



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ROMÉZIO ALVES CARVALHO DA SILVA**

**PLANTAS MEDICINAIS DO NORDESTE DO BRASIL - *Ximenia americana* Linn:  
INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DOS GRÃOS E SEU USO COMO BIOCATALISADOR**

**FORTALEZA – CE**

**2016**

ROMÉZIO ALVES CARVALHO DA SILVA

PLANTAS MEDICINAIS DO NORDESTE DO BRASIL - *Ximenia americana* Linn:  
INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DOS GRÃOS E SEU USO COMO BIOCATALISADOR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte

FORTALEZA – CE

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

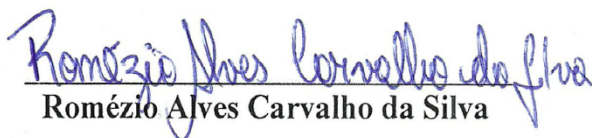
---

- S583p Silva, Romézio Alves Carvalho da.  
Plantas medicinais do Nordeste do Brasil - Ximenia americana Linn : investigação química dos grãos e seu uso como biocatalisador / Romézio Alves Carvalho da Silva. – 2016.  
171 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2016.  
Orientação: Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte.
1. Ximenia americana Linn. 2. carboidratos. 3. trimetilsilil derivados. 4. espectrometria de massa. 5. biocatálise. I. Título.


CDD 540

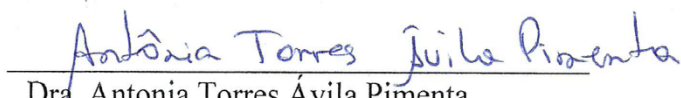
---


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


  
Romézio Alves Carvalho da Silva

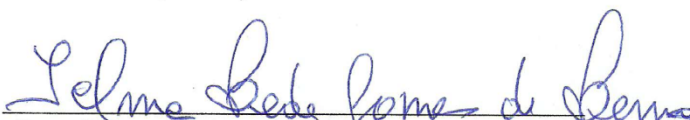
Tese aprovada em: 20/10/2016.

  
Dr. Francisco José Queiroz Monte  
(Orientador-UFC)

  
Dra. Antonia Torres Ávila Pimenta  
(UFC)

  
Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó  
(UFPI)

  
Dr. Renato de Azevedo Moreira  
(Unifor)

  
Dra. Telma Leda Gomes de Lemos  
(UFC)

## AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente às minhas mães Marise e Jesus (tia), à minha madrinha Sheyla e aos meus irmãos Romério e Marlizy pelo amor, dedicação, apoio e ensinamentos que alicerçaram meu caráter e que muito me ajudaram em momentos difíceis.

A minha esposa Janaína Cabral pelo companheirismo, incentivo, dedicação e compreensão ao meu período de estresse pós-laboratório e por dividir comigo os momentos alegres e difíceis durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus sobrinhos Jefferson Júnior, Maria Clara e Mateus por estarem cientes que minha “ausência” durante quase 4 anos foi para a minha realização pessoal, capacitação profissional, e por eles me terem como exemplo a ser seguido.

Ao prof. Dr. Francisco Monte (Chico Monte) pela excelente orientação, pelos ensinamentos, amizade, atenção, paciência e conhecimentos valiosos tanto para a vida pessoal quanto acadêmica.

Aos professores participantes da banca examinadora pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos professores do Programa de pós-graduação em Química em especial a profa. Dra. Telma Lemos por ter me aceitado no Laboratório de Biotransformações e Produtos Naturais (LBPN) a fim de desenvolver o meu projeto de doutorado; ao prof. Dr. Ronaldo Ferreira e à profa. Dra. Helena Becker pelos ensinamentos e disposição em me ajudar sempre que eu precisava.

Aos amigos e colegas do LBPN por estarem presentes nos momentos tristes e principalmente nos felizes durante minha estadia em Fortaleza, especialmente ao André Martins, Gisele Rocha, Bruna Marques, Patrícia Georgina, Iolanda Frota, Felipe Maia, Daniele Alves, Jennifer Cavalcante, Marcia Cleane e Emerson Yvay.

