S}$ ), obtendo-se **13** em rendimento de 78%. Na terceira etapa, a hidroxila primária foi protegida, seletivamente, empregando-se cloreto de *terc*-butiladimetila silano (TBSCl) para obter **14** em 96% de rendimento e, finalmente, a última etapa, oxidação do álcool secundário por ácido 2-iodoxibenzoico (IBX), obtendo-se **15** em 86% (Esquema 19).

Esquema 19: Estratégia sintética do 5-(*tert*-butildimetilsililóxi)-3-cetopentanoato de metila

Os dados dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  e IV das substâncias **12** e **13** são concordantes como os obtidos na literatura (VICTOR et al, 2011).

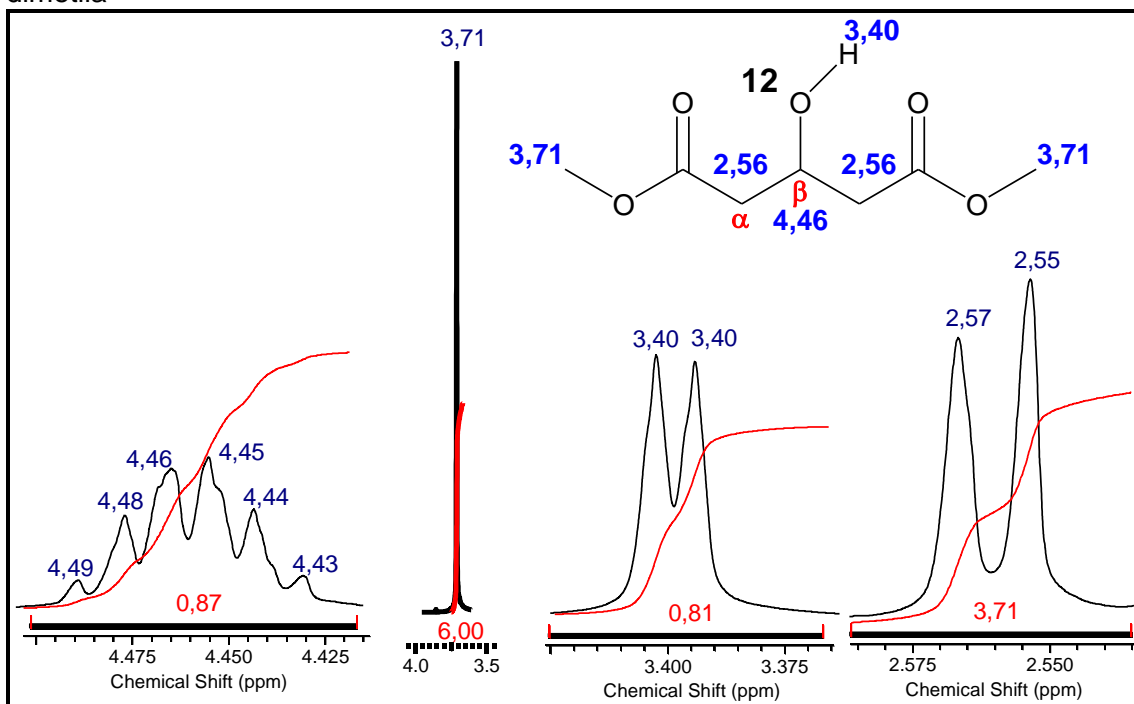
### 5.1.2.1 Redução do 3-oxopentanoato de dimetila (11)

Esquema 20: Redução química do 3-oxopentanoato de dimetila



Para se confirmar a formação do **12** (Esquema 20), verifica-se no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 8) e em destaque (Figura 32) um dubetos de quinteto, em 4,46ppm, atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono  $\beta$ , que acopla com os quatro hidrogênios ligados aos carbonos alfas ( $\text{C}_\alpha$ ) com constante de acoplamento  $^3J = 6,5\text{Hz}$  e com o hidrogênio da hidroxila ( $\delta = 3,40\text{ppm}$ ) com  $^3J = 4,1\text{Hz}$ . O dubleto, em 2,56ppm, atribui-se aos quatro hidrogênios ligados aos carbonos  $\alpha$ , que por serem magneticamente equivalentes, acoplam-se com hidrogênio ligado ao carbono  $\beta$  no mesmo deslocamento químico, em dubletos de constante de acoplamento  $^3J = 6,57\text{Hz}$ . O singlete em 3,71ppm se atribui aos seis hidrogênios das duas metoxilas, que por serem também equivalentes, absorvem no mesmo deslocamento químico e, finalmente, o dupleto em 3,40ppm é atribuído ao hidrogênio da hidroxila, que acopla com o hidrogênio do carbono  $\beta$  com constante de acoplamento de  $^3J = 4,1\text{Hz}$  (Figura 31).

Figura 31: Atribuições dos sinais do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do 3-hidroxipentanoato de dimetila

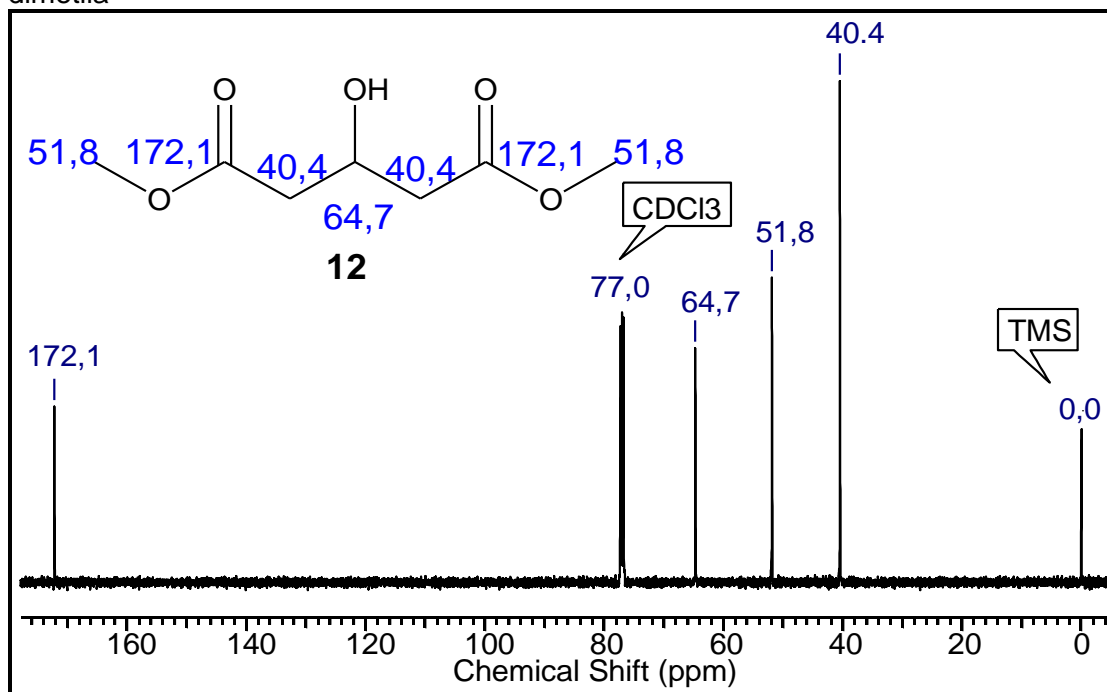


O hidrogênio da hidroxila não é normalmente separado por hidrogênio em carbono adjacente, por que a rápida troca com hidrogênio de água ou ácido, que geralmente contamina a amostra, desacopla essa interação e é intensificado por elevação da temperatura da amostra. Entretanto, o acoplamento é previsto em amostras de álcool ultrapuras (PAVIA et al., 2010, p. 143). Portanto, este acoplamento do hidrogênio da hidroxila com o hidrogênio ligado ao carbono  $\beta$  é uma evidência que a reação de redução ocorreu quimiosseletivamente na carbonila da cetona e o álcool produzido não apresenta resíduo de ácido e água. Porém, há uma pequena impureza não identificada no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , em 1,73ppm (Figura 8).

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 9) e em destaque (Figura 32), Todos os sinais que aparecem no espectro estão devidamente atribuídos aos respectivos átomos de carbonos do **12**, conforme esperado para  $\beta$ -hidróxi ésteres e para uma estrutura química que é dividida por um plano de simetria. Ou seja, assim como ocorre no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresenta “metade” dos sinais, em relação aos grupos de átomos de hidrogênio ou em relação o número de átomo de carbono.

Não há sinal de impureza no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , além dos sinais indicados do solvente ( $\text{CDCl}_3$ ) e do trimetilsilano (TMS).

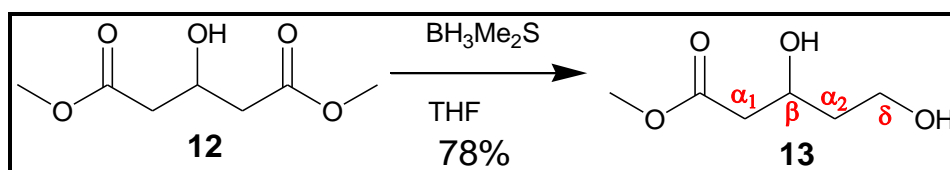
Figura 32: Atribuições sinais do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do 3-hidroxicarboxilato de dimetila



O espectro de IV do **12** (Figura 10) corroboram as análises de RMN. Verificam-se os modos de estiramentos característicos da função álcool em  $3500\text{cm}^{-1}$ , banda larga devido estiramento de ligação O-H em ligação de hidrogênio. Também estão presentes as bandas de estiramento de ligação C=O de éster, em  $1737\text{cm}^{-1}$  e as bandas de estiramento assimétrico do sistema C-O em  $1276$  e  $1157\text{cm}^{-1}$  e está ausente a banda característica de cetona do estiramento da ligação C=O, confirmando a reação de redução somente na carbonila da função cetona.

### 5.1.2.2 Redução do 3-hidroxipentanoato de dimetila (12)

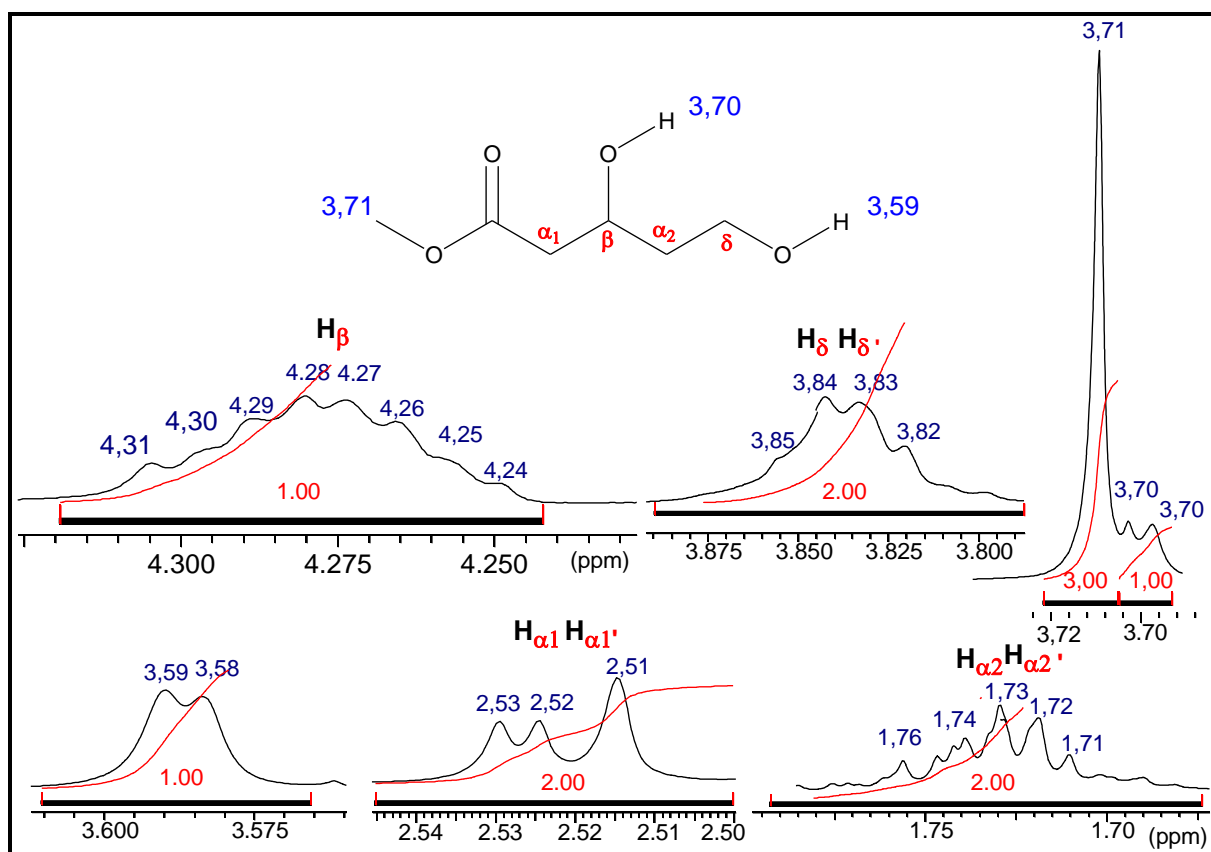
Esquema 21: Redução química do 3-hidroxipentanoato de metila





Na segunda reação, a estratégia foi reduzir regioseletivamente um grupo éster do **12** para obter o diol (**13**) (Esquema 21). Esta reação elimina a simetria da estrutura química da molécula e gera **13** com centro estereogênico, surgindo dois pares de hidrogênios geminais diastereotópicos (Figura 11). A multiplicidade dos grupos de hidrogênios nos carbonos  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\delta$  é complexa devido a presença de dois grupos de hidrogênios geminais diastereotópicos ( $H_{\alpha_1}$ ,  $H_{\alpha_1'}$  e  $H_{\alpha_2}$ ,  $H_{\alpha_2'}$ ), que por apresentarem deslocamentos químicos ligeiramente diferentes e se separarem um do outro gerando um padrão de separação complexa entre si e seus hidrogênios vizinhos, não permitindo identificar as constantes de acoplamentos (Figura 33).

Figura 33: Atribuições dos sinais do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do 3-hidroxipentanoato de dimetila



O multipeto em 4,27ppm (Figura 33) é atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono  $\beta$  ( $H_{\beta}$ ), que é o hidrogênio mais desprotegido da molécula por se encontrar ligado a um carbono ligado a um átomo eletronegativo, oxigênio, se localizar no meio da cadeia carbônica e sofrer desblindagem anisotrópica da ligação  $\pi$  da carbonila.  $H_{\beta}$  acopla com os dois pares de hidrogênios geminais diastereotópicos ligados aos carbonos  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  e com o hidrogênio da hidroxila vizinha, que aparece como dubleto

em 3,70ppm. Estes dois grupos hidrogênios geminais diastereotópicos apresentam pequenas diferenças de deslocamentos químicos e constantes de acoplamentos muito parecidas, o que proporcionam um padrão de separação complexas devido sobreposição de dubletos.

O quarteto destorcido entre 3,82 e 3,85ppm (Figura 33) é atribuído ao segundo grupo de hidrogênio mais desprotegido ( $H_{\delta}$ ,  $H_{\delta'}$ ). Estes hidrogênios acoplam com os hidrogênios  $H_{\alpha 2}$  e  $H_{\alpha 2'}$  e, provavelmente, ao hidrogênio da hidroxila do álcool primário que é separado como dubleto em 3,59ppm.

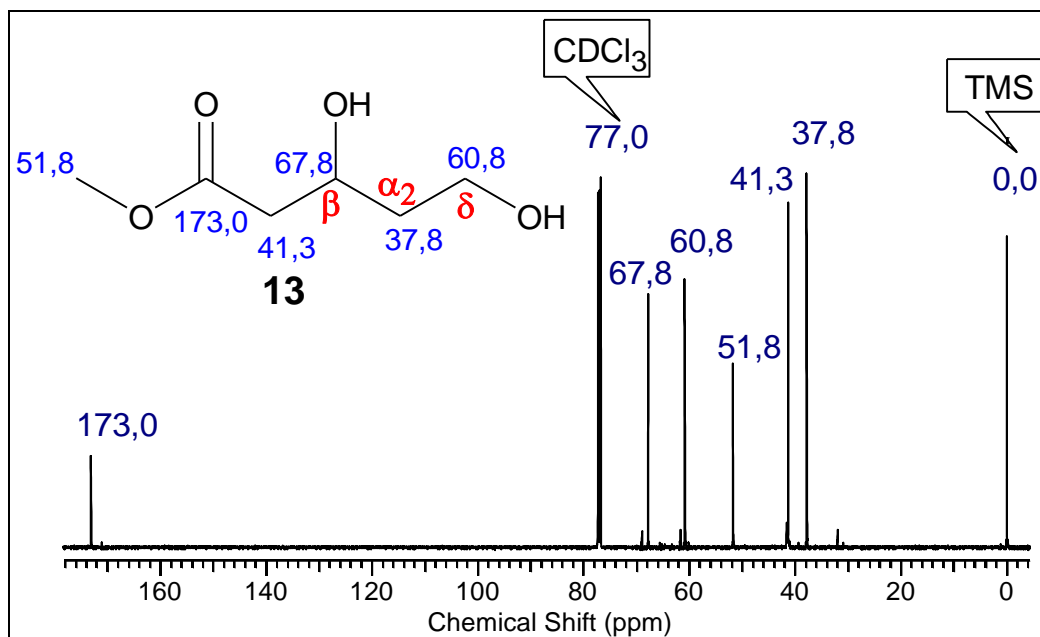
O singlete em 3,71ppm (Figura 33) é atribuído aos três hidrogênios da metoxila, que quase coincide com o dubleto do hidrogênio da hidroxila do álcool secundário, em 3,70ppm.

