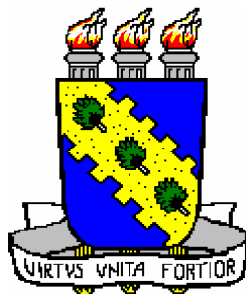


UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA



**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO FITOQUÍMICO E
BIOTECNOLÓGICO DA ÁGUA-DE-COCO
(*Cocos nucifera* L.)**

ALÚSIO MARQUES DA FONSECA

FORTALEZA - CEARÁ
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO FITOQUÍMICO E
BIOTECNOLÓGICO DA ÁGUA-DE-COCO
(*Cocos nucifera* L.)**

ALUÍSIO MARQUES DA FONSECA

Tese submetida à coordenação do Curso de Pós-Graduação
em Química Orgânica e Inorgânica como requisito parcial para a obtenção do
título de doutor

Trabalho realizado sob a orientação da Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica do Centro de Ciências da
Universidade Federal do Ceará.

FORTALEZA - CEARÁ
2009

F742c Fonseca, Aluísio Marques da
Contribuição ao conhecimento fitoquímico e biotecnológico da água-de-
coco (*Cocos nucifera* L.) / Aluisio Marques da Fonseca, 2009.
220 f; il. color. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
Área de concentração: Química Orgânica
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências.
Depto. de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza, 2009.

1. *Cocos nucifera* 2. Redução 3. Imobilização enzimática 4. Biocatálise
5. Hidrólise I. Lemos, Telma Leda Gomes de (orient.) II. Universidade
Federal do Ceará – Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica e
Inorgânica III. Título

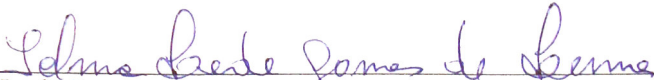
CDD 547

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e em cuja Biblioteca Central encontra-se à disposição dos interessados.

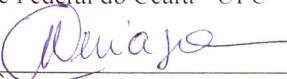
Alúcio Marques da Fonseca

Tese aprovada em: 29 / 01 / 2009

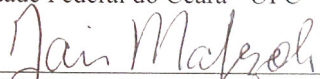
EXAMINADORES:



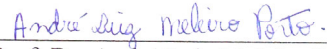
Prof.ª. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
Universidade Federal do Ceará - UFC



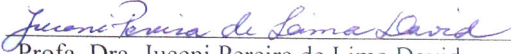
Prof.ª. Dra. Ângela Martha Campos Arriaga
Universidade Federal do Ceará - UFC



Prof. Dr. Jair Mafezoli
Universidade Federal do Ceará - UFC



Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto
Universidade de São Paulo - USP-IQSC



Prof.ª. Dra. Juceni Pereira de Lima David
Universidade Federal da Bahia - UFBA

A Deus.

Ao Meu Amor Regilany, Meus Filhos Pedro e Laís, Meus Pais Luiz e Maria da Penha, aos meus irmãos Cristiano, Conceição, Eliane, Liliane (*in memorian*), Eveline e Paula.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por todas as maravilhas que ele tem feito na minha vida. À meus pais por ter me educado de forma a conseguir terminar a Universidade e poder ter a oportunidade de conseguir realizar um Mestrado e um Doutorado. À minha orientadora Telma Leda por ter me aceitado em seu grupo e por ter me orientado todo esse tempo (desde o mestrado), além de sua compreensão, amizade, exemplo de vida e humildade. Pelos artigos que publicamos juntos, por todos os almoços em nossas comemorações, esquecimento de senhas e puxões de orelha.

Ao Professor Edson P. Nunes do Herbário Prisco Bezerra, no departamento de Biologia pela identificação e autenticação das amostras. Aos professores que vêm sempre nos ajudando com uma dica para o nosso trabalho, ou com participação em artigo ou empréstimo de livros etc. (Manoel Andrade, Otilia, Mary Anne, Conceição, Jair, Letícia, Cristina, Gilvandete, Nilce, Ângela, Marcos, Jackson, Valnei, Ronaldo e Pedro de Lima).

Aos meus amigos que de uma maneira ou de outra me incentivaram direta ou indiretamente para o término deste trabalho: Marne, Loba, Hércio, Sammy, Lucianas [Lucas (muitas dicas legais e artigos), Gregório, Bertini e outras...], Ayla, aos Léos (o mais forte e o mais esbelto), Dr. Paulo, Rosejanne, Janne Eyre, Mozarina, Délcio, Ao pernambucano Sebastião da UFPE, A galera do LABS (Biel, Bartô, Maguinha, Fatinha, Ernani, Daniel e Gigi), Gustavo, ao meigo amigo Rudy, Max (Ceixa), Davina, Leopoldina, Cláudio e Claudim (Síntese), Yana, Jefferson, Jackson, Renata Onça, Alexandre Praxa, Glauber, Artur, Michele, Walber Henrique, Neto do polímeros, Daniel do Ceunarenm, Roberto (polímeros), Leônia, Leny, Jeanny e Cristiane. Aos meus amigos da escola de ensino fundamental e médio Dom Helder Câmara: Samara, Bárbara, Júnior e Jáder e outros tantos que acabei esquecendo, mas que se chegar a vê-los, vou agradecer com certeza.

A mundinha e Lana, por suas incansáveis reclamações, o quais você acaba se acostumando, além dos materiais cedidos para a realização do trabalho.

A seu Paulo, por seu desempenho em coletar o material fitoquímico, secar e triturar deixando bem apropriado para o nosso trabalho.

Ao Professor Edilberto que permitiu operar o RMN, dar algumas sugestões e carões que nos fizeram crescer como profissionais. Além de emprestar alguns livros que ajudaram a desenvolver a tese.