Aos amigos do LANAGUA pelo acolhimento, por compartilharem comigo muitos momentos felizes que me fizeram esquecer que eu estava distante da minha família e ensinamentos de vida: Natan, Mayza, Raquel Bessa, Juliene e Lucas.

Aos amigos e colegas do LABS em especial a Carol, Daniela, Thiago, Maria Vieira, Aquino e ao Reinaldo pelos ensinamentos.

Aos colegas da turma de doutorado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

A UFC e ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade de me qualificar profissionalmente nesta instituição.

À FAPEPI pela bolsa concedida, CNPq e FUNCAP pelo fomento.

*“Enquanto o tempo acelera e pede pressa, eu me recuso faço hora vou na valsa... A vida é tão rara.”*

*Lenine e Dudu Falcão*

## RESUMO

O presente trabalho consistiu no estudo dos extratos hexânico e etanólico dos grãos de *Ximenia americana*, uma espécie vegetal abundante no Nordeste do Brasil, especialmente no Ceará, onde é conhecida como ameixa-do-mato. Partes desta planta, principalmente, as cascas, são utilizadas popularmente no tratamento de diversas enfermidades. A investigação química foi dividida em duas partes, sendo a primeira dirigida à identificação dos componentes químicos dos grãos de *X. americana* através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM) e, a segunda, relacionada a possibilidade do uso destes grãos como biocatalisador. A identificação dos componentes químicos através de CG/EM sem o conhecimento dos possíveis tipos de compostos presentes, exigiu como etapa prévia, a obtenção de derivados voláteis. Assim, numa primeira etapa, o extrato hexânico dos grãos após reação de silição permitiu a identificação de 18 constituintes destacando-se, como majoritários, os ácidos octadec-9-enoico (38,14%), (9Z,12Z)-octadec-9,12-dienoico (18,83%), etanodioico (8,21%) e (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoico (7,22%). Por sua vez, o extrato etanólico após silição, possibilitou identificar 18 constituintes tendo a *D*-Sacarose (29,36%), *L*-Sorbose (9,19%), inositol (8,34%) e *D*-Glicose (7,45%), como majoritários. Os constituintes foram identificados como trimetilsilil (TMS) éteres através de técnicas cromatográficas e espectrométricas, principalmente, CG/EM. Além de ácidos graxos e carboidratos como destaques, foi detectada a presença de esteroides ( $\beta$ -Sitosterol) no extrato hexânico e triterpenos (Ac. Betulínico e Ac. Ursólico) no extrato etanólico. Numa segunda etapa, o extrato hexânico dos grãos após as reações de saponificação/metilação permitiu a identificação de dez ácidos graxos, tendo, como principais, os ácidos oleico (55%), ximeninico (17%) e *cis*-19-octacosenoico (10%). Os ácidos foram identificados na forma de seus metil éteres utilizando CG/EM. O padrão de fragmentação dos componentes, delineado nos espectros de massa, foi considerado no processo de análise. Foram também realizados alguns testes de atividades biológicas a partir dos extratos hexânico e etanólico dos grãos. A segunda parte do estudo investigou o uso dos grãos de *X. americana* como biocatalisador na forma de material integral em reações de biotransformações na redução de aldeídos e cetonas, esterificação de alcoóis e hidrólise de ésteres. Nas reações de redução foram utilizados os substratos: acetofenona, 3-metoxi-acetofenona, 4-flúor-acetofenona, 4-cloro-acetofenona, 2,4-dicloro-acetofenona, cicloexanona, octan-2-ona, undecan-2-ona, benzaldeído, 3-metoxibenzaldeído, 4-metoxibenzaldeído, 3-hidroxi-4-metoxibenzaldeído (vanilina) e 1-naftaldeído. As condições que permitiram a obtenção do produto reduzido com melhor