O duplo dubleto deformado entre 2,51 e 2,53ppm é atribuído aos hidrogênios diastereotópicos  $H_{\alpha 1}$  e  $H_{\alpha 1'}$ , que acoplam entre si e com  $H_{\beta}$ .

E finalmente, o multiplete entre 1,71 e 1,76 é atribuído aos hidrogênios diastereotópicos  $H_{\alpha 2}$  e  $H_{\alpha 2'}$ , que são os mais protegidos da molécula e acoplam entre si e com os hidrogênios vizinhos ( $H_{\beta}$ ,  $H_{\delta}$ ,  $H_{\delta'}$ ), formando dubleto de dubleto.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do **15** (Figura 12) e as atribuições dos deslocamentos químicos dos seus átomos de carbonos (Figura 34) confirmam a redução regioseletiva de um dos grupos éster e obtenção do diol. O deslocamento químico de 60,8ppm é atribuído ao  $C_{\delta}$ , coerente com a transformação do grupo éster em álcool, o que proporcionou a formação de uma molécula assimétrica. Cada sinal no espectro corresponde um carbono na estrutura do **13**, exceto os sinais do  $\text{CDCl}_3$  e do TMS, indicados no espectro.

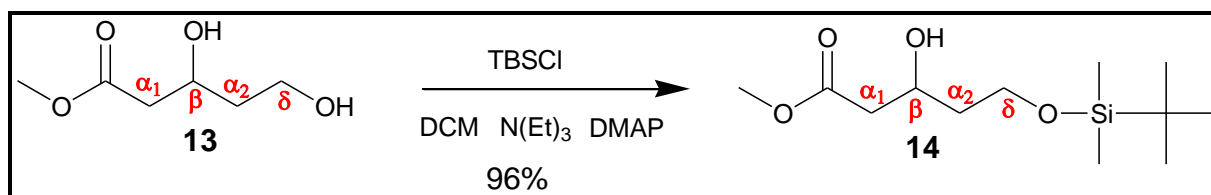
Figura 34: Atribuições dos sinais do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do 3-hidroxipentanoato de dimetila



Pelo espectro no IV do **13** (Figura 13) não é possível afirmar a redução química do **12**, visto que a transformação da função éster em álcool mantém **13** com as mesmas funções orgânicas anteriormente existentes em **12**. Verificam-se os modos de estiramentos característicos da função álcool em  $3460\text{cm}^{-1}$ , banda larga devido estiramento de ligação O-H em ligação de hidrogênio, bandas de estiramento de ligação C=O de éster, em  $1738\text{cm}^{-1}$  e as bandas de estiramento assimétrico do sistema C-O em  $1286$  e  $1170\text{cm}^{-1}$ .

### 5.1.2.3 Proteção do álcool primário do $\beta,\delta$ -di-hidroxipentanoato de metila (**13**)

Esquema 22: Proteção do álcool primário no  $\beta,\delta$ -di-hidroxipentanoato de metila

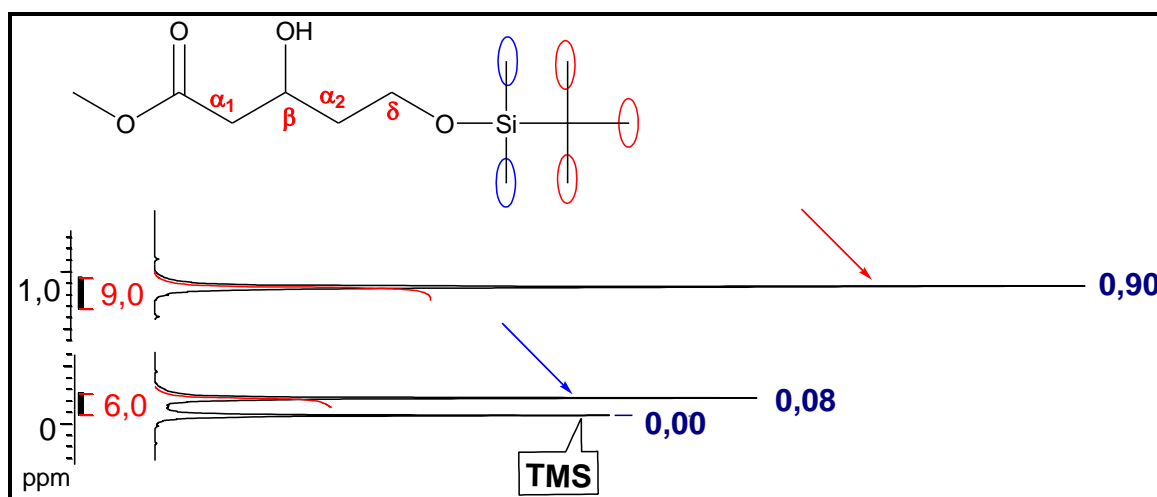


Nesta etapa, obteve-se **14** através de proteção seletiva da hidroxila primária do **13** com cloreto de *tert*-butildimetil silano (TBSCl) (Esquema 22). Esta substância é

muito importante por que fornece o racemato referência para comparação com os produtos de biorredução, através da cromatografia a gás quiral. Para se certificar que a transformação ocorreu, verificou-se o desaparecimento do dubleto relacionado ao hidrogênio da hidroxila do diol e o aparecimento de dois singletos relacionados aos hidrogênios das metilas do grupo TBS no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , a presença dos sinais de carbono no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e a banda no IV da ligação de estiramento O-Si.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do **14** (Figura 14), observa-se a mesma semelhança no padrão de separação e deslocamentos químicos dos hidrogênios ligados aos carbonos da metoxila,  $\text{C}_{\alpha_1}$ ,  $\text{C}_{\alpha_2}$ ,  $\text{C}_{\beta}$  e  $\text{C}_{\delta}$  do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do **13** (Figura 33). E não se observa mais o dubleto em aproximadamente 3,59ppm, atribuído ao hidrogênio da hidroxila primária no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do **13** (Figura 33). Atribui-se o singlete em 0,08ppm aos seis hidrogênios das duas metilas ligadas diretamente ao átomo de silício, que por este ser menos eletronegativo de que o carbono, estes hidrogênios são os mais blindados da estrutura química, enquanto o singlete em 0,90ppm se atribui aos nove hidrogênios das três metilas do grupo *terc*-butila (Figura 35)

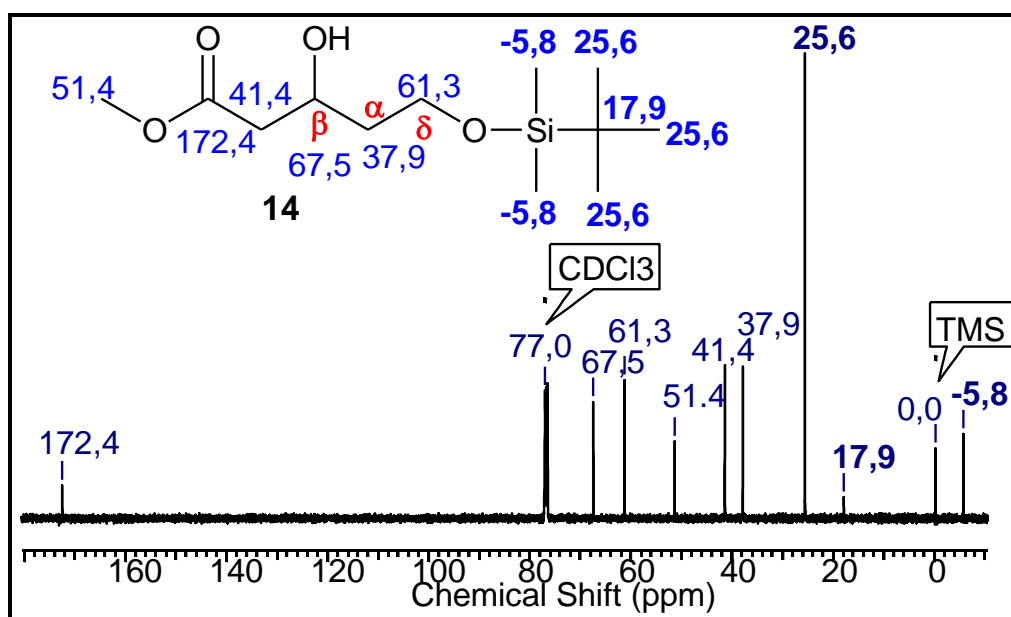
Figura 35: Atribuições dos singletos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do 5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-hidroxipentanoato de metila



No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do **14** (Figuras 15 e 36) observa-se que há seis sinas, correspondendo aproximadamente aos mesmos deslocamentos químicos do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do **13** (Figura 34) e surgem mais três sinas correspondentes aos átomos de carbono do grupo TBS (Figura 36). O sinal em -5,8ppm se atribui aos carbonos das duas metilas ligadas diretamente ao silício. O

sinal em 17,9ppm se atribui ao carbono quaternário, que por não apresentar hidrogênio ligado, apresenta menor intensidade e o sinal em 25,6ppm se atribui aos três carbonos das metilas do grupo *terc*-butil.

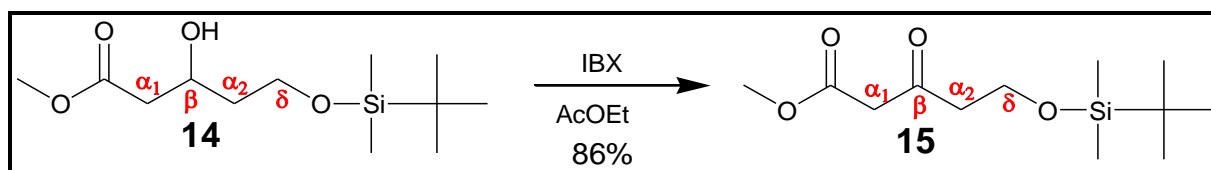
Figura 36: Atribuições dos sinais do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do 5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-hidroxipentanoato de metila



O espectro no IV do **14** (Figura 16) revela a evidência da proteção ter ocorrido. Além das bandas que aparecem no espectro no IV do **13**, o espectro no IV do **14**, evidencia as bandas intensas de estiramento devido as ligações carbono silício. A banda intensa em  $1091\text{cm}^{-1}$  se atribui ao estiramento assimétrico das ligações C-O-Si e a banda intensa em  $839\text{cm}^{-1}$  resulta da absorção do estiramento da ligação Si-O.

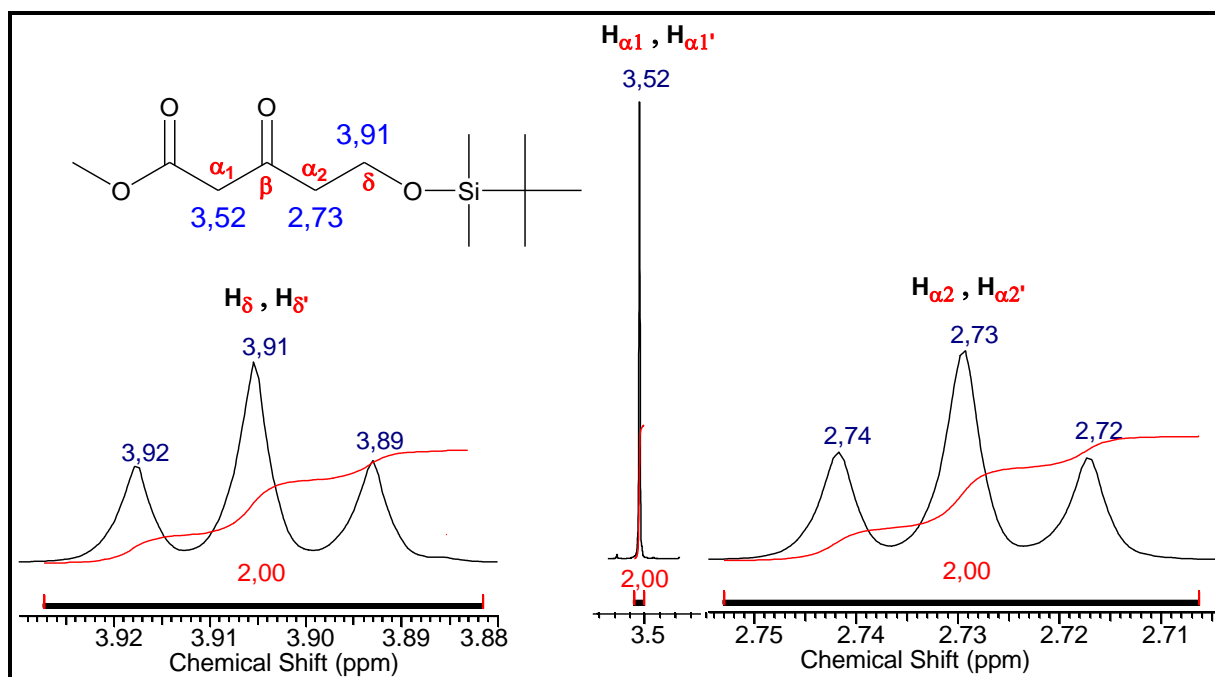
#### 5.1.2.4 Oxidação do álcool primário do 5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-hidroxipentanoato de metila (**14**)

Esquema 23: Oxidação do 5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-hidroxipentanoato de metila



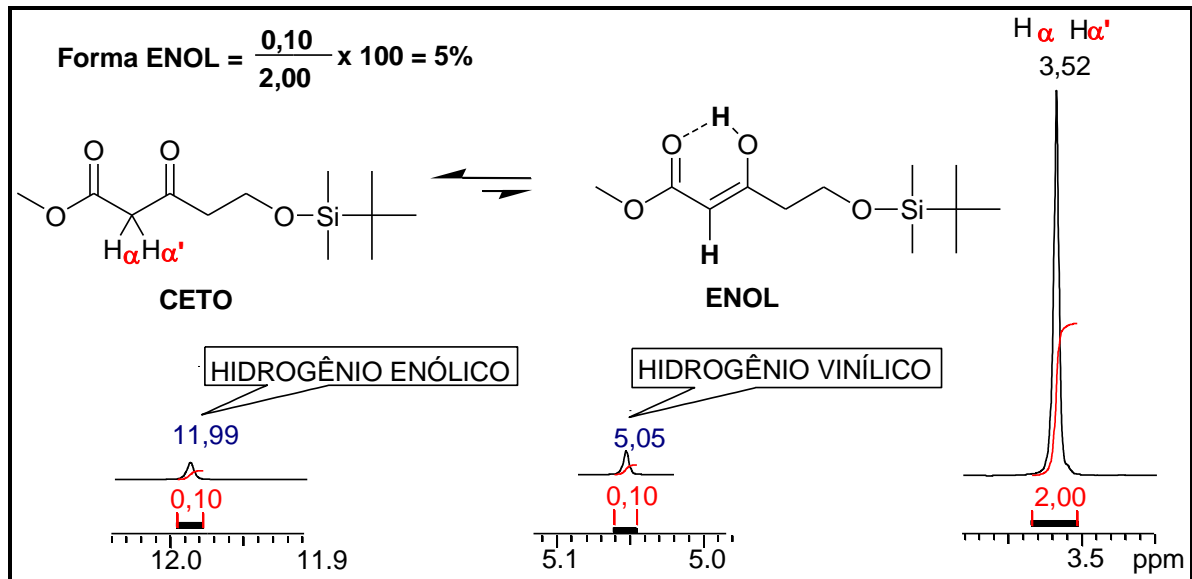
Esta última etapa da síntese finaliza o preparo do substrato (**15**) para biorredução os vegetais, através de uma oxidação química da hidroxila do carbono  $\beta$ , produzindo um  $\beta$ -cetoéster (Esquema 23). Para justificar que a transformação ocorreu o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do **15** revela além dos singletos dos hidrogênios da metoxila (3,74ppm), dos hidrogênios das metilas ligadas ao sítio (0,06ppm) e dos hidrogênios das metilas do grupo *terc*-butil (0,88ppm), que aparecem no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do **14** (Figura 17), também se observa um singlete devido os hidrogênios ligados ao carbono  $\alpha_1$  (3,52ppm) e dois tripletos devido aos hidrogênios ligados ao carbono  $\delta$  (3,91ppm) e aos hidrogênios ligados ao carbono  $\alpha_2$  (2,73ppm) (Figura 37). Estes dois tripletos, ambos apresentam constante de acoplamento característico  $J=6,2\text{Hz}$ .