Pela amizade e experiência de Dr. Braz e Chico Monte que em nossas conversas (o Chico falando da Telma e depois dizendo que era eu...) sempre contribuíram de forma bem profissional para produção dos artigos e na interpretação dos espectros.

E não poderia esquecer dois grandes homens que fizeram de tudo pela Universidade, por seus alunos e sempre mostraram paixão aos seus projetos, que hoje estão em um lugar bem melhor que o nosso com certeza: Prof. Francisco José de Abreu Matos e Prof. Ícaro, os quais tenho muita admiração e orgulho por tê-los conhecido.

...E finalmente à CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xix
LISTA DE GRÁFICOS.....	xx
LISTA DE FLUXOGRAMAS.....	xx
LISTA DE ESQUEMAS.....	xxi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xxi
RESUMO.....	xxiv
ABSTRACT.....	xxv
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 - CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS	
2.1. Aspectos Botânicos do Coco da espécie <i>Cocos nucifera</i>	5
CAPÍTULO 3 - LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	
3.1. A Importância da Utilização da Água-de-Coco em Aspectos Medicinais e Tecnológicos.....	7
3.2. A Utilização de Células Íntegras de Vegetais nas Reações de Biocatálise.....	9
3.3. Considerações Sobre Enzimas e Enzimas Imobilizadas.....	10
3.3.1. Imobilização de Enzimas.....	11
3.3.1.1. Características gerais dos suportes para imobilização.....	11
3.3.1.2. Classificação dos métodos de imobilização.....	13

CAPÍTULO 4 – PARTE EXPERIMENTAL

4.1.	Obtenção do Material Botânico.....	16
4.2.	Métodos Cromatográficos.....	17
4.2.1.	Cromatografia Líquida gravitacional em Coluna Aberta (CC).....	17
4.2.2.	Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	17
4.2.3.	Cromatografia Líquida em Coluna sob Pressão (Flash).....	18
4.2.4.	Cromatografia por Exclusão Molecular (Shephadex).....	18
4.3.	Métodos Físicos de Análises.....	18
4.3.1.	Ponto de fusão (pf).....	18
4.3.2.	Espectrometria de massa (EM).....	19
4.3.2.1.	Cromatografia Gasosa acoplada a Detector de Ionização de Chama (CG-DIC).....	19
4.3.3.	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	20
4.3.4.	Espectroscopia na região do infravermelho (IV).....	20
4.3.5.	Rotação ótica (α).....	21
4.4.	Constituintes Encontrados na Água-de-Coco por Hidrodestilação e Extração com Solvente Orgânico.....	22
4.4.1.	Extração do Óleo Essencial da água de <i>Cocos nucifera</i> por hidrodestilação.....	22
4.4.2.	Extração dos constituintes apolares da água de <i>Cocos nucifera</i> por solvente orgânico.....	24
4.5.	Metodologia dos Ensaio Biológicos.....	27
4.5.1.	Atividade Antioxidante dos voláteis obtidos de Cocos nucifera por hidrodestilação e extração com solvente orgânico usando éter de petróleo: Método de Seqüestro do Radical DPPH.....	27
4.5.1.1.	Análise Estatística.....	28

4.6.	Obtenção dos Constituintes Fixos da Albúmen Sólido Fresco (Carne Macia) do Coco (<i>Cocos Nucifera</i> L) do Tipo Verde e Amarelo em Três Fases de Maturidade (Verde, Maduro e Seco).....	29
4.6.1.	Extração do óleo fixo no Albúmen do coco sólido (fruto) nas três fases de maturidade por solvente orgânico.....	29
4.6.2.	Obtenção do Material.....	29
4.6.3.	Extração do óleo fixo no Albúmen de coco sólido nas três fases de maturidade.....	29
4.6.4.	Saponificação/Metilação do extrato hexânico.....	30
4.6.5.	Obtenção dos ésteres metílicos.....	31
4.7.	Bioredução dos compostos 1-17, 22, hidrólise de 19-22, e dimerização do 18.....	33
4.7.1.	Extração e isolamento de 1'-22'.....	33
4.7.2.	Experimentos dos Dados espectroscópicos.....	34
4.8.	Análise da quinina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE.....	35
4.8.1.	Preparação da curva padrão da quinina.....	35
4.8.2.	Análise das amostras.....	35
4.8.3.	Determinação do Teor de Proteínas da água-de-coco.....	36
4.8.4.	Imobilização das Enzimas da água-de-coco.....	37

CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1.	Análise e identificação dos constituintes dos óleos essenciais.....	38
5.2.	Análise e identificação dos constituintes dos voláteis.....	40
5.3.	Atividade Antioxidante.....	43
5.4.	Resultados discussões sobre os dois processos de extração e atividade antioxidante.....	52

5.5.	Análise e identificação dos constituintes dos óleos fixos.....	54
5.5.1.	Resultado e discussões sobre constituintes dos óleos fixos do albúmen do coco em três fases de maturação.....	61
5.6.	Conversão de Compostos Carbonílicos a Álcoois Usando ACC (Água-de-Coco do Ceará).....	63
5.6.1.	Biorreduções Utilizando Água-de-coco do Ceará (ACC).....	63
5.6.1.1.	Biorreduções com aldeídos e cetonas.....	63
5.6.1.2.	Hidrólise de ésteres e biorredução de β -keto-ésteres.....	95
5.6.1.3.	Biorreduções com cetonas cíclicas α,β -insaturadas.....	100
5.6.1.4.	Biorreduções com cetonas cíclicas.....	105
5.6.1.5.	Biorreduções com nitrocompostos e amidas.....	111
5.6.1.5.1.	Biorredução de grupos Nitro e Amidas.....	112
5.6.1.5.2.	Hidrólise de Amidas.....	129
5.7.	Experimentos de bioconversão versus tempo I.....	132
5.8.	Determinação do excesso enantiomérico dos compostos 1', 2', 13', 14', e 15'.....	133
5.9.	Bioacetilações Utilizando as Enzimas Imobilizadas de água-de-coco do Ceará (ACC).....	137
5.9.1.	Imobilizações Enzimáticas.....	137
5.9.1.1.	Imobilização da água-de-coco em alginato de sódio.....	137
5.10.	Lipases.....	144
5.10.1.	Influência da Quantidade Enzimática.....	144
5.10.2.	Influência do Tempo Reacional.....	145
5.10.3.	Influência do Solvente.....	146
5.10.4.	Influência da Quantidade de Substrato.....	148
5.10.5.	Influência da Temperatura.....	149