rendimento foram: 50,0 mg do substrato, 5,0 g dos grãos, pH 5(cetonas) e 7 (aldeídos), 175 rpm na mesa agitadora, 72 horas a 30 °C. A bioconversão na redução ocorreu de baixo a excelente rendimento e, como esperado, os aldeídos mais reativos que as cetonas. Nas reações de hidrólise foram utilizados os substratos: benzoato de metila, benzoato de etila, acetato de benzila, acetato de *p*-cloro-feniletila e acetato de feniletila. As condições que permitiram a obtenção do produto hidrolisado com melhor rendimento foram: 50,0 mg do substrato, 2,0 g dos grãos, 30 mL de água destilada (pH 5), 175 rpm na mesa agitadora, 72 horas a 30 °C. A bioconversão na hidrólise ocorreu de médio a excelente rendimento. Nas reações de esterificação dos alcoóis foram utilizados os substratos: álcool benzílico, 3-metoxi-benzílico, 4-metoxi-benzílico, 1-feniletanol, cicloexanol e *n*-octanol. As condições que permitiram a obtenção do produto esterificado com melhor rendimento foram: 52 mg do substrato, 2,0 g dos grãos, 10 mL de hexano, 100 µL de acetato de vinila, 225 rpm na mesa agitadora, 24 horas a 30 °C. A bioconversão na esterificação ocorreu de baixo a excelente rendimento. Os produtos, nas misturas reacionais, foram analisados através de CCD, CG/EM, CG/DIC e RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C.

**Palavras-chave:** *Ximenia americana* Linn, carboidratos, trimetilsilil derivados, espectrometria de massa, biocatálise.



## ABSTRACT

This work consisted in the study of hexane and ethanol extracts of *Ximenia americana* grains, abundant plant species in the Northeast of Brazil, especially in Ceará, where it is known as the plum of the woods. Parts of the plant, especially the husks, are popularly used to treat various diseases. The chemical investigation was divided into two parts, the first being directed to the identification of the chemical components of the grain *X. americana* by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) and the second one related to the possibility of using these grains as biocatalyst. Identification of chemical components by GC/MS without the knowledge of the possible types of compounds, required as a preliminary step, obtaining volatile derivatives. Thus, in a first step, the hexane extract of the grains after silylation reaction allowed the identification of 18 constituents highlighting, as the major, the octadec-9-enoic acid (38.14%), (9Z, 12Z)-octadec-9,12-dienoic acid (18.83%), ethanedioic (8.21%) and (Z, Z, Z) -9,12,15-octadecatrienoic (7.22%). Meanwhile, the ethanolic extract after silylation possible to identify components having 18 to *D*-Sucrose (29.36%), *L*-Sorbose (9.19%), inositol (8.34%) and *D*-Glucose (7.45%) as major. The constituents were identified as trimethylsilyl (TMS) ethers by using chromatographic and spectrometric techniques mainly GC/MS. In addition to fatty acids and carbohydrates as highlights, it detected the presence of steroids ( $\beta$ -sitosterol) in hexane and triterpene extract (Betulinic and Ursolic acid) in ethanol extract. In a second step, the hexane extract of the beans after saponification reactions/methylation allowed the identification ten fatty acids having main, oleic acid (55%) ximeninic (17%) and *cis*-19-octacosenoico (10%). The acids were identified as their methyl esters using GC/MS. The fragmentation pattern of the components outlined in the mass spectra, was considered in the review process. They were also carried out some tests of biological activities from hexane and ethanol extracts of the grains. The second part of the study investigated the use of grain as *X. americana* biocatalyst in the form of integral material biotransformation reactions in the reduction of aldehydes and ketones, alcohols esterification and ester hydrolysis. In the reduction reactions the used substrates were: acetophenone, 3-methoxyacetophenone, 4-fluoroacetophenone, 4-chloroacetophenone, 2,4-dichloroacetophenone, cyclohexanone, octan-2-one, undecan-2-one, benzaldehyde, 3-methoxybenzaldehyde, 4-methoxybenzaldehyde, 3-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (vanillin) and 1-naphthaldehyde. The conditions that allowed the reduced product to be obtained in the best yield were: 50.0 mg of the substrate, 5.0 g of the grains, pH 5 (ketones) and 7 (aldehydes), 175 rpm on the shaker table, 72 hours at 30 °C. The bioconversion in the