Figura 37: Atribuições dos sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do 5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila



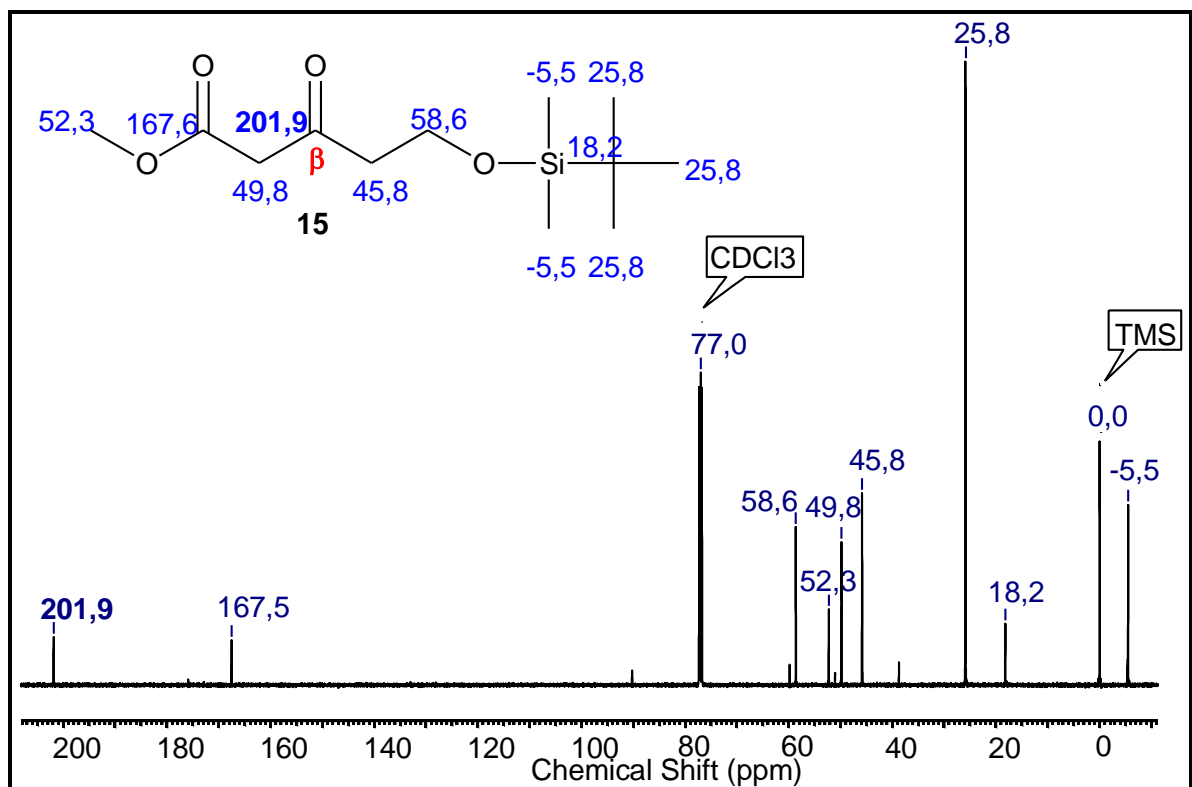
Um outra evidência da oxidação, refere-se aos singletos de pequenas intensidades, devido a proporção da forma enol, aqui de 5%, em relação a forma ceto no equilíbrio cetoenólico (Esquema 24).

Esquema 24: Proporção ceto e enólico para 5-(*tert*-butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila e valores de deslocamento químico no espectro de RMN de  $^1\text{H}$



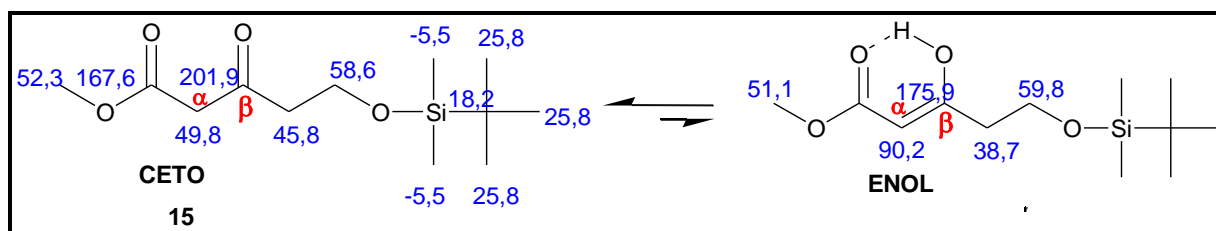
No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do **15**, atribui-se o sinal em 201,9ppm ao carbono da cetona (Figura 38), enquanto não aparece mais o sinal em 67,5ppm do carbono ligado a hidroxila, que aparece em **14** (Figura 36). Isso justifica a oxidação de álcool para cetona no referido carbono.

Figura 38: Atribuições dos sinais do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do 5-(*tert*-butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila



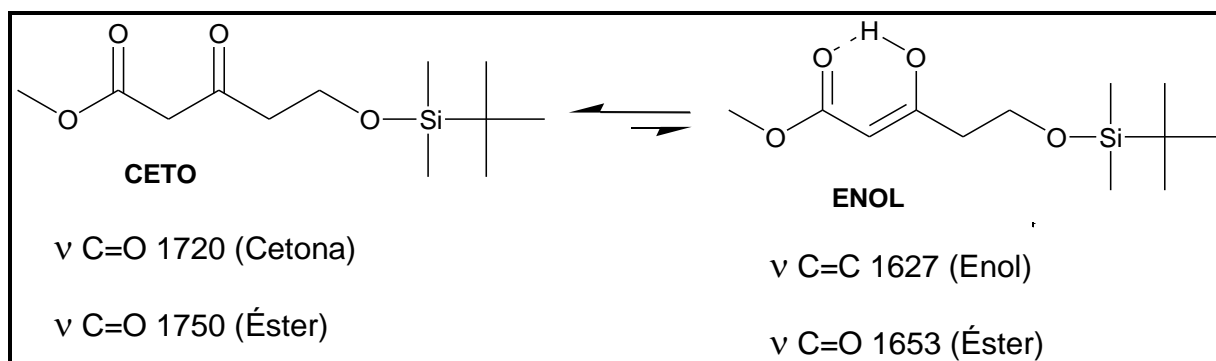
Os outros sinais de pequena intensidade que aparecem no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do **15** (Figura 38), devem-se à sobreposição do espectro da forma enol. No enol, principalmente, os carbonos  $\alpha$  e  $\beta$  apresentam deslocamentos químicos bastantes diferentes da forma ceto e outros apresentam deslocamentos químicos muito próximo dos correspondentes carbonos da forma ceto. Enquanto os deslocamentos químicos dos carbonos do grupo TBS da forma ceto e enol coincidem (Esquema 25).

Esquema 25: Equilíbrio cetoenólico para 5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila e valores de deslocamento químico no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$



O espectro no IV do **15** (Figura 19) evidencia a ocorrência da oxidação pelo não aparecimento da banda característica da ligação O-H de álcool e pelo aparecimento da banda em  $1720\text{cm}^{-1}$ , estiramento ( $\nu$ ) da ligação C=O e  $3430\text{cm}^{-1}$  a harmônica da banda em  $1720\text{cm}^{-1}$ . É possível destacar no espectro do **15** (Figura 19), as bandas que caracterizam a forma enol e a forma ceto no equilíbrio cetoenólico (Esquema 26). Além destas bandas, atribui-se a banda  $1253\text{cm}^{-1}$  às vibrações assimétricas das ligações C-C, C-O de éster. A banda intensa em  $1092\text{cm}^{-1}$  se atribui ao estiramento assimétrico das ligações C-O-Si e a banda intensa em  $833\text{cm}^{-1}$  resulta do estiramento da ligação Si-O.

Esquema 26: Equilíbrio cetoenólico para 5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila e valores de bandas de estiramentos ( $\nu$ ) no infravermelho





## 5.2 BIORREDUÇÃO DE $\beta$ -CETOÉSTERES COM *Dioscorea trifida* L. (INHAMBU) E *Opuntia ficus-indica* L. (PALMA)

As estruturas dos produtos de biorredução foram confirmados por CCD, CG, IV e rotação específica. As reações de biorredução foram monitoradas após 24, 48, 72, 96 e no máximo 120 horas de reação.

### 5.2.1 Biorredução de acetoacetato de etila (4)

O acetoacetato de etila (4) é uma substância simples e muito empregada na síntese de uma grande variedade de substâncias, como o feromônio (*S*)-sulcatol, os antibióticos (*R,R*)-grahamicina e carbomicina B, o fungicida (*R,R*)-pironoforina (TEMBA, OLIVEIRA e DONNICI, 2003), o aditivo para perfumes (*R*)-lavandulol (PERLES, 2006). Por esta razão, 4 tem sido escolhido por diversos pesquisadores para triagem de biocatalisadores capazes de realizar redução enantiosseletiva de  $\beta$ -cetoésteres.

Partindo das condições experimentais realizadas por Machado e colaboradores (2006), descritas no item 4.7.8, o acetoacetato de etila foi usado como modelo para o estudo de biorredução utilizando Inhambu e Palma.

As informações apresentadas no esquema 27, tabela 14, figuras 39 e 40 estão relacionadas e sumarizam os valores de conversão (C) e excesso enantiomérico (e.e.) determinados por CG em coluna quiral, conforme explicitado no item 4.6 e Anexo B.

As configurações absolutas dos álcoois formados foram determinadas conforme item 4.6 e Apêndice B.

Esquema 27: Biorredução do acetoacetato de etila

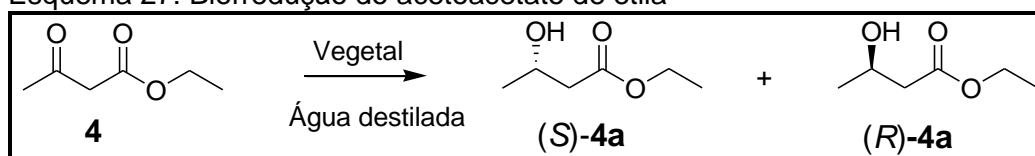


Tabela 14: Taxa de conversão (%C) e %e.e. em diferentes tempos (t) de reação do acetoacetato de etila

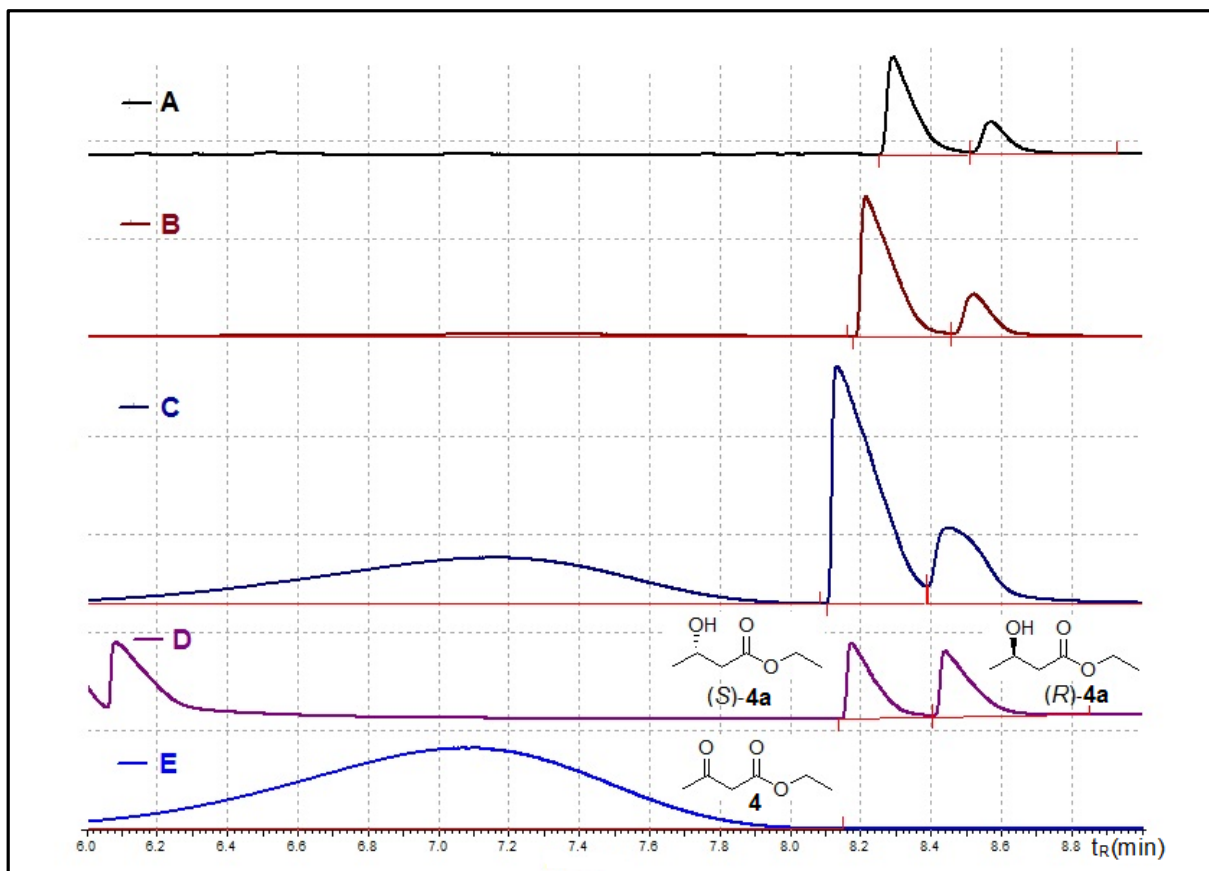
Entrada	Vegetal	t (h)	%C	%e.e.
1		24	49	45 (S)-4a
2	Inhambu	48	88	60 (S)-4a
3		72	100	53 (S)-4a
4	Palma	24	67	12 (R)-4a
5		48	78	78 (S)-4a
6		72	100	81 (S)-4a

De acordo com a literatura consultada, este é o primeiro relato de emprego de Inhambu como biocatalisador. Enquanto para Palma, se encontrou apenas um relato na bio-hidrólise do acetato de 1-fenilpropanol (Solís et al., 2010).

Ao comparar os valores obtidos (tabela 14), com os resultados encontrados na literatura, para o mesmo substrato, constata-se que, inhambu e palma apresentaram valores de conversão excelentes (100% em 72 horas) e e.e. consideráveis (inhambu e.e. de 60% em 48 horas e palma de 81% em 72 horas). Enquanto o rendimento máximo bruto alcançou a 20%.

A conversão foi completa em 72 horas (Tabela 14, entradas 3 e 6 e Figura 39A e 40A), equivalente aos resultados encontrados por Speicher e colaboradores (2003), utilizando espécies de musgos e plantas de aquário (*Marchantia polymorpha*, *Marchantia plicata*, *Riccia fluitans* e *Asterella blumeana*) e superiores aos valores relatados para aipim (*M. dulcis*) e mandioca (*M. esculenta*) (Machado et al., 2006), água de coco (*C. nucifera* L.) (Fonseca et al., 2009) e soja (*G. max*), (Bertini et al., 2012). Isso mostra que inhambu e palma apresentam ótima atividade biocatalítica, evidenciando que deve existir nestes vegetais, enzimas do tipo redutase em maior proporção e/ou mais adequada a transferência de hidreto à carbonila, em relação aos vegetais citados na literatura para o referido substrato.