5.11. Métodos para Determinação de Proteínas.....	152
5.11.1. Determinação de Proteínas no ACC pelo	
Método de Lowry.....	153
5.12. Reações de esterificação usando enzimas	
imobilizadas da água-de-coco.....	154
5.12.1. Curvas de calibração do benzilado e acetilado	
da quinina, respectivamente.....	156
5.12.2. Conversão da quinina 23 em quinina acetilada	
23'acil a partir da enzima imobilizada da água-de-coco.....	159
5.12.3. Conversão da quinina 23 em quinina benzilada	
23'' a partir da enzima imobilizada da água-de-coco.....	171

CAPÍTULO 6 – CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROSCÓPICOS

6.1. Procedimentos Sintéticos na Obtenção dos Álcoois	
por NaBH₄.....	178
6.2. Dados dos Compostos Obtidos na Redução	
de Cetonas e Aldeídos e Hidrólise de Ésteres e Amidas.....	179

CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES.....194

CAPÍTULO 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....196

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. (1a) e (1b) Dois tipos de coco: amarelo e verde; (1c) água-de-coco do tipo verde.....	4
Fig. 2. Partes do coco.....	5
Fig. 3. Principais métodos de imobilização de enzimas.....	13
Fig. 4. Tipos de suportes utilizados na imobilização das enzimas por envolvimento ou oclusão.....	15
Fig. 5. Aparelho usado para extração do óleo essencial por hidrodestilação.....	22
Fig. 6. Cromatograma CG-FID padrão da água-de-coco do tipo verde (8a) e do tipo amarelo (8b) pelo processo de hidrodestilação.....	39
Fig. 7. Cromatograma CG-FID padrão da água-de-coco do tipo verde (9a) e do tipo amarelo (9b) pelo processo de extração com solvente orgânico usando éter de petróleo.....	41
Fig. 8. Espectro de massa do Etanoato de propila.....	44
Fig. 9. Espectro de massa do Metanoato de 1-metilpropila.....	44
Fig. 10. Espectro de massa do 3-hidroxi-butan-2-ona.....	44
Fig. 11. Espectro de massa do 2-hidroxipropanoato de metila.....	45
Fig. 12. Espectro de massa do 4-metilpentan-2-ona.....	45
Fig. 13. Espectro de massa do 2-hidroxipropanoato de etila.....	45
Fig. 14. Espectro de massa do Butano-1,3-diol.....	46
Fig. 15. Espectro de massa do Butano-1,2-diol.....	46
Fig. 16. Espectro de massa do Butano-2,3-diol.....	46
Fig. 17. Espectro de massa do Carbonato de etila.....	47
Fig. 18. Espectro de massa do 2-hexanol.....	47
Fig. 19. Espectro de massa do Etanoato de butila.....	47
Fig. 20. Espectro de massa do Furfural.....	48
Fig. 21. Espectro de massa do 4-hidroxi-4-metilpentan-2-ona.....	48
Fig. 22. Espectro de massa do 2-metil-pentan-2-ol.....	48
Fig. 23. Espectro de massa do Acetato de <i>p</i> -ment-8-en-1-ol.....	49
Fig. 24. Espectro de massa do Fenil acetaldeído.....	49

Fig. 25. Espectro de massa do Acetato de 4-metoxibenzila.....	49
Fig. 26. Espectro de massa do 7,9-di-ter-butil-oxaspiro[4.5]deca-6,9-dien-2,8-diona.....	50
Fig. 27. Espectro de massa do 6,9,12-octadecatrienoato de metila.....	50
Fig. 28. Espectro de massa do ácido n-hexadecanóico.....	50
Fig. 29. Espectro de massa do 3,6-dioxano-1,8-diol.....	51
Fig. 30. Espectro de massa do 3-mercpto-decano.....	51
Fig. 31. Espectro de massa do ácido 9-octadecenóico.....	51
Fig. 32. Espectro de massa do 9-octadecen-1-ol.....	52
Fig. 33. Espectro de massa do adipato de dioctila.....	52
Fig. 34. Espectro de massa do hexanoato de metila.....	56
Fig. 35. Espectro de massa do octanoato de metila.....	56
Fig. 36. Espectro de massa do tridecano.....	56
Fig. 37. Espectro de massa do decanoato de metila.....	57
Fig. 38. Espectro de massa do 2,6,11-trimetildodecano.....	57
Fig. 39. Espectro de massa do isotetradecano.....	57
Fig. 40. Espectro de massa do 2,8-dimetilundecano.....	58
Fig. 41. Espectro de massa do isohexadecano.....	58
Fig. 42. Espectro de massa do dodecanoato de metila.....	58
Fig. 43. Espectro de massa do tiodipropionato de dimiristila.....	59
Fig. 44. Espectro de massa do <i>n</i> -heneicosano.....	59
Fig. 45. Espectro de massa do tetradecanoato de metila.....	59
Fig. 46. Espectro de massa do <i>n</i> -eicosano.....	60
Fig. 47. Espectro de massa do hexadecanoato de metila.....	60
Fig. 48. Espectro de massa do 9,12-octadecadienoato de metila.....	69
Fig. 49. Espectro de massa do 9-octadecenoato de metila.....	61
Fig. 50. (50a) Espectro de RMN H ¹ (500 MHz, em CDCl ₃) de 1 ; (50b) Espectro EIMS de 1	71
Fig. 51. (51a) Espectro de RMN H ¹ (500 MHz, em CDCl ₃) de 1' ; (51b) Espectro EIMS de 1'	72