reduction occurred from low to excellent yield and, as expected, aldehydes were more reactive than ketones. In the hydrolysis reactions the used substrates were: methyl benzoate, ethyl benzoate, benzyl acetate, *p*-chloro-phenylethyl acetate and phenylethyl acetate. The conditions that allowed the hydrolyzed product to be obtained with the best yield were: 50.0 mg of the substrate, 2.0 g of the grains, 30 mL of distilled water (pH 5), 175 rpm on the shaker table, 72 hours at 30 °C. The bioconversion in the hydrolysis occurred from medium to excellent yield. In the esterification reactions of the alcohols the used substrates were: benzyl alcohol, 3-methoxy benzyl, 4-methoxy benzyl, 1-phenylethanol, cyclohexanol and *n*-octanol. The conditions that allowed the esterified product to be obtained in the best yield were: 52 mg of the substrate, 2.0 g of the grains, 10 ml of hexane, 100 µL of vinyl acetate, 225 rpm on the shaker table, 24 hours at 30 °C. Bioconversion in esterification occurred from low to excellent yield. The products in the reaction mixtures were analyzed by TLC, GC/MS, GC/FID and <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR.

**Keywords:** *Ximenia americana* Linn, carbohydrates, trimethylsilyl derivative, mass spectrometry, biocatalysis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Fotos da espécie <i>X. americana</i> Linn .....	27
Figura 2	– Redução do DPPH <sup>•</sup> com o antioxidante BHT .....	31
Figura 3	– Estruturas de alguns antioxidantes naturais e sintéticos .....	32
Figura 4	– Cromatograma de íons totais do extrato hexânico sililado dos grãos de <i>X. americana</i> .....	38
Figura 5	– Espectro de massas do derivado TMS do ácido palmítico (ácido hexadecanoico) .....	41
Figura 6	– Espectro de massas do derivado TMS do ácido oleico (ácido <i>cis</i> -octadec-9-enoico) .....	42
Figura 7	– Espectro de massas do derivado TMS do ácido linoleico (ácido <i>cis,cis</i> -9,12-octa-decadienoico) .....	42
Figura 8	– Espectro de massas do derivado TMS do $\beta$ -Sitosterol .....	43
Figura 9	– Cromatograma de íons totais do extrato etanólico sililado dos grãos de <i>X. americana</i> .....	45
Figura 10	– Espectro de massas do derivado TMS da <i>L</i> -Sorbose .....	47
Figura 11	– Espectro de massas do derivado TMS da <i>D</i> -Frutose .....	49
Figura 12	– Espectro de massas do derivado TMS da <i>D</i> -Sacarose .....	50
Figura 13	– Cromatograma dos íons totais de AGME 24-28 .....	51
Figura 14	– Ácidos graxos (AG1–AG10) identificados como ésteres metílicos ,.....	54
Figura 15	– Estrutura parcial proposta de <b>XA-1</b> .....	57
Figura 16	– Espectro de infravermelho de <b>XA-1</b> .....	58
Figura 17	– Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, 500 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>XA-1</b> .....	58
Figura 18	– Espectro de RMN de <sup>13</sup> C-BB, 125 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>XA-1</b> .....	59
Figura 19	– Espectro de RMN de <sup>1</sup> Hx <sup>1</sup> H – COSY, 500 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>XA-1</b> .....	59
Figura 20	– Espectro de infravermelho de <b>XA-2</b> .....	61