Figura 39: Cromatogramas referentes à redução de acetoacetato de etila por *Dioscorea trifida* L. (Inhambu)



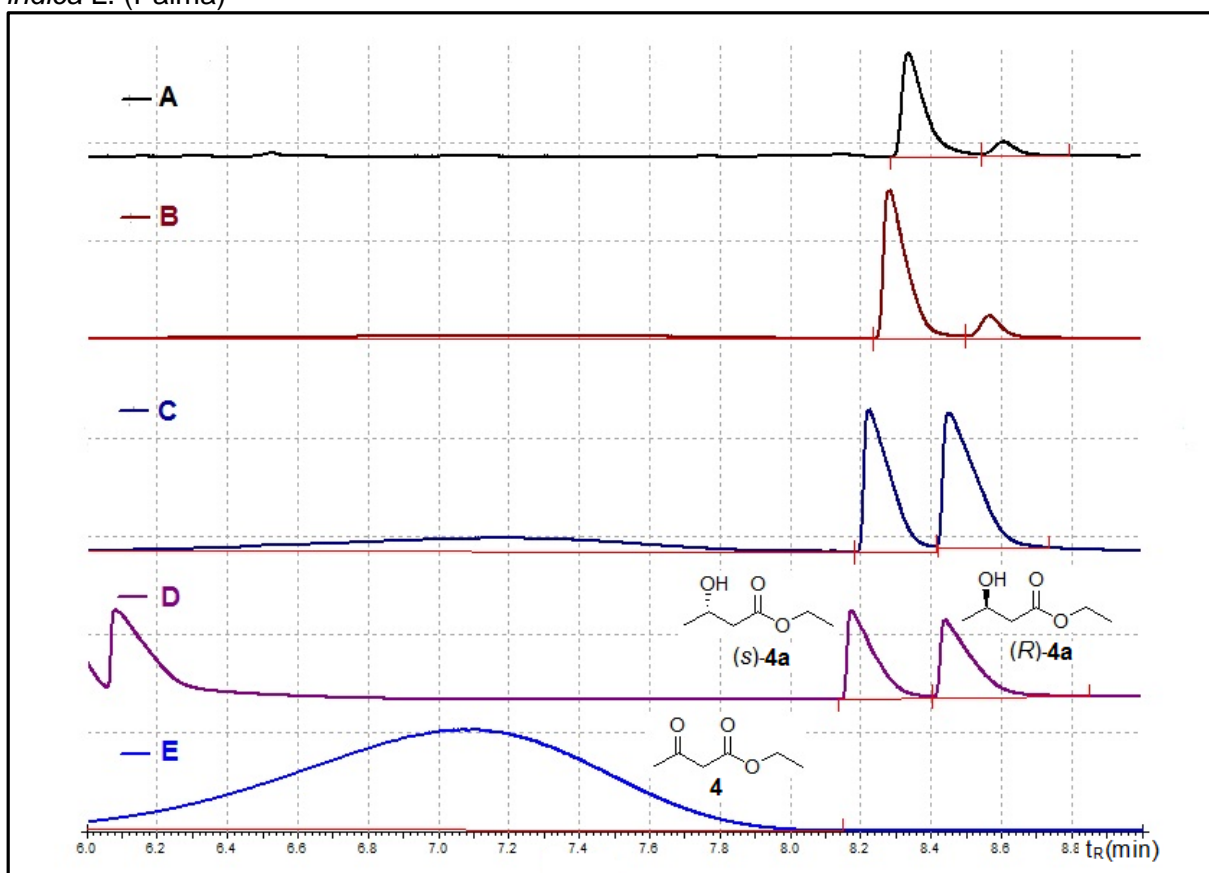
Legenda: Cromatogramas por CG em coluna quiral CYCLOSIL B (28,5m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m), temperatura 80°C por 3 min, elevada a taxa de 2°C/min de 80 até 100°C, usando AcOEt como solvente. Biorredução empregando inhambu em: **A**=72, **B**=48 e **C**=24 horas de reação; **D** – racemato obtido por NaBH<sub>4</sub>; **E** – Substrato.

Quanto aos resultados de e.e. obtidos com inhambu e palma (tabela 14, entradas 3 e 6, Figuras 39A e 40A), os vegetais forneceram valores inferiores a aipim (*M. dulcis*), mandioca (*M. esculenta*) (Machado et al., 2006) e água de coco (*C. nucifera* L.) (Fonseca et al., 2009). Isso indica presença de enzimas do tipo redutase, em inhambu e palma, com menor seletividade em relação as faces da carbonila para o substrato em estudo, quando comparado com vegetais relatados na literatura para esse mesmo substrato. Porém, estes valores ainda podem ser considerados promissores, por que os vegetais apresentaram excelente valores de conversão, principalmente, a palma que apresentou e.e de 81%.

Verificou-se que os produtos obtidos, tanto para inhambu quanto para palma, apresentaram predominância da configuração S. Logo, o enantiômero obtido segue a regra de Prelog (SIH e CHEN, 1984), ou seja, como relatado na literatura, o hidreto entra na carbonila pela face *Re*, devido ao acetoacetato de etila apresentar o grupo

alcóxi maior em relação ao grupo ligado à carbonila (NAKAMURA et al. 2003, p. 2661). Porém, destoantemente, constatou-se que em 24 horas (Tabela 14, entrada 4), a biorredução com palma produziu o álcool de configuração *R*, antiPrelog, o que significa predominância da entrada do hidreto pela face *Si* da carbonila. Isso justifica o e.e. de (*R*)-**4a** de apenas 12%, por ser um processo que envolve mais energia e portanto mais difícil de ocorrer (SIH e CHEN, 1984).

Figura 40: Cromatogramas referentes à redução de acetoacetato de etila por *Opuntia ficus-indica* L. (Palma)



Legenda: Cromatogramas por CG em coluna quiral CYCLOSIL B (28,5m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m), temperatura 80°C por 3 min, elevada a taxa de 2°C/min até 100°C, usando AcOEt como solvente. Biorreduções empregando palma em: **A**=72, **B**=48 e **C**=24 horas de reação; **D** – racemato obtido por NaBH<sub>4</sub>; **E** – Substrato

A inversão de configuração, ao longo do tempo de reação, foi relatada por Andrade e colaboradores (2006) e Souza (2013), empregando vegetais na bio-oxidação de feniletanol e biorredução de cetona aromática, respectivamente. Assim como estes autores sugeriram, pode-se justificar também a inversão de configuração como um mecanismo que ocorre em duas etapas, onde na primeira etapa, enzimas oxidorrredutases levam a formação de produtos com uma determinada

predominância enantiomérica e, na segunda etapa, os produtos da primeira etapa são oxidados ou reduzidos por outras enzimas oxidoredutases com preferência enantiomérica oposta às enzimas da primeira etapa. Isso corrobora o modelo de encaixe induzido enzima-substrato, mostrando a competitividade entre enzimas pelo sítio ativo do mesmo substrato, por estas apresentarem especificidade relativa ao mesmo substrato (BETTELHEIM, BROWN, CAMPBELL, FERREL, 2012).

Constatou-se que os resultados de rendimento foram muito inferiores aos resultados encontrados na literatura para o substrato modelo (**4**). Isso pode estar relacionado basicamente a três variáveis envolvidas no processo de extração da mistura reacional. A primeira delas envolve a solubilidade em água do solvente utilizado na extração (acetato de etila), cerca de 8% solúvel em água. Os componentes dispersos na fração solubilizada em água deixam de ser considerados no cálculo de rendimento. A segunda variável está relacionada as reações laterais promovidas por outras classes de enzimas que concorrem com as oxidases pelo mesmo substrato, degradando-o. E finalmente, a terceira variável pode envolver a dificuldade de extração de substrato e produto do meio celular por alcançarem compartimento da célula que impede o acesso do solvente.

### **5.2.2 Biorredução do acetoacetato de ciclo-hexila e acetoacetato de octila**

O acetoacetato de ciclo-hexila (**16**) e acetoacetato de octila (**17**) foram obtidos a partir da transesterificação do acetoacetato de etila (**4**), conforme item **4.7.5** e **4.7.6**, para se estudar o efeito cinético da conversão e da enantiosseletividade na mudança do grupo alcóxi.

SIH e CHEN (1984), empregaram fermento de padaria na biorredução do **17**. No entanto, a utilização do **16** em biocatálise é inédita, o que pode ser muito interessante, considerando que a importância do mesmo como bloco construtor quiral equivale ao que foi citado para **4** (item 5.2.1) e tendo em vista que **16** pode ser convertido em **4**, facilmente.

Os vegetais palma e inhambu foram empregados na biorredução de **16** e **17** (Esquema 28) e os valores de conversão (C), excessos enantioméricos (e.e.) foram resumidos na tabela 15.

Esquema 28: biorredução de acetoacetato de ciclo-hexila (**16**) e acetoacetato de octila (**17**)

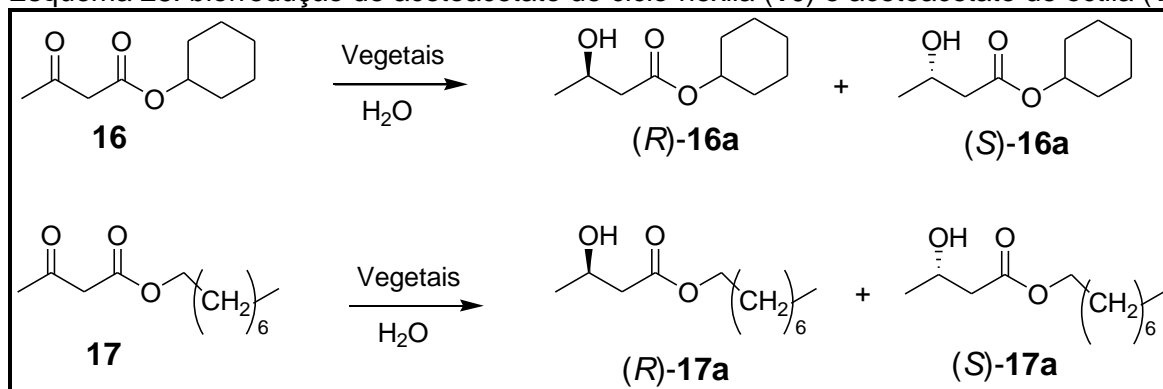


Tabela 15: Percentual de conversão (%C) e %e.e. em diferentes tempos (t) de reação obtidos a partir do acetoacetato de ciclo-hexila e do acetoacetato de octila

Entrada	β-cetoéster	Vegetal	t (h)	%C	%e.e.
1	<b>16</b>	Inhambu	72	98	50 (S)- <b>16a</b>
2			96	99	49(S)- <b>16a</b>
3			120	100	53 (S)- <b>16a</b>
4		Palma	72	90	58 (S)- <b>16a</b>
5			96	100	60 (S)- <b>16a</b>
6	<b>17</b>	Inhambu	24	6	33 (R)- <b>17a</b>
7			48	20	8 (S)- <b>17a</b>
8			72	28	6 (S)- <b>17a</b>
9		96	47	15 (R)- <b>17a</b>	
10		Palma	48	2	-
11			72	5	-

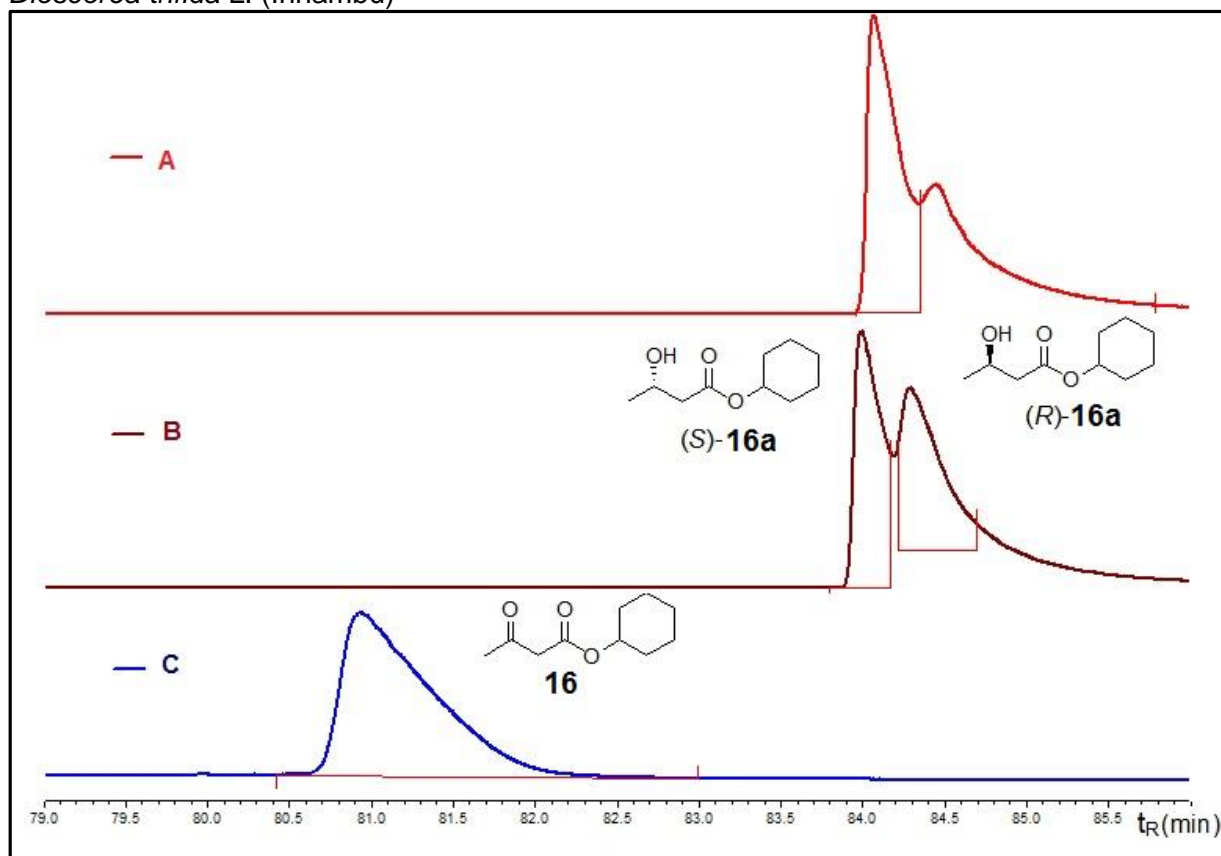
Os dois vegetais testados foram capazes de reduzir **16** com velocidades muito próximas às velocidades que reduziram **4** (substrato modelo). Enquanto **4** foi convertido, completamente, quando utilizado inhambu ou palma em 72 horas (Tabela 14, entrada 3), neste mesmo tempo de reação, **16** foi convertido 98% quando empregado inhambu e 90% quando foi utilizado palma (Tabela 15, entradas 1 e 4, respectivamente). A conversão do **16** se completou em 120 horas para inhambu e em 96 horas para palma (Tabela 15, entradas 3 e 5, respectivamente). Isso mostra que as oxidorredutases presentes nestes vegetais levam **16** um estado

de transição, com energia semelhante ao estado de transição formado a partir do **4** (BETTELHEIM, BROWN, CAMPBELL e FERREL, 2012).

Por limitação da coluna quiral utilizada, teve-se dificuldade na separação dos picos dos enantiômeros obtidos a partir de **16** e **17** (item 4.6, Figuras 41, 42, 43 e 44). A coluna foi eficiente na separação dos produtos dos substratos, mais ineficiente na separação dos enantiômeros.

A Figura 41 mostra o desempenho da coluna quando apresentava 30m de comprimento e a Figura 42 se refere aos cromatogramas em que a coluna apresentava comprimento de 28m. Os dados de conversão da tabela 15, entradas 1 a 5, foram calculados a partir dos cromatogramas apresentados nas figuras 41A e 42A a 42D. É possível verificar que os cromatogramas da figura 42 têm uma diferença de tempo de retenção ( $t_R$ ) de, aproximadamente, 1min menor, em relação a figura 41 e a resolução dos picos enantioméricos foram ainda mais comprometidos.