Fig. 52. (52a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 2 ; (52b) Espectro EIMS de 2	73
Fig. 53. (53a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 2' ; (53b) Espectro EIMS de 2'	74
Fig. 54. (54a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 3 ; (54b) Espectro EIMS de 3	75
Fig. 55. (55a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 3' ; (55b) Espectro EIMS de 3'	76
Fig. 56. (56a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 4 ; (56b) Espectro EIMS de 4	77
Fig. 57. (57a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 4' ; (57b) Espectro EIMS de 4'	78
Fig. 58. (58a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 5 ; (58b) Espectro EIMS de 5	79
Fig. 59. (59a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 5' ; (59b) Espectro EIMS de 5'	80
Fig. 60. (60a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 6 ; (60b) Espectro EIMS de 6	81
Fig. 61. (61a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 6'a ; (61b) Espectro EIMS de 6'a	82
Fig. 62. (62a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 6'b ; (62b) Espectro EIMS de 6'b	83
Fig. 63. (63a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 7 ; (63b) Espectro EIMS de 7	84
Fig. 64. (64a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 7'a ; (64b) Espectro EIMS de 7'a	85
Fig. 65. (65a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 7'b ; (65b) Espectro EIMS de 7'b	86
Fig. 66. (66a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 8 ; (66b) Espectro EIMS de 8	87

Fig. 67. (67a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 8' ; (67b) Espectro EIMS de 8'	88
Fig. 68. (68a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 9 ; (68b) Espectro EIMS de 9	89
Fig. 69. (69a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 9' ; (69b) Espectro EIMS de 9'	90
Fig. 70. (70a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 10 ; (70b) Espectro EIMS de 10	91
Fig. 71. (71a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 10' ; (71b) Espectro EIMS de 10'	92
Fig. 72. (72a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 11 ; (72b) Espectro EIMS de 11	93
Fig. 73. (73a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 11' ; (73b) Espectro EIMS de 11'	94
Fig. 74. Espectro EIMS de 11'acil	95
Fig. 75. (75a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 12 ; (75b) Espectro EIMS de 12	96
Fig. 76. (76a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 12' ; (76b) Espectro EIMS de 12'	97
Fig. 77. (77a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 13 ; (77b) Espectro EIMS de 13	98
Fig. 78. (78a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 13' ; (78b) Espectro EIMS de 13'	99
Fig. 79. (79a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 14 ; (79b) Espectro EIMS de 14	101
Fig. 80. (80a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 14' ; (80b) Espectro EIMS de 14'	102
Fig. 81. (81a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 15 ; (81b) Espectro EIMS de 15	103
Fig. 82. (82a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 15' ; (82b) Espectro EIMS de 15'	104

Fig. 83. Bioconversão da ciclohexanona (16): ao correspondente álcool (ciclohexanol 16'a), e um cetal (ciclohexanona-2,3-butileno cetal 16'b).....	105
Fig. 84. (84a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 16 ; (84b) Espectro EIMS de 16	106
Fig. 85. (85a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 16'a ; (85b) Espectro EIMS de 16'a	107
Fig. 86. (86a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 16'b ; (86b) Espectro EIMS de 16'b	108
Fig. 87. (87a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 17 ; (87b) Espectro EIMS de 17	109
Fig. 88. (88a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 17' ; (88b) Espectro EIMS de 17'	110
Fig. 89. (89a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 18 ; (89b) Espectro EIMS de 18	114
Fig. 90. (90a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 18' ; (90b) Espectro EIMS de 18'	115
Fig. 91. Fragmentações de 18'	116
Fig. 92. (92a) e (92b) Espectro RMN COSY (500 MHz, $CDCl_3$) de 18'	117
Fig. 93. (93a) Espectro RMN C^{13} -BB (500 MHz, $CDCl_3$) de 18' ; (93b) Espectro RMN C^{13} -DEPT135 (500 MHz, $CDCl_3$) de 18'	118
Fig. 94. (94a) e (94b) : Espectro RMN HSQC (500 MHz, $CDCl_3$) de 18'	119
Fig. 95. (95a) e (95b) : Espectro RMN HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) de 18'	120
Fig. 96. (96a) Espectro RMN H^1 (500 MHz, $CDCl_3$) de 19 ; (96b) Espectro EIMS de 19	122
Fig. 97. (97a) Espectro RMN H^1 (500 MHz, $CDCl_3$) de 19' ; (97b) Espectro EIMS de 19'	123
Fig. 98. (98a) Espectro RMN H^1 (500 MHz, $CDCl_3$) de 20 ; (98b) Espectro EIMS de 20	124
Fig. 99. (99a) Espectro RMN H^1 (500 MHz, $CDCl_3$) de 20' ; (99b) Espectro EIMS de 20'	125