Figura 21	– Espectro de RMN de $^1\text{H}$ , 500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , de <b>XA-2</b> .....	62
Figura 22	– Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ , 500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , de <b>XA-2</b> .....	62
Figura 23	– Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ , 500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , de <b>XA-2</b> .....	63
Figura 24	– Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -BB, 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , de <b>XA-2</b> .....	63
Figura 25	– Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -BB, 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , de <b>XA-2</b> ....	64
Figura 26	– Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -BB, 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , de <b>XA-2</b> ....	64
Figura 27	– Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -DEPT 135°, 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , de <b>XA-2</b> .....	65
Figura 28	– Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -DEPT 135°, 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , de <b>XA-2</b> .....	65
Figura 29	– Estrutura do ácido betulínico ( <b>XA-2a</b> ), ácido oleanólico ( <b>XA-2b</b> ) e <b>XA-2c</b> .....	66
Figura 30	– Cromatograma (CG/EM) do produto <b>1a</b> de biorredução da acetofenona ( <b>1</b> ) com grãos de <i>X. americana</i> .....	78
Figura 31	– Espectro de massas de <b>1</b> , $T_R = 8,056$ minutos .....	79
Figura 32	– Espectro de massas de <b>1a</b> , $T_R = 7,969$ minutos .....	79
Figura 33	– Espectro de RMN de $^1\text{H}$ , 300 MHz, $\text{CDCl}_3$ , de <b>1a</b> .....	79
Figura 34	– Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ , 75 MHz, $\text{CDCl}_3$ , de <b>1a</b> .....	80
Figura 35	– Cromatograma (CG/DIC) da mistura dos álcoois <i>R</i> - <b>1a</b> ( $T_R$ 15,498 min) e <i>S</i> - <b>1a</b> ( $T_R$ 15,743 min) obtido por biorredução com grãos de <i>X. americana</i> .	81
Figura 37	– Cromatograma (CG/EM) do produto <b>2a</b> de biorredução da 3'-metoxiacetofenona ( <b>2</b> ) com grãos de <i>X. americana</i> .....	82
Figura 37	– Espectro de massas de <b>2</b> , $T_R = 10,763$ minutos .....	82
Figura 38	– Espectro de massas de <b>2a</b> , $T_R = 10,874$ minutos .....	82
Figura 39	– Espectro de RMN de $^1\text{H}$ , 300 MHz, $\text{CDCl}_3$ , de <b>2a</b> .....	83
Figura 40	– Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ , 75 MHz, $\text{CDCl}_3$ , de <b>2a</b> .....	83
Figura 41	– Cromatograma CG/DIC da mistura dos álcoois <i>R</i> - <b>2a</b> ( $T_R$ 19,558 min) e <i>S</i> - <b>2a</b> ( $T_R$ 19,708 min) obtido por biorredução com grãos de <i>X. americana</i> .....	84

Figura 42	– Cromatograma (CG/EM) do produto <b>3a</b> de biorredução da 4'-flúoracetofenona ( <b>3</b> ) com grãos de <i>X. americana</i> .....	85
Figura 43	– Espectro de massas de <b>3</b> , T <sub>R</sub> = 7,817 minutos .....	85
Figura 44	– Espectro de massas de <b>3a</b> , T <sub>R</sub> = 8,157 minutos .....	85
Figura 45	– Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, 300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>3a</b> .....	86
Figura 46	– Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>3a</b> .....	86
Figura 47	– Cromatograma CG/DIC da mistura dos alcoóis <i>R</i> - <b>3a</b> (T <sub>R</sub> 14,296 min) e <i>S</i> - <b>3a</b> (T <sub>R</sub> 14,642 min) obtido por biorredução com grãos de <i>X. americana</i> ....	87
Figura 48	– Cromatograma (CG/EM) do produto <b>4a</b> de biorredução da 4'-cloroacetofenona ( <b>4</b> ) com grãos de <i>X. americana</i> .....	88
Figura 49	– Espectro de massas de <b>4</b> , T <sub>R</sub> = 10,189 minutos .....	88
Figura 50	– Espectro de massas de <b>4a</b> , T <sub>R</sub> = 10,417 minutos .....	88
Figura 51	– Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, 300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>4a</b> .....	89
Figura 52	– Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>4a</b> .....	89
Figura 53	– Cromatograma CG/DIC da mistura dos alcoóis <i>R</i> - <b>4a</b> (T <sub>R</sub> 19,618 min) e <i>S</i> - <b>4a</b> (T <sub>R</sub> 19,912 min) obtido por biorredução com grãos de <i>X. americana</i> ....	90
Figura 54	– Cromatograma (CG/EM) do produto <b>5a</b> da biorredução de 2',4'-dicloroacetofenona ( <b>5</b> ) com grãos de <i>X. americana</i> .....	91
Figura 55	– Espectro de massas de <b>5</b> , T <sub>R</sub> = 11,080 minutos .....	91
Figura 56	– Espectro de massas de <b>5a</b> , T <sub>R</sub> = 11,481 minutos .....	91
Figura 57	– Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, 300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>5a</b> .....	92
Figura 58	– Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>5a</b> .....	92
Figura 59	– Cromatograma CG/DIC da mistura dos alcoóis <i>R</i> - <b>5a</b> (T <sub>R</sub> 21,978 min) e <i>S</i> - <b>5a</b> (T <sub>R</sub> 22,908 min) obtido por biorredução com grãos de <i>X. americana</i> ....	93
Figura 60	– Cromatograma (CG/EM) do produto <b>6a</b> de biorredução da cicloexanona ( <b>6</b> ) com grãos de <i>X. americana</i> .....	94
Figura 61	– Espectro de massas de <b>6</b> , T <sub>R</sub> = 3,946 minutos .....	94