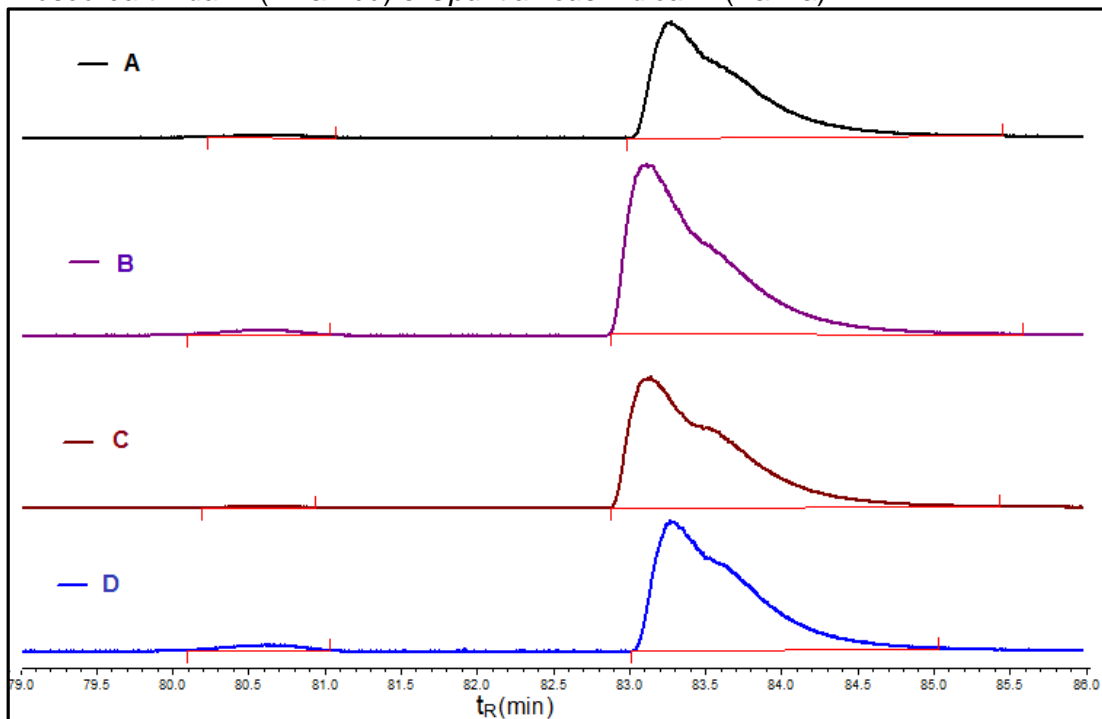
Figura 41: Cromatogramas referentes à redução do acetoacetato de ciclo-hexila por *Dioscorea trifida* L. (Inhambu)



Legenda: Cromatogramas obtidos por CG em coluna quiral CYCLOSIL B (30m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m), temperatura inicial de 40°C, elevada a uma taxa de 1°C/min até 150°C e usando AcOEt como

solvente. Biorreduções empregando inhambu em: **A**=120 horas, **B** – racemato obtido por NaBH<sub>4</sub>; **C** – Substrato

Figura 42: Cromatogramas referentes à biorredução do acetoacetato de ciclo-hexila por *Dioscorea trifida* L. (Inhambu) e *Opuntia ficus-indica* L. (Palma)



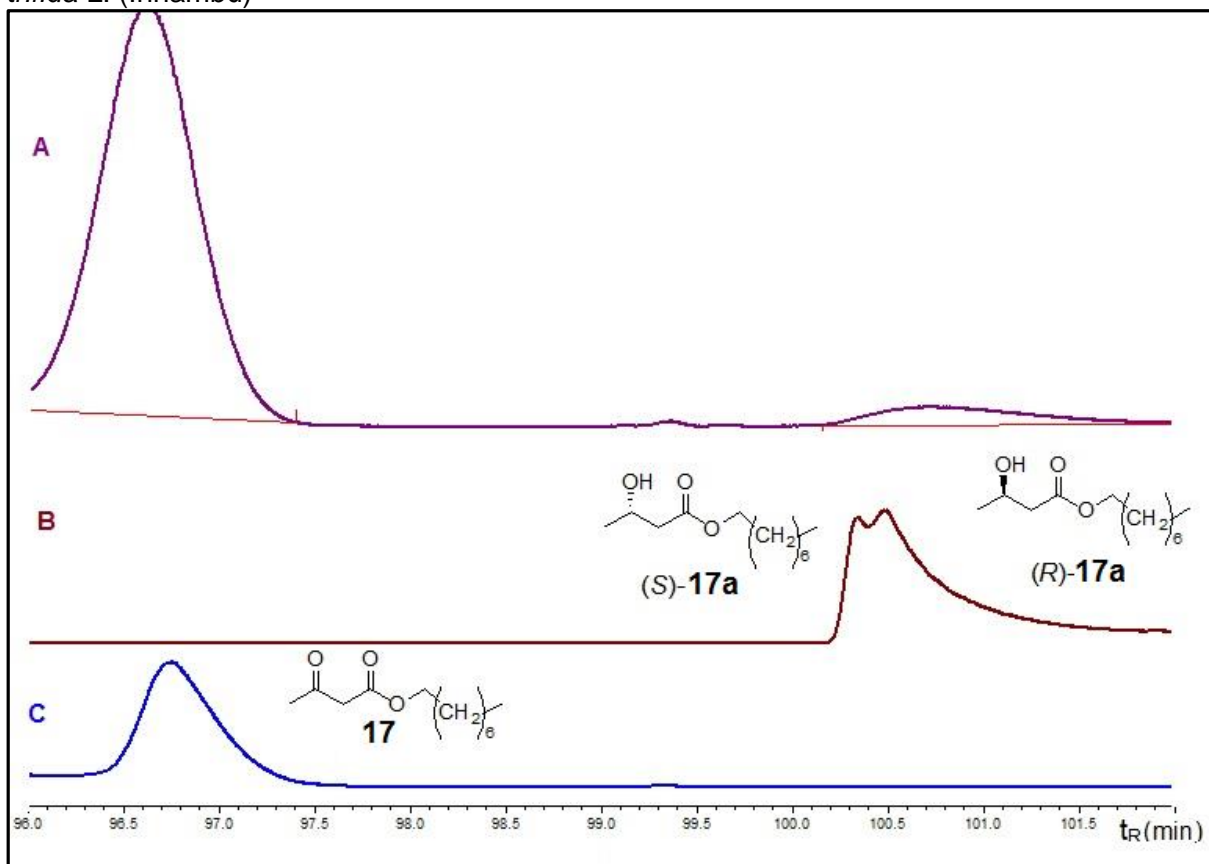
Legenda: Cromatogramas obtidos por CG em coluna quiral CYCLOSIL B (28,5m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m), temperatura inicial de 40°C, elevada a uma taxa de 1°C/min até 150°C e usando AcOEt como solvente. Biorreduções empregando **A**= inhambu por 96 horas, **B** – inhambu por 72 horas; **C** – palma por 96 horas **D** – palma por 72 horas

A biorredução do **17** empregando-se inhambu apresentou menor velocidade de conversão (tabela 15, itens de 6 a 11) e quando utilizada palma, praticamente, não ocorreu conversão.

Os valores de conversão, quando utilizado inhambu, foram de apenas 6% em 24 horas, 20% em 48 horas, 28% em 72 horas e 47% em 96 horas (Tabela 15, entradas 6 a 9, Figuras 43 e 44). Quando se empregou palma, a conversão variou de 2%, em 72 horas e 5% em 96 horas de reação (Tabela 15, entrada 10 e 11, Figura 45).

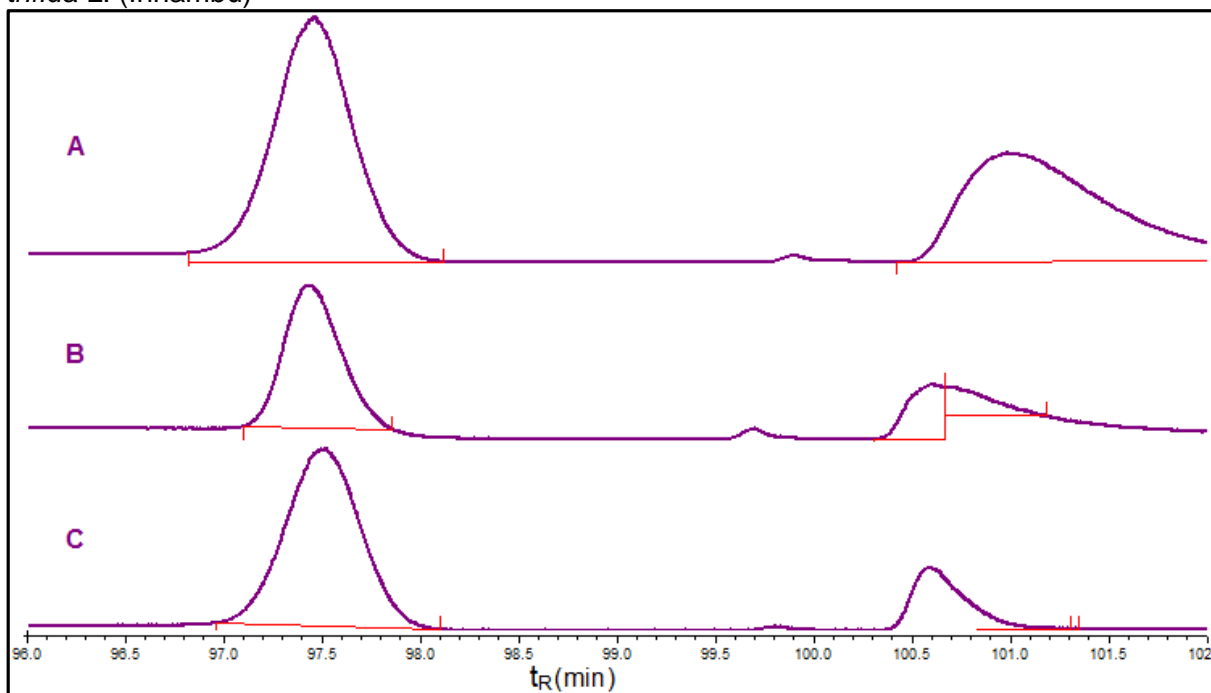


Figura 43: Cromatogramas referentes à redução do acetoacetato de octila por *Dioscorea trifida* L. (Inhambu)



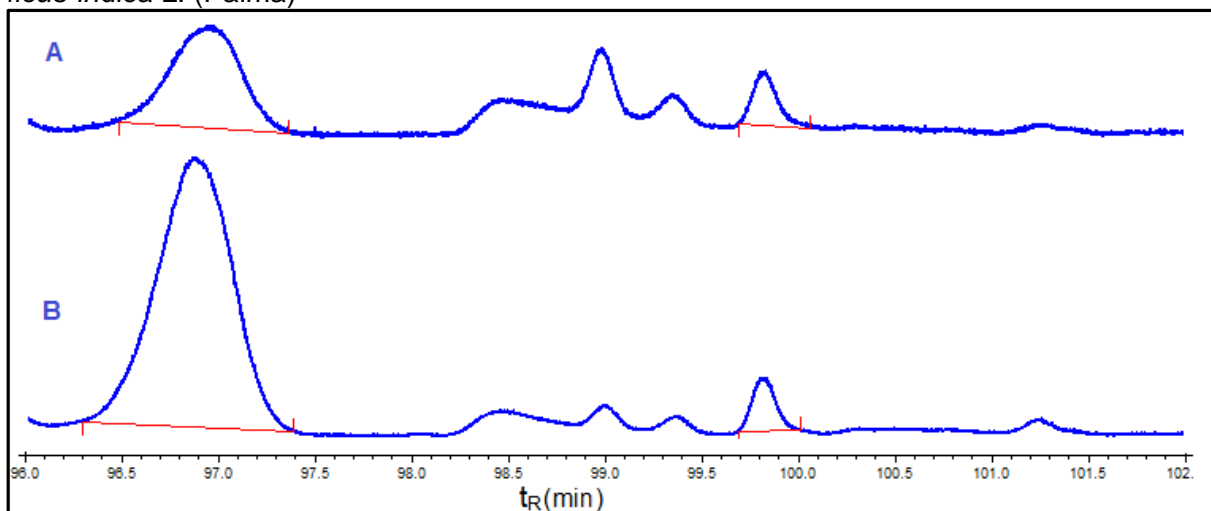
Legenda: Cromatogramas obtidos por CG em coluna quiral CYCLOSIL B (28,5m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m), temperatura inicial de 40°C, elevada a uma taxa de 1°C/min até 150°C e usando AcOEt como solvente. Biorreduções empregando inhambu em: **A**=24 horas, **B** – racemato obtido por NaBH<sub>4</sub>; **C** – Substrato

Figura 44: Cromatogramas referentes à biorredução do acetoacetato de octila por *Dioscorea trifida* L. (Inhambu)



Legenda: Cromatogramas obtidos por CG em coluna quiral CYCLOSIL B (30m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m), temperatura inicial de 40°C, elevada a uma taxa de 1°C/min até 150°C e usando AcOEt como solvente. **A** – 96 horas, **B** – 72 horas; **C** – 48 horas

Figura 45: Cromatogramas referentes à biorredução do acetoacetato de octila por *Opuntia ficus-indica* L. (Palma)



Legenda: Cromatogramas obtidos por CG em coluna quiral CYCLOSIL B (28,5m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m), temperatura inicial de 40°C, elevada a uma taxa de 1°C/min até 150°C e usando AcOEt como solvente. **A** – 72 horas, **B** – 48 horas

Além disso, durante a reação, **17** sofreu grande perda de massa, alcançando rendimento bruto de no máximo 8% nas reações de 96 horas empregando-se

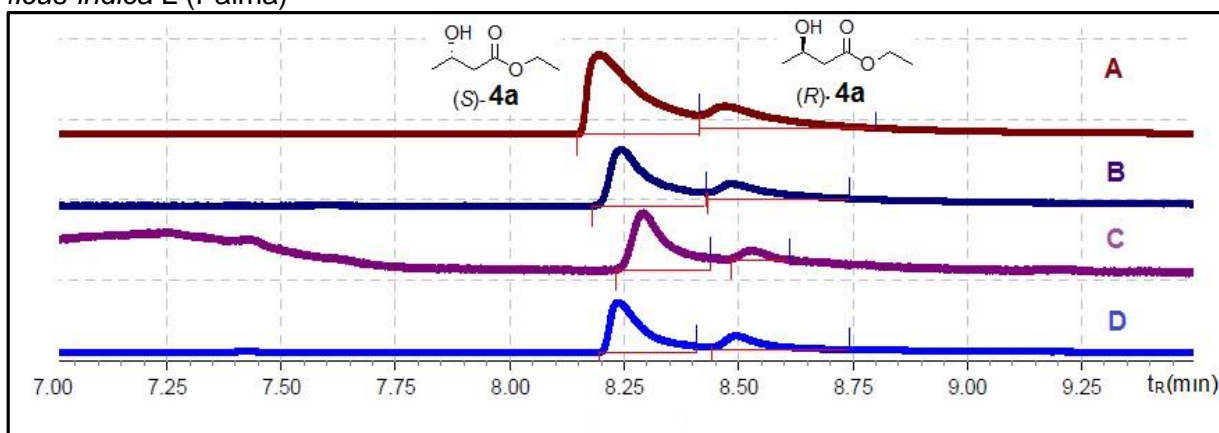
inhambu, enquanto para **4** resultou em até 20% de rendimento bruto, em 72 horas e **16** foi obtido em 50% de rendimento bruto, em 96 horas. Nas reações em que se empregou palma na biorredução de **17**, o rendimento bruto alcançou no máximo 5%, em 72 horas. Isso sugere a presença de outras classes de enzimas, presentes nos vegetais, em que suas biotransformações predominaram sobre as oxidorredutases.

Os cromatogramas obtidos após a transesterificação da mistura de (*R*)-**16a** e (*S*)-**16b** (dados de conversão e e.e. na Tabela 15, entradas de 1 a 5), apresentam picos melhores resolvidos (Figura 46), em comparação com o cromatogramas obtidos, diretamente, da mistura enantiomérica (*R*)-**16a** e (*S*)-**16b** (Figura 41 e 42). Eles também confirmam o mesmo perfil dos cromatogramas obtidos diretamente da mistura enantiomérica (*R*)-**16a** e (*S*)-**16b** (Figura 41 e 42), em que o enantiômero em excesso é o que apresenta menor tempo de retenção.

Analisando os perfis cromatográficos obtidos dos produtos transesterificados (Figura 46), constata-se que se obteve a mistura enantiomérica de (*R*)-**4a** e (*S*)-**4a** (Figura 40), pois os tempos retenções ( $t_R$ ) dos picos coincidem e revelam que o enantiômero em excesso é também o (*S*)-**4a**.

As evidências dos perfis cromatográficos e seus  $t_R$  (Figura 46) revelam que inhambu resultou preferencialmente no álcool com configuração *S*, como ocorreu com os álcoois obtidos a partir do acetoacetato de etila (**4**). Os resultados de e.e. também são equivalentes aos valores encontrados para **4** (Figura 40).