Fig. 100. (100a) Espectro RMN H ¹ (500 MHz, (CD ₃) ₂ CO) de 21 ; (100b) Espectro EIMS de 21	126
Fig. 101. (101a) Espectro RMN H ¹ (500 MHz, (CD ₃) ₂ CO) de 21'a ; (101b) Espectro EIMS de 21'a	127
Fig. 102. (102a) Espectro RMN H ¹ (500 MHz, CD ₃ OD) de 21'b ; (102b) Espectro EIMS de 21'b	128
Fig. 103. (103a) Espectro RMN H ¹ (500 MHz, CDCl ₃) de 22 ; (103b) Espectro EIMS de 22	130
Fig. 104. (104a) Espectro RMN H ¹ (500 MHz, CDCl ₃) de 22' ; (104b) Espectro EIMS de 22'	131
Fig. 105. Bioconversão do citral 10 , butan-2-ona 11 , butirato de etila 12 e acetanilida 19 usando ACC na temperatura ambiente.....	132
Fig. 106. (106a) CG-FID (Chirasil-Dex CB) do S-(-)-1-fenil-etanol (1') com 95%;(106b) CG-FID (Chirasil-Dex CB) do S-(-)-3-metoxi-fenil-etanol (2') com e.e. >99%.....	134
Fig. 107. (107a) CG-FID (Chirasil-Dex CB) do R-(+)-butan-2-ol acetilado (11'acil) com e.e. 95%; (107b) CG-FID (Chirasil-Dex CB) do butirato de 3-S-(+)-hidroxi-etila (13') com e.e. > 99%.....	135
Fig. 108. (108a) CG-FID (Chirasil-Dex CB) do S-(-)-carveol (14') com e.e.>99%; (108b) CG-FID (Chirasil-Dex CB) do R-(+)-pulegol (15') com e.e. 56%.....	136
Fig. 109. Fotografia das enzimas imobilizadas da água-de-coco após filtração e lavagem.....	138
Fig. 110. Fotografia das enzimas imobilizadas da água-de-coco após secagem à 32°C.....	139
Fig. 111. Fotografias MEV com 65X de aumento de três partículas de (EIACC).....	139
Fig. 112. Fotografias MEV com 200X de aumento de uma partícula de (EIACC).....	140
Fig. 113. Fotografias MEV com 250X de aumento de uma partícula de (EIACC).....	140

Fig. 114. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do citronelol.....	141
Fig. 115. Espectro de massa do citronelol.....	141
Fig. 116. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do produto obtido da bioacetilação do citronelol com EIACC.....	142
Fig. 117. Espectro de massa do acetato de citronelila.....	142
Fig. 118. Rendimentos reacionais das acetilações do citronelol obtidos pela variação da quantidade de EIACC.....	145
Fig. 119. Rendimentos reacionais das acetilações do citronelol com EIACC obtidos pela variação do tempo reacional.....	146
Fig. 120. Rendimentos reacionais das acetilações do citronelol com EIACC obtidos pela variação do solvente.....	147
Fig. 121. Rendimentos reacionais das acetilações do citronelol com EIACC obtidos pela variação da quantidade do substrato.....	149
Fig. 122. Rendimentos reacionais das acetilações do citronelol com EIACC obtidos a 40°C , com relação ao tempo de reação.....	150
Fig. 123. Rendimentos reacionais das acetilações do citronelol com EIACC obtidos a 60°C , com relação ao tempo de reação.....	151
Fig. 124. (124a) Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 23 ; (124b) Expansão de RMN ^1H de 23	162
Fig. 125. (125a) Espectro RMN ^{13}C -DEPT135 (500 MHz, CDCl_3) de 23 ; (125b) EIMS de 23	163
Fig. 126. (126a) Espectro RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de 23'acil ; (126b) Espectro EIMS de 21'b	164
Fig. 127. (127a) Espectro RMN ^{13}C (500 MHz, CD_3OD) de 23'acil ; (127b) Espectro EIMS de 21'b	165
Fig. 128. (128a) Espectro total de COSY (500 MHz, CDCl_3) de 23'acil ; (128b) Expansão de COSY (500 MHz, CDCl_3) de 23'acil	166
Fig. 129. (129a) Espectro total de HSQC (500 MHz, CDCl_3) de 23'acil ; (129b) Expansão de HSQC (500 MHz, CDCl_3) de 23'acil	167
Fig. 130. Expansão de HSQC (500 MHz, CDCl_3) de 23'acil	168

Fig. 131. (131a) Espectro total HMBC (500 MHz, CDCl ₃) de 23'acil ; (131b) Expansão de HMBC de 23'acil	169
Fig. 132. Expansão de HMBC (500 MHz, CDCl ₃) de 23'acil	170
Fig. 133. Espectro RMN H ¹ (500 MHz, CD ₃ OD) de 23''	174
Fig. 134. (134a) Espectro RMN ¹³ C-BB (500 MHz, CDCl ₃) de 23'' ; (134b) Espectro RMN ¹³ C-DEPT135 (500 MHz, CDCl ₃) de 23''	175
Fig. 135. (135a) Espectro total COSY (500 MHz, CDCl ₃) de 23'' ; (135b) Expansão de COSY (500 MHz, CDCl ₃) de 23''	176
Fig. 136. (136a) Espectro total de HSQC (500 MHz, CDCl ₃) de 23'' ; (136b) Expansão de HSQC (500 MHz, CDCl ₃) de 23''	177

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação de suportes para a imobilização de biocatalisadores quanto à porosidade.....	12
Tabela 2. Rendimento do material (g) e (%) após extração com hexano.....	30
Tabela 3. Rendimento dos saponificáveis (g) após reação de saponificação.....	30
Tabela 4. Rendimento da reação (mg) de metilação.....	31
Tabela 5. Constituintes obtidos por hidrodestilação na Amostra 1 (água-de-coco do tipo verde) e Amostra 2 (água-de-coco do tipo amarelo). Constituintes obtidos pelo processo de extração com solvente orgânico usando éter de petróleo na amostra 1' (água-de-coco do tipo verde) e amostra 2' (água-de-coco do tipo amarelo).....	42
Tabela 6. O atividade do seqüestro de radical livre DPPH dos constituintes obtidos por hidrodestilação (amostras 1 e 2), e por processo de extração usando éter de petróleo (amostras 1'e 2') da água-de-coco do tipo verde e amarelo.....	43
Tabela 7. Constituintes encontrados nos ésteres metílicos do extrato hexânico do óleo fixo do coco do tipo verde e amarelo em três fases de maturação.....	55