Figura 62	– Espectro de massas de <b>6a</b> , T <sub>R</sub> = 3,788 minutos .....	94
Figura 63	– Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, 300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>6a</b> .....	95
Figura 64	– Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>6a</b> .....	95
Figura 65	– Cromatograma (CG/EM) do produto <b>7a</b> de biorredução da octan-2-ona ( <b>7</b> ) com grãos de <i>X. americana</i> .....	96
Figura 66	– Espectro de massas de <b>7</b> , T <sub>R</sub> = 5,839 minutos .....	96
Figura 67	– Espectro de massas de <b>7a</b> , T <sub>R</sub> = 6,099 minutos .....	97
Figura 68	– Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, 300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>7a</b> .....	97
Figura 69	– Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, 300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>7a</b> .....	98
Figura 70	– Cromatograma CG/DIC da mistura dos acetatos <i>R</i> - <b>7a</b> (T <sub>R</sub> 11,898 min) e <i>S</i> - <b>7a</b> (T <sub>R</sub> 12,751 min) .....	99
Figura 71	– Cromatograma (CG/EM) do produto <b>8a</b> de biorredução da undecan-2-ona ( <b>8</b> ) com grãos de <i>X. americana</i> .....	99
Figura 72	– Espectro de massas de <b>8</b> , T <sub>R</sub> = 10,629 minutos .....	100
Figura 73	– Espectro de massas de <b>8a</b> , T <sub>R</sub> = 10,684 minutos .....	100
Figura 74	– Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, 300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>8a</b> .....	100
Figura 75	– Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>8a</b> .....	101
Figura 76	– Cromatograma CG/DIC da mistura dos acetatos <i>R</i> - <b>8a</b> (T <sub>R</sub> 17,690 min) e <i>S</i> - <b>8a</b> (T <sub>R</sub> 18,139 min) .....	102
Figura 78	– Cromatograma (GC/EM) do produto <b>9a</b> de redução do benzaldeído ( <b>9</b> ) com grãos de <i>X. americana</i> .....	103
Figura 78	– Espectro de massas de <b>9</b> , T <sub>R</sub> = 5,356 minutos .....	103
Figura 79	– Espectro de massas de <b>9a</b> , T <sub>R</sub> = 7,380 minutos .....	104
Figura 80	– Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, 300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>9a</b> .....	104
Figura 81	– Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>9a</b> .....	105
Figura 82	– Espectro de RMN de <sup>13</sup> C-DEPT 135°, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>9a</b> .....	105
Figura 83	– Cromatograma (GC/EM) dos aldeídos <b>10</b> (a), <b>11</b> (b) e <b>12</b> (c) .....	107