Figura 46: Cromatogramas referentes aos produtos transesterificados a partir dos produtos de biorredução do acetoacetato de ciclo-hexila por *Dioscorea trifida* L. (Inhambu) e *Opuntia ficus-indica* L. (Palma)

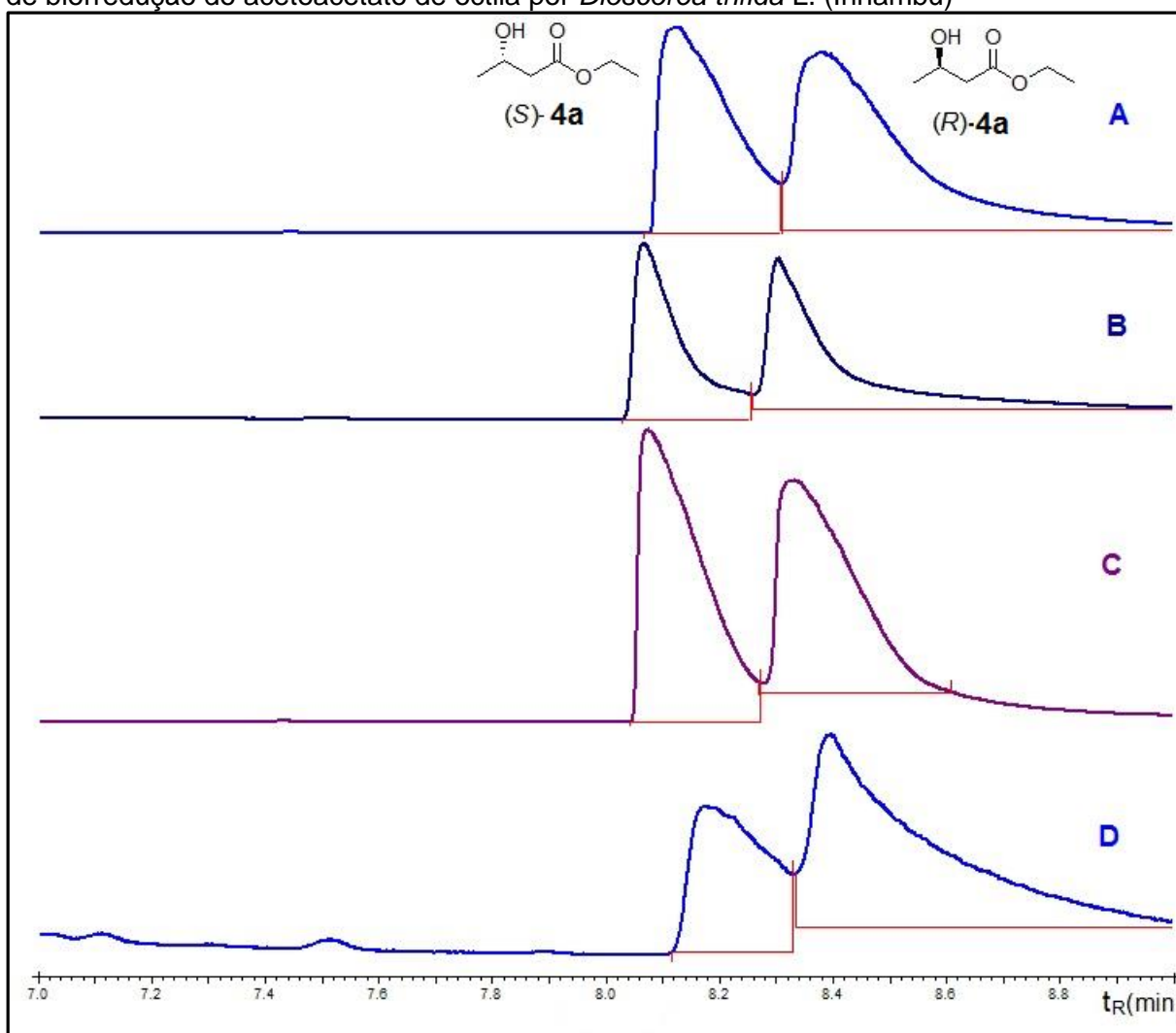


Legenda: Cromatogramas por CG em coluna quiral CYCLOSIL B (28,5m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m), temperatura 80°C por 3 min, elevada a taxa de 2°C/min até 100°C, usando EtOH como solvente. Biorreduções do **16** empregando: **A**= inhambu por 96 e **B**= inhambu 120 horas; **C**= palma por 72 e **D**= palma por 96 horas.

A transesterificação da mistura (*R*)-**17a** e (*S*)-**17a** resultante da biorredução por palma não foi realizada devido à baixa conversão do substrato e pequeno rendimento bruto.

A transesterificação da mistura (*R*)-**17a** e (*S*)-**17a** realizada a partir da biorredução empregando inhambu revelou baixa seletividade (Tabela 15, entradas de 6 a 10; Figura 47).

Figura 47: Cromatogramas referentes aos produtos transesterificados a partir dos produtos de biorredução do acetoacetato de octila por *Dioscorea trifida* L. (Inhambu)



Legenda: Cromatogramas por CG em coluna quiral CYCLOSIL B (28,5m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m), temperatura 80°C por 3 min, elevada a taxa de 2°C/min até 100°C, usando EtOH como solvente. Biorreduções do **17** empregando inhambu: **A**= 24; **B**= 48; **C**= 72 e **D**= 96 horas.

A biorredução empregando inhambu por 24 e 96 horas resultou preferencialmente no álcool com configuração *R* e e.e. de 33% e 15%,

respectivamente (Tabela 15, entradas 6 e 9; Figura 47, D e A). As reações que ocorreram por 48 e 72 horas, apresentaram e.e. de 8% e 6%, respectivamente, e configuração *S* (Tabela 15, entradas 7 e 9; Figura 47, B e C). Estes resultados mostram que a biorredução do **17** não seguiu uma regra definida. Ora apresentou álcool de configuração *R* (regra antiPrelog), ora álcool de configuração *S* (regra de Prelog), mais com maior predominância da configuração *R*.

Conforme justificou Chen e colaboradores (1984), no estudo da biorredução de  $\gamma$ -cloro, $\beta$ -cetoésteres por fermento de padaria, a razão para as oxidorredutases que transferem hidreto pela face *Si* serem favorecidas, em relação às oxidorredutases que transferem pela face *Re*, sugere diferente permeabilidade dos substratos para acessar cada sistema de enzimas. Enquanto as oxidorredutases *Re* podem se localizar na célula, dentro da membrana mitocondrial, as oxidorredutases *Si*, podem estar dentro de um compartimento da matriz mitocondrial. Como consequência, os autores justificam que, pode ser mais fácil os substratos com grupos alcóxi maiores entrarem no compartimento da mitocôndria, levando à formação preferencial de álcoois com configuração *R*. Da mesma forma os substratos com grupo alcóxi pequeno não podem acessar de forma eficaz aos sistemas de enzimas *Si*, levando à formação de álcoois com predominância da configuração *S*.

### 5.2.3 Biorredução do 5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila (**15**)

O 5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila (**15**) foi obtido a partir da metodologia estudada pelo grupo (Victor et al., 2010), conforme itens **4.7.1** a **4.7.4**, para se estudar o efeito cinético da conversão e da enantiosseletividade na diminuição do grupo alcóxi e aumento do grupo vizinho a carbonila.

A importância do **15** está relacionada às sínteses de estatinas, uma classe de substâncias utilizadas para reduzir os níveis de colesterol através da inibição da enzima redutase HMG-CoA, no fígado. Os níveis de colesterol aumentados se relacionam às doenças cardiovasculares, e as estatinas, portanto, são utilizadas na prevenção destas doenças. Atualmente há no mercado um grande número de estatinas e denominações comerciais já bem conhecidas: atorvastatina (Lipitor e Tovasti), fluvastatina (Lescol), lovastatina (Mevacor, Altacor, Altoprev), pitavastatina

(Livalo, Pitava), pravastatina (Pravachol, Selektine, Pravastatina), rosuvastatina (Crestol) e sinvastatina (Zocor, Lipex) (PICHANDI et al., 2011)

A biorredução do **15**, empregando-se inhambu e palma, forneceu os enantiômeros (*R*)-**15a** e (*S*)-**15a** (Esquema 29), uma mistura enantiomericamente enriquecida do álcool de configuração *R* (Tabela 16). Nas figuras 48 e 49, encontram-se os cromatogramas referentes à biorredução do **15** por inhambu e palma, respectivamente, dos quais foram extraídos os valores de conversão e e.e. apresentados na tabela 16.

Esquema 29: Biorredução do 5-(*tert*-butildimetilsilóxi)-3-oxopentanoato de metila (**17**)

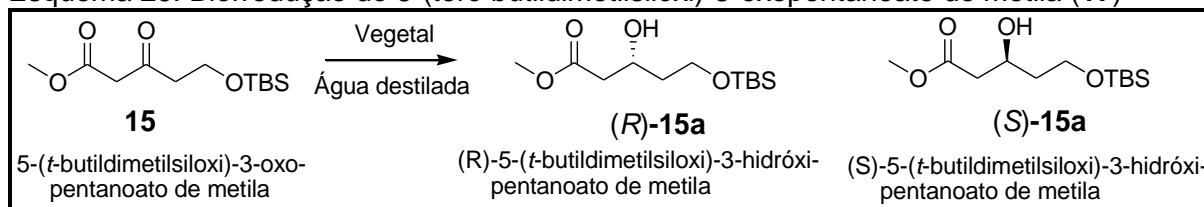
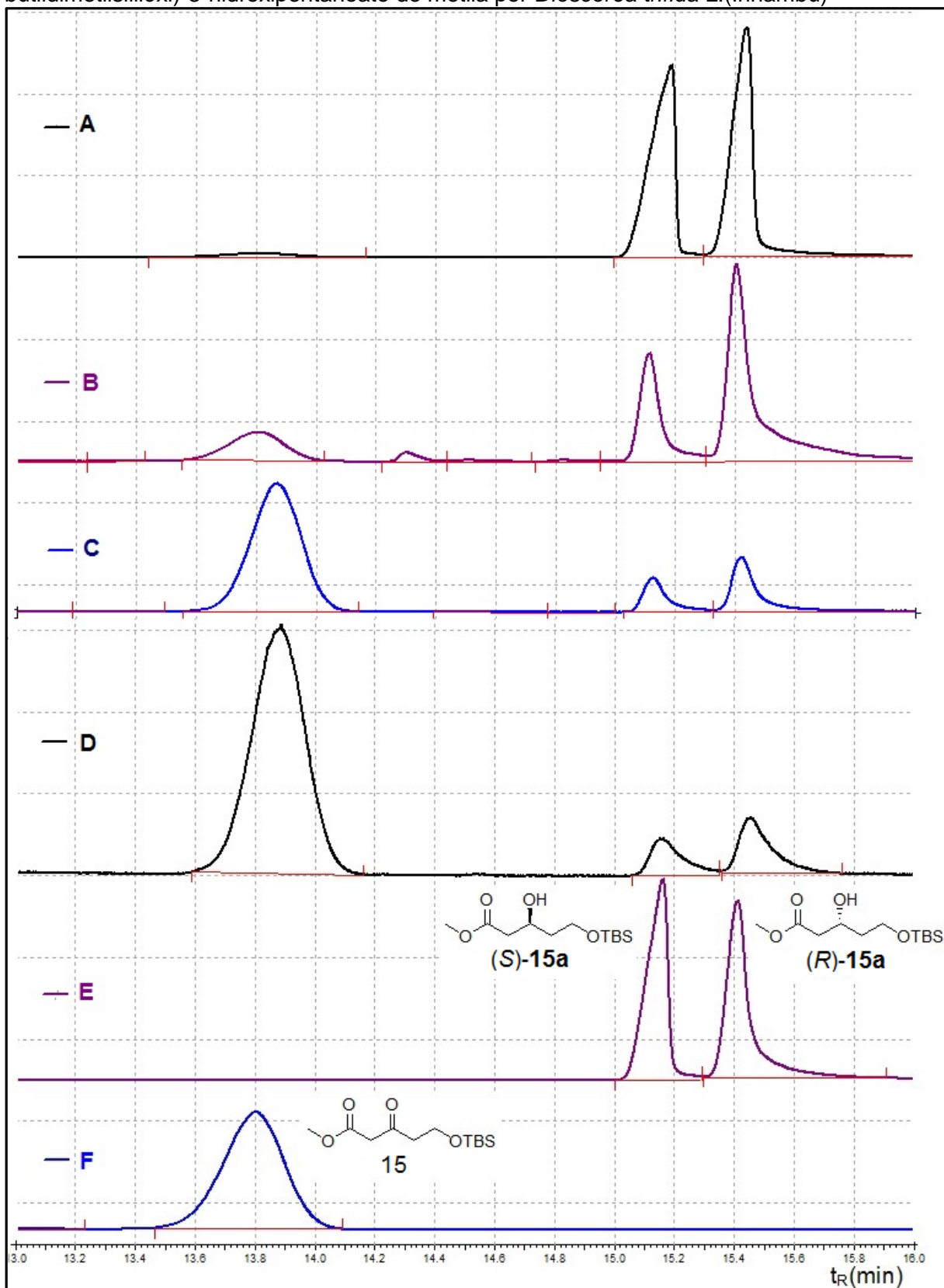


Tabela 16: Percentual de conversão (%C) e %e.e. em diferentes tempos (t) de reação do 5-(*tert*-butildimetilsilóxi)-3-oxopentanoato de metila

Entrada	b-cetoéster	Vegetal	t (h)	%C	%e.e.
1	<b>15</b>	Inhambu	24	19	20 ( <i>R</i> )- <b>15a</b>
2			48	25	26 ( <i>R</i> )- <b>15a</b>
3			72	83	30 ( <i>R</i> )- <b>15a</b>
4			96	97	2 ( <i>R</i> )- <b>15a</b>
5		Palma	24	12	5 ( <i>S</i> )- <b>15a</b>
6			48	42	32 ( <i>R</i> )- <b>15a</b>
7			72	87	41 ( <i>R</i> )- <b>15a</b>

Figura 48: Cromatogramas referentes aos produtos de biorredução do 5-(*tert*-butildimetilsilóxi)-3-hidroxipentanoato de metila por *Dioscorea trifida* L. (Inhambu)

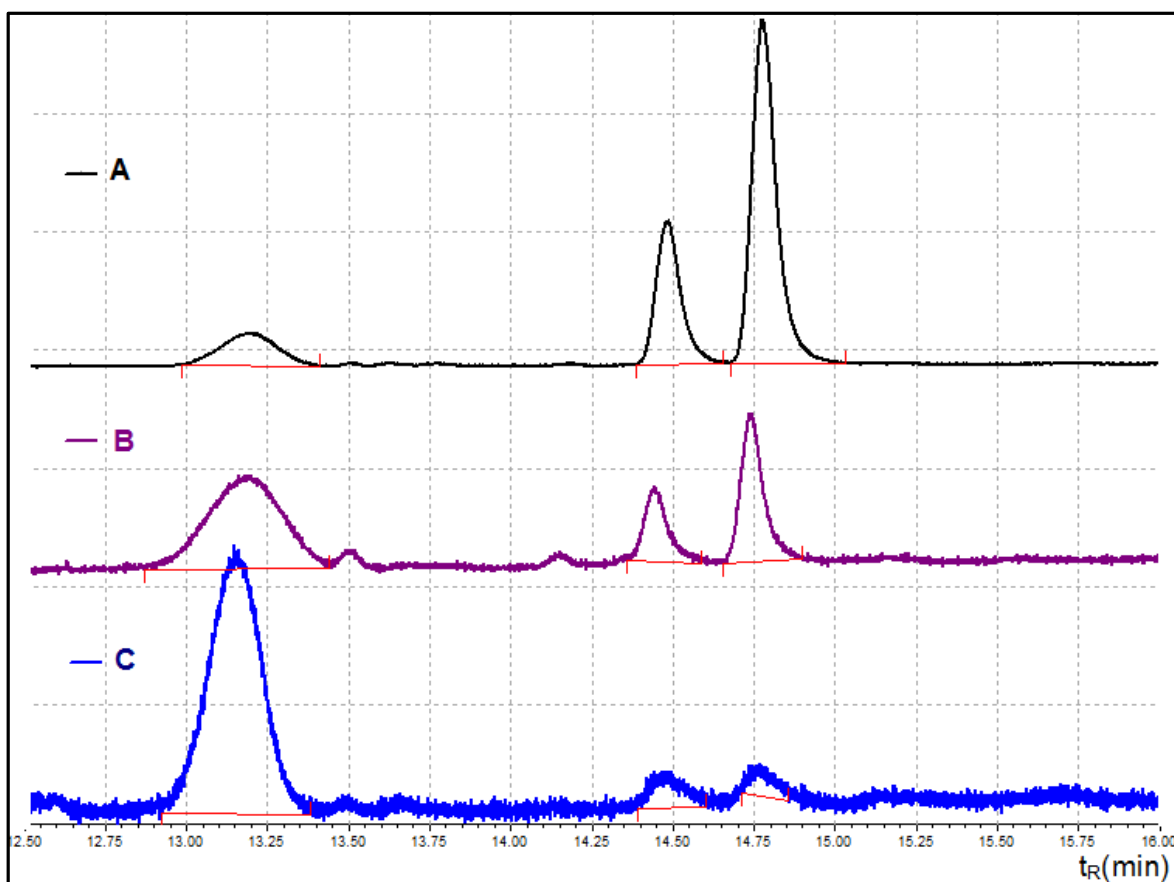


Legenda: Cromatogramas por CG em coluna quiral CYCLOSIL B (30m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m), temperatura 130°C por 3 min, elevada a taxa de 2°C/min até 200°C, usando AcOEt como solvente.