Tabela 8. Relativo rendimento percentual dos produtos reduzidos de 1–11 , e 13–17 . Hidrólise de 12 e 19-22 , com a dimerização de 18 usando ACC. As quantificações feitas por RMN H^1 e CG/EM.....	67
Tabela 9. Sinais de RMN H^1 usados na integração dos protons selecionados dos compostos 1–11 , e 13–17 , comparados com a integração dos produtos álcool 1’–11’ , e 13’–17’ , usando água-de-coco.....	68
Tabela 10. Dados de <i>g</i> HSQC e <i>g</i> HMBC do composto 18’ (em $CDCl_3$).....	113
Tabela 11. Dados de RMN H^1 , ^{13}C e bidimensionais de 23 e derivado acetilado 23’acil	161
Tabela 12. Dados de RMN H^1 , ^{13}C e bidimensionais de 23 e derivado benzilado 23’’	173

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Dados Curva da quinina benzilada nas seguintes condições: $y=10,45712+23,9499x$, com $R=0,997562$; concentração da mistura reacional: 120 mg/L; concentração do benzilado na mistura: 42,95 mg/L e porcentual: 35,79%.....	157
Gráfico 2. Curva da quinina acetilada nas seguintes condições $y=9,24034+12,10679x$, com $R=0,99678$; concentração da mistura reacional: 40 mg/L; concentração do acetilado na mistura: 29,48 mg/L e porcentual: 73,70 %.....	158

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Parte experimental para obtenção dos voláteis de <i>Cocos nucifera</i>	25
Fluxograma 2. Parte experimental para obtenção dos voláteis de <i>Cocos nucifera</i>	26
Fluxograma 3. Parte experimental para obtenção dos éteres metílicos do albúmen de <i>Cocos nucifera nucifera</i>	32

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reação da ACC com compostos carbonílicos aromáticos e alifáticos (aldeídos, cetonas e ésteres).....	69
Esquema 2. Reação da ACC com compostos carbonílicos cíclicos e alifáticos (cetonas), além de compostos carbonílicos alicíclicos, amidas e nitrobenzenos.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACC	Água-de-coco do Ceará
BB	Broad Band decoupling
BHT	Butylated Hidroxy Toluene
CC	Coluna Cromatográfica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl₃	Clorofórmio Deuterado
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectro de massa
CGL	Cromatografia Gás-Líquido
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL₅₀	Concentração Letal que mata 50% da população
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Correlation Spectroscopy
COSYGS	COrrrelation SpectroscopY Gradient Shield
<i>d</i>	dubleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazil
<i>dd</i>	duplo dubleto
<i>ddd</i>	duplo dubleto dubleto
DMSO	Dimetil sulfoxido
EIACC	Enzimas Imobilizadas da Água-de-Coco do Ceará

EM	Espectroscopia de Massa
EIMS	Espectro de massa por impactro eletrônico
CG-FID	cromatografia à gás com detecção por ionização de chama
<i>hep</i>	hepteto
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
HMBCGS	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity Gradient Shield
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HSQCGS	Heteronuclear Single Quantum Coherence Gradient Shield
IK	Índice de Kovats
IR	Índice de Retenção
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
Lit	Literatura
LCMS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
<i>m</i>	múltiplo
MEV	Microscopia de Varredura Eletrônica
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
p.f.	Ponto de fusão
POD	Enzima Peroxidase
PPO	Enzima Polifenol Oxidase
ppm	Partes por milhão
<i>s</i>	singleto
S1G	Saponificável Verde do Coco Tipo Verde
S2G	Saponificável maduro do Coco Tipo Verde
S3G	Saponificável Seco do Coco Tipo Verde
S1Y	Saponificável Verde do Coco Tipo Amarelo
S2Y	Saponificável maduro do Coco Tipo Amarelo

S3Y	Saponificável Seco do Coco Tipo Amarelo
<i>t</i>	tripleto
[α]	Rotação específica
<i>δ</i>	Deslocamento químico
UV-Vis	Luz Ultra-Violeta Visível

RESUMO

A análise dos componentes da água-de-coco (*Cocos nucifera*) dos dois tipos (verde e amarelo) por hidrodestilação e extração com solvente mostrou a presença de álcoois, cetonas, tiolatos, ácidos carboxílicos, fenóis e ésteres. Os componentes principais encontrados na água-de-coco do tipo verde foram etanoato de propila (53,5%) e 4-metil-pentan-2-ona (29,0%) pela extração com solvente orgânico. Por hidrodestilação, foram detectados hexan-2-ol (14,5%) e 4-hidroxi-4-metilpentan-2-ona (30,5%). Da água-de-coco do tipo amarelo foram detectados butano-1,3-diol (67,7%) e 4-metil-pentan-2-ona (16,7%) pela extração com solvente. Por hidrodestilação o componente principal foi o 3-mercapto-decano (46,2%). Uma atividade antioxidante substancial foi observada, usando o ensaio de DPPH, tanto para as amostras obtidas pela extração com éter de petróleo como por hidrodestilação de ambos os tipos do coco. Uma série de aldeídos e cetonas alifáticos e aromáticos foi reduzida usando células íntegras da água-de-coco. Os produtos obtidos tiveram tipicamente rendimentos que variaram entre 34% a 99%. Com excessos enantioméricos muito elevados. Ésteres, um nitrobenzeno e amidas foram examinados igualmente onde apresentaram resultados bastante satisfatórios. Uma outra parte do trabalho consistiu no estudo da utilização do sistema enzimático da água-de-coco para esterificação de álcoois. Neste sentido, foi utilizado a quinina. Nas reações de esterificação foram utilizados como biocatalisador as enzimas imobilizadas da água-de-coco, utilizando metodologia adaptada da literatura. O óleo fixo de três fases de maturação do albumen sólido dos dois tipos do coco (verde e amarelo) após saponificação, seguidos de metilação foram sujeitos à análise de GC-EM para a identificação dos ésteres metílicos. Doze constituintes foram encontrados do óleo do albumen jovem, representando 90,46%/71,00% (verde/amarelo). Estes compostos foram hidrocarbonetos, tioésteres e ácidos carboxílicos. O óleo fixo do albumen maduro das duas espécies conteve nove compostos, onde aproximadamente 99,59%/68,26% (verde/amarelo) foram caracterizados. Entretanto, os ácidos graxos típicos retidos foram o ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido linoléico, ácido esteárico e o ácido elaidítico. O óleo fixo do albumen seco das duas espécies conteve uma quantidade maior, nove compostos, representando mais de 99,98%/98,11% (verde/amarelo) caracterizados.