Figura 84	– Cromatograma (GC/EM) do produto <b>10a</b> de redução do 3-metoxibenzaldeído ( <b>10</b> ) com grãos de <i>X. americana</i> .....	109
Figura 85	– Espectro de massas de <b>10</b> , T <sub>R</sub> = 9,863 minutos .....	109
Figura 86	– Espectro de massas de <b>10a</b> , T <sub>R</sub> = 10,621 minutos .....	109
Figura 87	– Espectro de massas de <b>10b</b> , T <sub>R</sub> = 11,673 minutos .....	110
Figura 88	– Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, 300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>10a</b> .....	110
Figura 89	– Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>10a</b> .....	111
Figura 90	– Espectro de RMN de <sup>13</sup> C-DEPT 135°, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>10a</b> .....	111
Figura 91	– Cromatograma (GC/EM) do produto <b>11a</b> de redução do 4-metoxibenzaldeído ( <b>11</b> ) com grãos de <i>X. americana</i> .....	112
Figura 92	– Espectro de massas de <b>11</b> , T <sub>R</sub> = 10,461 minutos .....	112
Figura 93	– Espectro de massas de <b>11a</b> , T <sub>R</sub> = 10,629 minutos .....	113
Figura 94	– Espectro de massas de <b>11b</b> , T <sub>R</sub> = 11,750 minutos .....	113
Figura 95	– Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, 300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>11a</b> .....	113
Figura 96	– Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>11a</b> .....	114
Figura 97	– Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>11a</b> .....	114
Figura 98	– Cromatograma (GC/EM) do produto <b>12a</b> de redução da vanilina ( <b>12</b> ) com grãos de <i>X. americana</i> .....	115
Figura 99	– Espectro de massas de <b>12</b> , T <sub>R</sub> = 11,480 minutos .....	115
Figura 100	– Espectro de massas de <b>12a</b> , T <sub>R</sub> = 11,768 minutos .....	116
Figura 101	– Espectro de massas de <b>12b</b> , T <sub>R</sub> = 8,400 minutos .....	116
Figura 102	– Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, 300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>12a</b> .....	116
Figura 103	– Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>12a</b> .....	117
Figura 104	– Espectro de RMN de <sup>13</sup> C-DEPT 135°, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>12a</b> .....	117
Figura 105	– Cromatograma (GC/EM) do produto <b>13a</b> de redução do 1-naftaldeído ( <b>13</b> ) com grãos de <i>X. americana</i> .....	118

Figura 106 – Espectro de massas de <b>13</b> , T <sub>R</sub> = 12,130 minutos .....	118
Figura 107 – Espectro de massas de <b>13a</b> , T <sub>R</sub> = 12,499 minutos .....	119
Figura 108 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, 300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>13a</b> .....	119
Figura 109 – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>13a</b> .....	120
Figura 110 – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C-DEPT 135°, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>13a</b> .....	120
Figura 111 – Cromatograma (CG/EM) do produto <b>14a</b> de hidrólise do benzoato de metila ( <b>14</b> ) com grãos de <i>X. americana</i> .....	122
Figura 112 – Espectro de massas de <b>14</b> , T <sub>R</sub> = 8,502 minutos .....	122
Figura 113 – Espectro de massas de <b>14a</b> , T <sub>R</sub> = 9,591 minutos .....	123
Figura 114 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, 300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>14a</b> .....	123
Figura 115 – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>14a</b> .....	124
Figura 116 – Cromatograma (CG/EM) do produto <b>15a</b> de hidrólise do benzoato de etila ( <b>15</b> ) com grãos de <i>X. americana</i> .....	125
Figura 117 – Espectro de massas de <b>15</b> , T <sub>R</sub> = 9,523 minutos .....	125
Figura 118 – Espectro de massas de <b>15a</b> , T <sub>R</sub> = 9,654 minutos .....	125
Figura 119 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, 300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>15a</b> .....	126
Figura 120 – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>15a</b> .....	126
Figura 121 – Cromatograma (CG/EM) do produto <b>16a</b> de hidrólise do acetato de benzila ( <b>16</b> ) com grãos de <i>X. americana</i> .....	127
Figura 122 – Espectro de massas de <b>16</b> , T <sub>R</sub> = 9,457 minutos .....	127
Figura 123 – Espectro de massas de <b>16a</b> , T <sub>R</sub> = 7,388 minutos .....	128
Figura 124 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, 300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>16a</b> .....	128
Figura 125 – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>16a</b> .....	129
Figura 126 – – Cromatograma (CG/EM) do produto <b>17a</b> de hidrólise do acetato de 4'-cloro-1-feniletila ( <b>17</b> ) com grãos de <i>X. americana</i> .....	130
Figura 127 – Espectro de massas de <b>17</b> , T <sub>R</sub> = 11,268 minutos .....	130