Biorreduções do **15** empregando inhambu: **A**= 96, **B**= 72, **C**=48; **D**= 24 horas; **E**= (S/R)-5-(*t*-butildimetilsililóxi)-3-hidroxipentanoato de metila (racemato); **F**= Substrato

Comparando os valores de conversão obtidos na biorredução do **15** por inhambu e palma, com os resultados obtidos para o substrato modelo, acetoacetato de etila (**4**), verifica-se que **15** apresentou resultados modestos. Enquanto **4** foi convertido completamente, por inhambu, e por palma em 72 horas (Tabela 14, entrada 3 e 6), **15** apresentou conversão de 83% para biorredução por inhambu e 87% quando foi biorreduzido por palma (Tabela 16, entradas 3 e 7, respectivamente). Isso mostra um potencial menor das oxidorreduções presentes nesses vegetais para converter **15**, quando comparada com **4**. Entretanto, considerando que se obteve 45% de rendimento bruto para a biorredução do **15** em 72 horas, enquanto que só foi obtido 20% de rendimento bruto do **4**, estes resultados de conversão ainda podem ser considerados satisfatório para uma primeira avaliação.

Figura 49: Cromatogramas referentes aos produtos de biorredução do 5-(*tert*-butildimetilsililóxi)-3-hidroxipentanoato de metila por *Opuntia ficus-indica* L.(Palma)



Legenda: Cromatogramas por CG em coluna quiral CYCLOSIL B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm), temperatura 130°C por 3 min, elevada a taxa de 2°C/min até 200°C, usando AcOEt como solvente. Biorreduções do **15** empregando palma: **A**= 72, **B**= 48, **C**=24 horas.



Com relação aos excessos enantioméricos (e.e.) obtidos na biorredução do **15** empregando-se inhambu e palma, os melhores resultados foram obtidos em 72 horas. Utilizando-se palma, verificou-se e.e. de 41% e conversão de 87% (Figura 49A), quando se empregou inhambu, o e.e. alcançou 30% com conversão de 83%(Figura 48B). Quando a biorredução, empregando-se inhambu durante 96 horas, alcançou-se uma conversão maior (97%), mas o e.e. se reduziu para 2% (Figura 48A).

Verifica-se que a biorredução do substrato em questão resultou na configuração predominante do enantiômero (*R*)-5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-hidroxipentanoato de metila (**15a**). Este resultado era esperado, pois de acordo com a regra de Prelog, quando  $\beta$ -cetoéster apresenta o grupo vizinho à carbonila maior de que o grupo alcóxi, a biorredução tende a levar ao álcool de configuração predominante *R* (SIH e CHEN, 1984).

Considerando que este estudo foi realizado em uma mesma condição reacional e que o controle estereoquímico da reação de biocatálise pode ser alcançada através da otimização das condições reacionais (NAKAMURA et al., 1996), estudo futuro deve investigar outras condições reacionais para os vegetais e os substratos estudados, conforme sugere levantamento bibliográfico aqui apresentado.

Álcool enantiosseletivamente puro foi alcançado na biorredução de  $\beta$ -cetoesteres e cetona aromática por feijão de corda (*Vigna unguiculata*) com a utilização de 2% de isopropanol na mistura reacional (BIZERRA et al., 2010). Nakamura e colaboradores obtiveram excelentes excessos enantioméricos na biorredução de acetofenona por células tratadas de *G. candidum* e adição de coenzima (NAD<sup>+</sup>, NAPD<sup>+</sup>) a aditivos (2-propanol e ciclopentanol). Excelentes resultados de enantiosseletividades foram observados na redução de  $\beta$ -cetoésteres por leveduras, utilizando pequenas proporções de solventes polares e apolares (SMALLRIDGE et al., 1994).

Portanto, há uma grande variedade de opções, aqui não exploradas, para otimização reacional que podem potencializar os resultados de rendimentos e excessos enantioméricos dos produtos aqui obtidos, com alta probabilidade de sucesso.

## 6. CONCLUSÕES

Dentre os quatro  $\beta$ -cetoésteres pesquisados, o substrato modelo, acetoacetato de etila, foi o que apresentou melhor resultado de conversão e excesso enantiomérico nas condições testadas para os vegetais estudados.

De acordo com a literatura consultada, este é o primeiro relato do emprego de *Dioscorea trifida* L. e *Opuntia ficus-indica* L. na biorredução de  $\beta$ -cetoésteres e também o primeiro emprego de acetoacetato de ciclo-hexila e 5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila como substratos para biocatálise, onde se conclui que este é um estudo inédito, no que se refere o emprego destes vegetais como biocatalisadores e destas duas substâncias como substratos na biocatálise.

Entre os dois vegetais testados, *O. ficus-indica* apresentou melhor resultado para todos os substratos. Dentre estes, o melhor resultado foi obtido empregando o substrato modelo, que foi convertido completamente em 72 horas e apresentou excesso enantiomérico de 81% para *Opuntia ficus-indica* L. e 53% para *Dioscorea trifida* L., ambos, do enantiômero (*S*)-3-hidroxibutanoato de etila. Isso coloca *Opuntia ficus-indica* L. como o mais promissor para a biocatálise.

A biorredução do acetoacetato de ciclo-hexila, empregando-se *Dioscorea trifida* L., apresentou resultados de conversão e excessos enantioméricos equivalentes aos obtidos com o substrato modelo. Considerando que a biorredução do acetoacetato de ciclo-hexila se empregando os vegetais proporcionou maior rendimento, conclui-se, portanto, que o acetoacetato de ciclo-hexila se apresenta como um substrato mais vantajoso na biocatálise, empregando-se *Dioscorea trifida* L., por proporcionar maior rendimento reacional.

O acetoacetato de octila foi preparado para tentar aumentar a enantiosseletividade, mas não produziu resultados satisfatórios. A biorredução do acetoacetato de octila, empregando-se os vegetais estudados, apresentou baixa velocidade de conversão e pequeno rendimento de uma mistura pouco enriquecida enantiomericamente, onde ora apresentou pequeno excesso do enantiômero de configuração *R* (Prelog) ou ora apresentou pequeno excesso do enantiômero de configuração *S* (antiPrelog).

Assim, como ocorre com o substrato modelo, os vegetais estudados produziram álcoois conforme a regra de Prelog para o substrato acetato de ciclo-hexila, concluindo-se que as oxidorreduções presentes nesses vegetais transferem hidreto à carbonila deste substrato, predominantemente, pela face *Re*.

Construído intencionalmente para inverter a configuração dos correspondentes álcoois, gerados a partir da biorredução empregando vegetais, o 5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila, correspondeu a esta expectativa. O mesmo produziu excesso enantiomérico do álcool (*R*)-5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-hidroxipentanoato de metila. Portanto, conclui-se que as oxirreduções presentes nos vegetais transferiram hidretos, preferencialmente, pela face *Si* da carbonila. Os melhores resultados de conversão e excessos enantioméricos foram alcançados após 72 horas de reação. Quando se empregou *D. trifida*, obteve-se 83% de conversão e excesso enantiomérico de 32% e quando se utilizou *O. ficus-indica* o melhor resultado foi 87% de conversão e 41% de excesso enantiomérico. Este resultado coloca o 5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila com boas expectativas para obtenção de álcool de configuração oposta aos álcoois obtidos a partir de acetoacetato de etila e acetoacetato de ciclo-hexila.

Conclui-se, portanto, que os ajustes dos tamanhos relativos dos grupos alcóxi e alquila ligados à carbonila de  $\beta$ -cetoésteres podem controlar a estereoquímica dos correspondentes álcoois produzidos a partir da biorredução com os vegetais *D. trifida* e *O. ficus-indica*.

## 7. PERSPECTIVAS

- ✓ Estudar o desempenho do substrato (*R*)-5-(*terc*-butildimetilsililóxi)-3-oxopentanoato de metila com outras biomassas.
- ✓ Avaliar o desempenho de separação dos produtos obtidos a partir do acetoacetato de ciclo-hexila e acetoacetato de octila com uma coluna quiral mais eficiente.
- ✓ Investigar a estereoquímica de  $\beta$ -cetoésteres com outros grupos ligados à carbonila.
- ✓ Desenvolver métodos analíticos de extração dos produtos obtidos por biorredução para viabilizar síntese por biorredução.
- ✓ Isolar e caracterizar enzimas com atividade biorredutora presentes em *D. trifida* e *O. ficus-indica*.
- ✓ Estudar o efeito de aditivos e inibidores no controle estereoquímico da biorredução de  $\beta$ -cetoésteres empregando *Dioscorea trifida* L. e *Opuntia ficus-indica* L.

## 8. REFERÊNCIAS

ALVES, J.C.R. **Perspectivas de utilização de figueira-da-índia no Alentejo: Caraterização de (*Opuntia sp.*) no litoral alentejano e na Tapada da ajuda e estudo de instalação de um pomar.** Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Agronômica. Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.

ANDRADE, L. H.; UTSUNOMIYA, R. S.; OMORI, A. T.; PORTO, A. L. M.; COMASSETO, J. V. Edible catalysts for clean chemical reactions: Bioreduction of aromatic ketones and biooxidations of secondary alcohols using plants. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 38, p. 84-90, 2006.

ARAGOZZINI, F.; VALENTI, M.; SANTIELLO, E.; FERROBOSCHI, P. Process for production of optically active 4-cloro-3-hidroxybutyric acid esters. **Biocatalysis**, v. 5, p. 325-332, 1992.

ASSUNÇÃO, J. C. C. **Reações de biocatálises utilizando sistemas de células íntegras e de enzimas imobilizadas de *Saccharum officinarum* Linn. (Cana de Açúcar).** Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Centro de Ciências – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, 2008.

BARBOSA, L.C. de A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos.** Ed. UFV, Viçosa – MG, 2007

BERLIN, J.; Mollenschott, C.; Herminghaus, S.; Fecker, L.F.; Lysine decarboxylase transgenic tobacco root cultures biosynthesize novel hydroxy cinnamoyl cadaverines. **Phytochemistry**. v. 48, p. 79–84, 1998.

BETTELHEIM, F. A.; BROWN, W. H.; CAMPBELL, M. K; FERREL, S. O. **Intrdução a Bioquímica**, 9ª ed. Trad. Azzellini, G. C.; SILVA, M. de C. São Paulo: Cengage Learning, 2012.

BIZERRA, A. M.; GONZALO, G.; LAVANDERA, I.; GOTOR-FERNANDEZ, V.; MATTOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; LEMOS, T. L. G.; GOTOR, V. Reduction processes biocatalyzed by *Vigna unguiculata*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 21, p. 566-570, 2010.

BLANK, L. M.; EBERT, B. E.; BUEHLER, K.; BÜHLER, B. Redox biocatalysis and metabolism: molecular mechanisms and metabolic network analysis. **Antioxidants & Redox Signaling**, v 13, p. 349-392, 2010.

BONNI, C.; DI FABIO, R.; SOTGIU, G.; CAVAGNERO, S. Oxirane rings: studies and applications of a new chemo- and regioselective opening of epoxides. **Tetrahedron**, v 45 (10), p. 895 -904, 1989.

BOUSALEM, M.; VIADER, V.; MARIAC, C.; GOMEZ, R.; HOCHU, I.; SANTONI, S.; DAVID, J. Evidence of diploidy in the wild Amerindian yam, a putative progenitor of the endangered species *Dioscorea trifida* (Dioscoreaceae). **Genome** v. 53 p. 371–383, 2011.

BRESSAN, E. de A. **Diversidade isoenzimática e morfológica de inhame (*Dioscorea spp.*) coletados em roças de agricultura tradicional do Vale do Ribeira –SP**. 2005. Dissertação (Mestrado e, Ecologia de Agroecossistemas) – Ecologia de Agroecossistema, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/91/91131/tde-01122005-164919.htm>>. Acesso em: 18-11-2014.

BUSTO, E; FERNANDEZ, V. G.; GOTOR, V. Kinetic resolution of 4-cloro-2-(hidroxyalkyl) pyridines using pseudomonas cepacia lipase. **Nature Publishing Group**, v. 1, n. 4, p. 2067, 2006.

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

CHEN, C. S.; ZHOU, B. N.; GIRDAUKAS, G.; SHIEH, W. R.; VANMIDDESWORTH, F.; GOPALAN A. S.; SIH, C. J. 1. Stereochemical control of heart reductions; 2. Quantitative treatment of the kinetics of competing enzyme-systems for a single substrat. *Bioorganic Chemistry*, v.12, p. 98 – 117, 1984.

CHEN, Y; CHEN C.; WU, X. Dicarbonyl reduction by single enzyme for the preparation of chiral diols. **Chemical Society Reviews.**, v. 41, p. 1742 – 1753, 2012.

CORDELL, G. A.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; MATOS, M. C. Vegetales as Chemical Reagents. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 478-492, 2007.

CORREIA, A.G.; BARALDI, P.T. O emprego de fermento de pão *Saccharomyces cerevisiae* na síntese de feromônios. **Química Nova**, v 27, p. 421-431, 2004.

DAUSSMANN, T.; HENNEMANN, H.; HENNEMANN, H. G. DNA that encodes a heat stable alcohol dehydrogenase, useful for stereospecific reduction of keto compounds to secondary alcohols, is new. **Chemie Ingenieur Technik**, v. 78, p. 249-255, 2006.

DALBOGE, H.; LANGE, L. Using molecular techniques to identify new microbial biocatalysts. **Trends Biotechnol.** v.16 n. 6, p. 265–272, 1998.

DEGRAS, L. **The yam: a tropical root crop.** Macmillan Press, London, 1993.

DOMINGUES, O. **Origem e introdução da palma forrageira no Nordeste.** Recife: Instituto de Pesquisa Joaquim Nabuco de Pesquisas Sociais, p, 73, 1963.

DRAUZ, K.; GRÖGER, H.; MAY, O. **Enzyme Catalysis in Organic Synthesis,** volume 1, 3<sup>a</sup> ed.; Wiley-VCH, Weinheim Germany; 2012

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook,** 3<sup>a</sup> ed.; Springer-Verlag: Berlin, Germany, 1997.

FONSECA, A. M.; MONTE, F.J.Q.; DE OLIVEIRA, M.C.F.; MATTOS, M.C.; CORDEL, G.A.; BRAZ, R.; LEMOS, T. L. G.; Coconut water (*Cocos nucifera* L.) – A new biocatalyst sistem for organic synthesis. **Journal of Molecular B: Enzymatic,** v. 57, p. 78-82, 2009.

FRANSEN, M.C.R.; WALTON, M.J. **Biotransformations.** In: Walton MJ, Brown DE, editors. Chemicals from plants, perspectives on plant secondary products. London: Imperial College Press, p. 277 – 325, 1999.

GUEDES, C.C. **Culinária com broto de palma.** João Pessoa: Universitária. p. 53, 2002.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron,** v. 63, p. 1721-1754, 2007.

GINSBURG, V.; ROBBINS, P.W., Eds. **Biology of Carbohydrates;** Wiley: New York, 1984.

GOTTLIEB, H. E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. **Journal de Organic Chemical.,** v. 62, p. 7512 – 7515, 1997.

GREEN, T. W.; WUTS, P.G.M. **Protective groups in organic synthesis;** Wiley-Interscience, New York, 1999.

GUIMARÃES, F. C.; SOARES, J.G.G.; RICHÉ, G.R. **Sistema caatinga-bufelleucena para produção de bovinos no semiárido.** Petrolina, PE: EMBRAPA-

CPATSA, p. 39, 1996. Acesso online:  
<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/132213>

HOFFMAN, W. **Etnobotânica. In: Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira.** Roma: FAO, Produção e Proteção Vegetal, 1995. Tradução (SEBRAE/PB), Paper 132, p. 12 – 14, 2001.

HOREAU, A. Interactions d'enantiomeres en solution ; influence sur le pouvoir rotatoire : Purete optique et purete enantiomerique. **Tetrahedron Letters** v. 10 (36) p. 3121 - 3124, 1969.