Palavras-chave: biorredução; bioacetilação; vegetais; *Cocos nucifera*

ABSTRACT

An analysis of the constituents of coconut (*Cocos nucifera* L.) water from two fruit varieties (green and yellow) by hydrodistillation and solvent extraction showed the presence of alcohols, ketones, thiols, carboxylic acids, phenols, and esters. The main components found in the coconut water of the green type had been propyl etanoate (53.5%) and 4-metil-pentan-2-one (29.0%) for the solvent extraction. By hydrodistillation, it has been detected hexan-2-ol (14.5%) and 4-hidroxi-4-metilpentan-2-one (30.5%). Of the coconut water of the yellow type has been detected butane-1,3-diol (67.7%) and 4-metil-pentan-2-one (16.7%) for the solvent extraction. For hydrodistillation, the main compound was the 3-mercapto-decane (46.2%). Substantial antioxidant activity was observed, using the DPPH assay, for the samples obtained by hydrodistillation and petroleum ether extraction of both coconut varieties. A series of aliphatic and aromatic aldehydes and ketones was reduced using plant cell preparations from coconut juice. The reduced products were typically obtained in excellent yields (%) and with very high enantiomeric excess. Esters, amides, and nitrobenzene, yielded acids, amines and an azoxyderivative with satisfactory results. With enantiomeric excesses very raised. One another part of the work consisted of the study of the use of the enzymatic system of the coconut water for esterification of alcohol. In this direction, the quinine was used. In the esterification reactions the immobilized enzymes of the coconut water had been used as biocatalisator, using suitable methodology of literature. The fixed oil of three phases of maturation of solid albumen of the two types from the coconut (green and yellow) after saponification, followed of metilation had been subjected to the CG-MS analysis for the methylic esters identification. Twelve constituent had been found of the oil from young albumen, representing 90,46%/71,00% (green/yellow). These constituents had been hydrocarbons, thioesteres and carboxylic acids. The fixed oil of mature albumen of the two species contained nine constituents, where 99,59%/68,26% (green/yellow) had been approximately characterized. however, the retained typical acid was the lauric acid, myristic acid, palmitic acid, linoileic acid, estaric acid, and elaidic acid. The fixed oil of dry albumen from the two species contained a bigger amount, nine constituents, representing more than 99,98%/98,11% (green/yellow) characterized.

Keywords: bioreduction; bioacetilation; vegetables; *Cocos nucifera*.

Capítulo 1



INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Cocos nucifera L. é uma árvore de 20-30m de palma (**Fig. 1a, p. 4**), encontrada nos trópicos e em costas litorâneas (Laureles et al. 2002), pertence à família Palmae. Seu fruto é popularmente conhecido como "coco", o qual forma um grupo ou um agrupamento de frutas em fases diferentes de desenvolvimento (REDDY, DAS e DAS, 2005). É caracterizada por três ovários de drupaceas limitados na fruta com endocarpo rígido de três poros germinais e a fruta normalmente é uma semente (EJEDEGBA et. al., 2007).

Este tipo de palmeira tem um papel importante como colheita de subsistência e seu óleo é bastante comercial. Os componentes principais desses óleos são os triacilgliceróis, que possuem uma composição diferente dos ácidos graxos e são caracterizados pela abundância do ácido de láurico (ácido dodecanóico) (LÓPES-VILLALOBOS et. al., 2001). Os triacilgliceróis do óleo do albúmen do coco têm um baixo grau de insaturação, e consistem em dois ácidos graxos majoritários, o láurico e o mirístico (PHAM, GREGORIO e CASA 1998). O óleo de coco também apresenta ácidos linoleicos de constituição conjugada, isso ocorre à seus grupos de isômeros. Segundo pesquisas recentes eles possuem atividades anticarcinogênicos e antiaterogênicos (HARGRAVE, AZAIN e MINEIRO 2005). Alguns desses efeitos podem ser atribuídos aos isômeros específicos do ácido linoleico conjugado. Os isômeros responsáveis pela a perda de gordura do corpo, são os 10-*trans* e 12-*cis* (HARGRAVE, AZAIN e MINEIRO 2005). LAURELES et al. (2002) mostrou que um percentual considerável do óleo do coco é constituído de ácidos graxos de cadeia média (C6-C12), sendo a majoritária para o ácido de láurico (C-12). Notavelmente, o óleo do coco tem uma proporção considerável de ácidos graxos com C-6, C-8 e C-10 também, além de que cadeias médias de triacilgliceróis do óleo de coco reduzirem a acumulação de gorduras e colesterol em ratos quando eles são alimentados por esses óleos.

O óleo do coco também é usado atualmente com muito sucesso como surfactante em microcápsulas anfóteras no encapsulamento do óleo volátil de citronela (HSIEH, CHANG, e GAO 2006).