KIELING, D. D.; JÚNIOR, A. F. **Enzima – Aspectos Gerais**; Apostilha da disciplina de Engenharia Bioquímica; Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos; Universidade Federal de Santa Catarina, 2002. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAABp2UAG/enzimas-aspectos-gerais/htm>>. Acesso em 08-04-2014

HUDLICKY, T; REED, J. W. Applications of biotransformations and biocatalysis to complexity generation in organic synthesis. **Chemical Society Reviews**. v. 38, p. 3117 – 3132, 2009.

KIZAKI, N.; YASOHARA, Y.; HASEGAWA, J.; WADA, J.; KATAOKA, M.; SHIMIZU, M. Synthesis of optically pure ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by *Escherichia coli* transformant cells co-expressing the carbonyl reductase and glucose dehydrogenase genes. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 55, p. 590-595, 2001.

KOVAL, L. I.; DZYUBA, V. I.; ILNTSKA, O. L.; PEKHNYO, V. I. Efficient transesterification of ethyl acetoacetate with higher alcohols without catalysts. **Tetrahedron Letters**, v. 49 (10), 1645 – 1647, 2008.

LERESCHE, J. E.; MEYER, H. P. Chemocatalysis and Biocatalysis (Biotransformation): Some Thoughts of a Chemist and of a Biotechnologist. **Organic Process Research & Development**. v.10, p. 572, 2006

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Molecular Cellular Biology**, 4<sup>a</sup> ed.; W. H. Freeman; New York; 2000.

MACHADO, L. L.; MONTE, F. J. Q.; OLIVEIRA, M. C. F.; MATTOS, M. C.; LEMOS, T. L. G. Bioreductions of aromatic aldehydes and ketones by fruits' barks of *Passiflora edulis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, p. 130 – 133, 2008.

MADIGAN, M.R.T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. Trad. C. M. Kiaw. São Paulo: Prentce Hall, v. 2, 2004.



MOHAMED-YASSEEN, Y.; BARRINGER, S.A.; SPLITTSTOESSER, W. E. **A note on the use of *Opuntia spp.* in Central/North America.** *Journal of Arid Environments*, v. 32, n. 3, p. 347 – 353, 1996.

MORE, J.D.; FINNEY, N. S. A Simple and Advantageous Protocol for the Oxidation of Alcohols with o-Iodoxybenzoic Acid (IBX). ***Organic Letters***, n. 17, p. 3001 – 3003, 2002.

MORI, K. Pheromones: synthesis and bioactivity. ***Chemical Communications***, n. 13, p. 1153-1158, 1997.

MOSS, G.P. Basic terminology of stereochemistry. ***Pure and Applied Chemistry***, v. 68, p. 2193 – 2222, 1996.

MURAYAMA, S. ***Horticultura***. 2<sup>a</sup> ed. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, p. 128, 1999.

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.

NASCIMENTO, W. F. do. **Diversidade genética de inhame (*Dioscorea trifida* L.) avaliada por marcadores morfológicos, SSR e ISSR.** 2013. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013. Disponível em <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-10102013-083032.htm>>. Acesso em: 16-11-2014.

NUNES, dos C.S. Usos e aplicações da palma forrageira como uma grande fonte de economia para o semiárido nordestino. ***Revista Verde***, v. 6, n. 1, p. 58 – 66, 2011. Disponível em: <http://revista.vgaa.com.br>. Acesso em 26/08/2015.

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

OMORI, A. T.; PORTAS, V. B.; OLIVEIRA, C. S. Redução Enzimática do 4-dimetilamino) benzaldeído com pedaços de cenoura (*Daucus Carota*): um experimento simples na compreensão da biocatálise. ***Química Nova***, v. 35, n. 2, 435-437, 2012.

OMORI, A. T. **Derivados aromáticos de selênio e telúrio: aplicação de biocatálise na preparação de selenetos e teluretos aromáticos enantiomericamente enriquecidos.** 2005. Tese (Doutorado em Química Orgânica)

– Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46135/tde-2722006-042015.htm>>. Acesso em 15-06-2014.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introduction to spectroscopy**, Tradução a 4ª ed. Norte Americana, Pedro Barros, São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PERCLES, C.E. **Bioenergética do processo de biorredução da cetona proquiral acetoacetato de etila: Um estudo calorimétrico**. Dissertação de Mestrado em Química – Pós-graduação em Química. Instituto de Química, Universidade estadual de Campinas, 2006.

PICHANDI, S.; PASUPHATI, P.; RAOC, Y.Y; FAROOK, J.; AMBICA, A.; PANUUSHA, B.S.; SUBRAMANIYAM, S.; VIRAMUNDYE, R. The role of statin drugs in combating cardiovascular diseases. **International Journal of Current Scs. Research**, v 1, n. 2, p. 47 – 56, 2011.

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

PRAS, N.; WOERDENBAG, J.; VAN UDEN, W. Bioconversion potential of plant enzymes for the production of pharmaceuticals. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** v. 43; p. 117 – 121, 1995.

PRICE, N. C.; STEVENS, L. **Fundamentals of Enzymology**; 2ª ed.; Science Publications; New York; 1988.

RAMOS, A. S. **Redução Microbiológica de Beta-Cetoésteres**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009. Disponível em : <<http://www.tpqb.eq.ufrj.br/download/reducao-microbiologica-de-beta-cetoesteres.pdf>>. Acesso em 20-06-2014.

RIATTO, V. B. **Síntese químioenzimática de (-)-serricornina e (+)-sitofilure**. Dissertação (Mestrado em química) – Pós-graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997. Disponível em: impresso.

SANTOS, D.C.; FARIAS, I.; LIRA, M.A. Produção e composição química da palma forrageira cultivar gigante (*Opuntia fícus indica* - Mil), sob adubação e calagem, no agreste e semiárido de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária de Pernambucana**, v. 9, n. especial, p. 669 – 678, 1996.

SANTOS, E. S. dos; CAZÉ FILHO, J.; LACERDA, J. T. de; CARVALHO, R. A.; FONTINÉLLI, I. S. C.; SILVA, J. B. da; BARBOSA, M. M. ; CASSIMIRO, C. M. Inhame e preservação ambiental. João Pessoa, PB: **Embrapa, Emepa**, p. 6, 2006. Disponível em: <[http://www.emepa.org.br/revista/volumes/tca\\_v1.../tca06\\_inhame\\_prod.pdf](http://www.emepa.org.br/revista/volumes/tca_v1.../tca06_inhame_prod.pdf)>. Acesso em 17-11-2014.

SANTOS, E. S. DOS. **Inhame (*Dioscorea* spp.) aspectos básicos da cultura**. João Pessoa: EMEPA-PB, Sebrae, 1ª ed., p. 158, 1996.

SIH, C.J.; CHEN, C.S. microbial Asymmetric Catalysis – Enantioselective Reduction of Ketones. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 23, p. 570 – 578, 1984

SILVA, C.C.F.; SANTOS, L.C. Palma Forrageira (*Opuntia Ficus-India* Mil) como alternativa para alimentação de ruminantes. **Revista Eletrônica de Veterinária REDVET**. v. 7, n. 10, 2006.

SMALLRIDGE, A.J.; JAYASINGH, L. Y.; KODITUWAKU, D.; TREWHELLA, M.A. The use of organic solventes Systems in the yeast mediated reduction of ethyl acetoacetate. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 67 n. 9, p. 2528 – 2531, 1994.

SOLÍS, A.; PÉREZ, H.I.; MANJARREZ, N.; LUNA, H.; CASSINI, J.; BERNALDEZ, L.E.; HERNANDEZ, A. **African Journal Biotechnology**. v. 9 (16), p. 2242 – 2245, 2010.

SOUZA, D. de M. **Biotransformações utilizando biocatalisadores de células de vegetais cultivados no Cerrado em reações de Redução de Cetonas Aromáticas**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Instituto de Ciências Ambientais e Desenvolvimento Sustentáveis, Universidade Federal do Oeste da Bahia, Barreiras, 2013. Disponível em: impresso.

SPEICHER, A.; ROESER, R.; HEISEL, R. Stereoselective oxidoreductase type bioconversions of exogenous substrates by cell suspension cultures of bryophytes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, p. 71-77, 2003.

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

YADAV, J. S.; NANDA, S.; REDDY, P.T.; RAO, A. B. Efficient enantioselective of ketone with *Dacus carota* root. **Journal of Organic Chemistry**. v. 67, p. 3900 – 3903, 2002.

YANG, Z.; ZENG, R.; YANG, G.; WANG, Y.; LI, L.; Lv, Z.; YAO, M.; LAI, B. Asymmetric reduction of prochiral ketones to chiral alcohols catalyzed by plants tissue. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**. v. 35, p. 1047 – 1051, 2008.

WANDREY, C.; LIESE, A.; KIHUMBU, D. Industrial biocatalysis: past, present, and future. **Organic Process Research and Development**. v. 4 n. 4, p. 286–290, 2000.

WARD, O. P. Application of baker's yeast in bioorganic synthesis. **Canadian Journal of Botany**. v. 73, n.1, p. 1043-1048, 1995

WHITTALL J; SUTTON P. W. **Practical Methods for Biocatalysis and Biotransformations 2**. 1<sup>a</sup> ed. John Wiley & Sons Ltd.; United Kingdom; 2012. Disponível em <<http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-1119991390.html>>. Acesso em 13-07-2014.

VALDEZ, F.C.A.; OSÓRIO, A. G. *Opuntia*-based ruminant feeding system in México. **Journal of the Professional Association for Cactus Development - J. PACD**, v. 2, p. 3, 1997.

VALEZ, G. A. The chagra: collective patrimony of the indigenous amazonian communities. **Beyond Law**. v. 6, p. 121 – 142, 1998.

VEASEY, E. A.; SIQUEIRA, M.V.B.M.; SILVA, L.R.G.; NASCIMENTO, W.F.; FERREIRA, A. B.; SILVA, D.; SILVA, E.; MING, L.C.; PERONI, N.; SANTOS, A. H. Ocorrência e diversidade de espécies cultivadas do gênero *Dioscorea* em diversos agroecossistemas brasileiro. In: KFFURI, C. W.; AMOROZO, M.C.M.; MING, L.C. (Org.) **Agrobiodiversidade do Brasil: Experiência e caminhos da pesquisa**. Recife. NUPEEA, p. 45 – 74, 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. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, nº 1, p. 172 – 175, 2011.

## 9. GLOSSÁRIO

### DEFINIÇÕES DE ESTEREOQUÍMICA (MOSS, 1996)

**Biocatálise:** Conversão química de um substrato a um produto desejado com auxílio de uma enzima;

**Biotransformação:** Conversão química de um substrato a um produto desejado com auxílio de células vivas de animais, vegetais ou microorganismos, necessariamente contendo enzimas;

**Diastereoisômero:** Estereoisômero que não se relacionam com sua imagem no espelho. Os estereoisômeros são caracterizados por diferentes propriedades físicas e por algumas diferenças no comportamento químico diante de reagentes aquirais e quirais;

**Enantiômero:** Um do par de moléculas que forma uma imagem não sobreponível no espelho com a outra molécula;

**Quiralidade:** propriedade geométrica de um objeto rígido (ou arranjo espacial de pontos ou átomos no espaço) de ser não sobreponível a sua imagem no espelho; tal objeto não possui os elementos de simetria (plano de reflexão, ponto de simetria ou eixo de rotação-reflexão). Se o objeto é sobreponível a sua imagem no espelho, o mesmo é definido como **aquiral**;

**Racemato:** Mistura equimolar de um par de enantiômero;

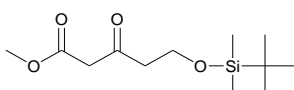
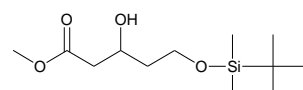
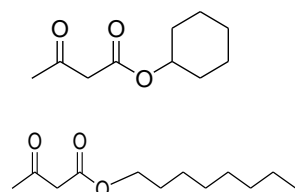
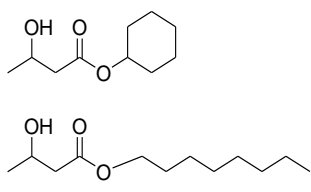
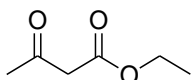
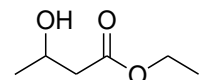
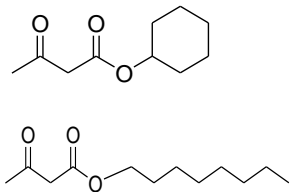
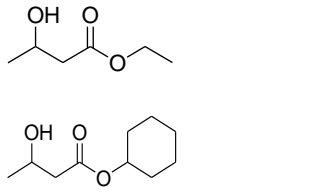
**Estereoisômero:** Molécula que possui constituição idêntica, mas que difere no arranjo dos átomos no espaço;

**Estereoquímica:** Uma área da química que estuda a relação espacial dos átomos dentro da molécula;

**Estereosseletividade:** A formação preferencial por um dos estereoisômeros em uma reação química. Quando os estereoisômeros são enantiômeros o fenômeno é chamado de **enantioseletividade** e se expressa quantitativamente por excesso enantiomérico (e.e.). Quando eles são diastereoisômeros o fenômeno é chamado de **diastereosseletividade** e se expressa quantitativamente por excesso diastereoisomérico (d.e.).

## 10. APÊNDICE

## Apêndice A - métodos de CG utilizados por seus respectivos substratos e produtos

Método de CG		Estrutura química	
Nome	Parâmetro varável da coluna	Substrato	Produto
APM	$T_i = 130^\circ\text{C}$ por 3min; $txa_1 = 2^\circ\text{C}/\text{min}(130-200)^\circ\text{C}$ ; $txa_2 = 10^\circ\text{C}/\text{min}(200-230)^\circ\text{C}$ ; $tc = 41\text{min}$ ;		
APM 2 Adap	$T_i = 40^\circ\text{C}$ ; $txa_1 = 1^\circ\text{C}/\text{min}(40-150)^\circ\text{C}$ ; $txa_2 = 10^\circ\text{C}/\text{min}(150-220)^\circ\text{C}$ ; $tc = 117\text{min}$ ;		
BPM	$T_i = 80^\circ\text{C}$ por 3min; $txa_1 = 2^\circ\text{C}/\text{min}(80-100)^\circ\text{C}$ ; $txa_2 = 10^\circ\text{C}/\text{min}(100-200)^\circ\text{C}$ ; $tc = 23\text{min}$ ;		
BPM trans	$T_i = 80^\circ\text{C}$ por 3min; $txa_1 = 2^\circ\text{C}/\text{min}(80-100)^\circ\text{C}$ ; $txa_2 = 10^\circ\text{C}/\text{min}(100-200)^\circ\text{C}$ ; $T_f = 200^\circ\text{C}$ por 10min; $tc = 33\text{min}$ ;		

Legenda:  $T_i$  = temperatura inicial;  $T_f$  = temperatura final;  $txa_1$  = taxa de aquecimento 1;  $txa_2$  = taxa de aquecimento 2;  $tc$  = tempo de corrida;

**Apêndice B:** Comparação dos dados de rotação específica ( $[\alpha]_D$ ) e configurações absolutas (R/S) dos álcoois obtidos por biorredução com os mesmos álcoois encontrados na literatura.

Dados da literatura		Resultados Obtidos			
$[\alpha]^{25}_D$ (g/100mL;CDCl <sub>3</sub> )	(R/S)	Vegetal	t(h)	$[\alpha]^{20}_D$ (g/100mL;CDCl <sub>3</sub> )	(R/S)
+39,5 (1,3; CDCl <sub>3</sub> ) <sup>1</sup>	(S)-4a	Inhambu	24	+9	(S)-4a
			48	+11	(S)-4a
			72	+18	(S)-4a
		Palma	24	-3	(R)-4a
			48	+9	(S)-4a
			72	+26	(S)-4a
-	(S)-16a	Inhambu	72	+10	(S)-16a
			96	+15	(S)-16a
			120	+13	(S)-16a
		Palma	72	+11	(S)-16a
			96	+14	(S)-16a
-	(S)-17a	Inhambu	24	-10	(R)-17a
			48	+2	(S)-17a
			72	+3	(S)-17a
			96	-7	(R)-17a
		Palma	48	-9	(R)-17a
			72	-5	(R)-17a
-4,9 (1,8; CDCl <sub>3</sub> ) <sup>2</sup>	(R)-15a	Inhambu	24	-3	(R)-15a
			48	-5	(R)-15a
			72	-4	(R)-15a
			96	-1	(R)-15a
		Palma	24	-2	(R)-15a
			48	-4	(R)-15a
			72	-3	(R)-15a

Legenda: P = Produto; t(h) = tempo de reação em horas; <sup>1</sup>= (Machado et al., 2008);

<sup>2</sup>= (Bonini et al.,1989)

11. ANEXO

ANEXO A – Relatório do Cromatograma do CG