O suco é saborosamente doce, ligeiramente ácido, e rico em fósforo e potássio (REDDY et. al. 2005; FAR 1994; BORSE et. al., 2007). Também contém proteínas, gorduras, e minerais, e é muito rico em carboidratos (CHUMBIMUNITORRES e KUBOTA, 2006; JIROVETZ et. al., 2003).

Em recentes anos, houve um interesse considerável em buscar fontes de antioxidantes naturais, especialmente de frutas e legumes que proveram uma medida de proteção contra o processo de dano de oxidativo (JACOB e BURRI, 1996). Os compostos antioxidantes de plantas, particularmente flavonóides e outros polifenóis, inibem a propagação de reações com radicais livres, protegendo o corpo humano de doenças (KINSELLA et. al., 1993). Além disso, atividade antioxidante também está associada a presença de ácidos (LOKI e RAJAMOHAN, 2003), compostos aromáticos (AGNANIET et. al., 2005; LETIZIA et. al., 2000), aldeídos (YI e KIM, 1982), e ésteres (NARAIN, GALVÃO e MADRUGA, 2007). Em pesquisas anteriores a água-de-coco essas propriedades (LEONG e SHUI, 2002; SKREDE et. al., 2004). Esta propriedade foi verificada principalmente na água-de-coco *in natura*, que diminuiu drasticamente com o uso por tratamentos térmicos, ácidos ou alcalinos e com o grau de maturação das frutas (MANTENA et. al., 2003).

No Nordeste do Brasil, por exemplo, no estado do Ceará, há dois tipos coco, o da fruta de casca verde e da casca amarela (**Fig. 1b, p. 4**). A água de coco do tipo verde (**Fig. 1c, p. 4**) é uma bebida agradável e refrescante amplamente consumida além de ser conhecida por possuir várias propriedades benéficas à saúde (CAMPBELL-FALCK et. al., 2000; FARR, 1994; MEPBA e ACHINEWHU, 2003; PUMMER et. al., 2001), considerando que o líquido produzido pelo tipo amarelo é pouco usado como bebida, porque não é tão doce

como o verde, assim é menos cultivado. Também é chamado "água-de-coco", e foi denominado por nós como ACC (água-de-coco do Ceará).

A enzima peroxidase (POD) e Polifenol oxidase (PPO) foram encontradas amplamente em muitas frutas e legumes, inclusive na água-de-coco, onde são responsáveis pelas mudanças de cor com perda conseqüente de propriedades sensoriais e qualidade nutricional (DUARTE et. al. 2002; ROBSON et. al. 1991). Nomes diferentes foram associados ao PPO inclusive tirosinase, cresolase, catecolase e fenolase e geralmente refletiram a habilidade desta enzima para utilizar muitos compostos fenólicos diferentes como substratos. POD é um grupo de enzimas oxidantes que através de catálises, reduzem o peróxido de hidrogênio oxidando uma variedade de substratos (ROBSON et. al. 1991).

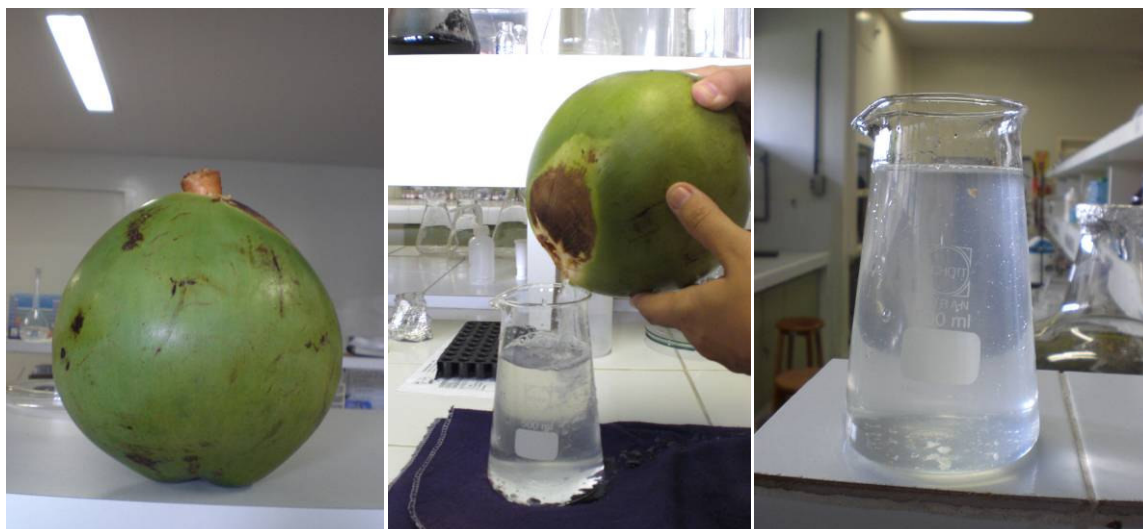
A composição nutricional de água-de-coco foi bem documentada (SANTOSO, et. al., 1996), mas para o melhor de nosso conhecimento não há nenhum relato na literatura sobre um estudo comparativo de água-de-coco produzida pelo tipo verde e amarelo relacionado à sua composição química. O presente trabalho também apresenta um estudo dos componentes voláteis encontrados na água-de-coco de dois tipos (verde e amarelo) através de duas metodologias: hidrodestilação e extração com solvente orgânico (éter de petróleo), assim como o estudo de sua composição lipídica, através de três fases de maturação (verde, maduro e seco), dos dois tipos (verde e amarelo), além do potencial enzimático das células íntegras da água-de-coco e de suas enzimas imobilizadas utilizando substratos orgânicos.



(1a)



(1b)



(1c)

Figura 1. (1a) e (1b) Dois tipos de coco: amarelo e verde; (1c) água-de-coco do tipo verde.