Figura 128 – Espectro de massas de <b>17a</b> , T <sub>R</sub> = 10,489 minutos .....	130
Figura 129 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, 300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>17a</b> .....	131
Figura 130 – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>17a</b> .....	131
Figura 131 – Cromatograma CG/DIC da mistura de alcoóis <i>R</i> - <b>17a</b> (T <sub>R</sub> 19,612 min) e <i>S</i> - <b>17a</b> (T <sub>R</sub> 19,908 min) obtido por hidrólise com grãos de <i>X. americana</i> .....	132
Figura 132 – Cromatograma (CG/EM) do produto <b>18a</b> de hidrólise do acetato de 1-feniletila ( <b>18</b> ) com grãos de <i>X. americana</i> .....	133
Figura 133 – Espectro de massas de <b>18</b> , T <sub>R</sub> = 9,746 minutos .....	133
Figura 134 – Espectro de massas de <b>18a</b> , T <sub>R</sub> = 7,886 minutos .....	133
Figura 135 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, 300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>18a</b> .....	134
Figura 136 – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>18a</b> .....	134
Figura 137 – Cromatograma CG/DIC da mistura de alcoóis <i>R</i> - <b>18a</b> (T <sub>R</sub> 15,495 min) e <i>S</i> - <b>18a</b> (T <sub>R</sub> 15,741 min) obtida por hidrólise com grãos de <i>X. americana</i> .....	135
Figura 138 – Rendimentos reacionais das acetilações do álcool benzílico com os grãos de <i>X. americana</i> .....	137
Figura 139 – Cromatograma (GC/EM) do produto <b>19a</b> de acetilação do álcool benzílico ( <b>19</b> ) com grãos de <i>X. americana</i> .....	138
Figura 140 – Espectro de massas do <b>19</b> , T <sub>R</sub> = 7,416 minutos .....	138
Figura 141 – Espectro de massas <b>19a</b> , T <sub>R</sub> = 9,446 minutos .....	139
Figura 142 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, 300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>19a</b> .....	139
Figura 143 – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>19a</b> .....	140
Figura 144 – Cromatograma (CG/EM) do produto <b>20a</b> de acetilação do álcool 3-metoxibenzílico ( <b>20</b> ) com grãos de <i>X. americana</i> .....	141
Figura 145 – Espectro de massas de <b>20</b> , T <sub>R</sub> = 10,730 minutos .....	141
Figura 146 – Espectro de massas de <b>20a</b> , T <sub>R</sub> = 11,446 minutos .....	141
Figura 147 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, 300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>20a</b> .....	142
Figura 148 – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>20a</b> .....	142

Figura 149 – Cromatograma (CG/EM) do produto <b>21a</b> de acetilação do álcool 4-metoxibenzila ( <b>21</b> ) com grãos de <i>X. americana</i> .....	143
Figura 150 – Espectro de massas de <b>21</b> , T <sub>R</sub> = 10,694 minutos .....	143
Figura 151 – Espectro de massas de <b>21a</b> , T <sub>R</sub> = 11,546 minutos .....	144
Figura 152 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, 300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>21a</b> .....	144
Figura 153 – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>21a</b> .....	145
Figura 154 – Cromatograma (GC/EM) do produto <b>22a</b> de acetilação do 1-feniletanol ( <b>22</b> ) com grãos de <i>X. americana</i> .....	146
Figura 155 – Espectro de massas de <b>22</b> , T <sub>R</sub> = 7,915 minutos .....	146
Figura 156 – Espectro de massas de <b>22a</b> , T <sub>R</sub> = 9,464 minutos .....	146
Figura 157 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, 300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>22a</b> .....	147
Figura 158 – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>22a</b> .....	147
Figura 159 – Cromatograma CG/DIC da mistura de éteres <i>R</i> - <b>22a</b> (T <sub>R</sub> 13,669 min) e <i>S</i> - <b>22a</b> (T <sub>R</sub> 14,321 min) obtida por acetilação com grãos de <i>X. americana</i> .....	148
Figura 160 – Cromatograma (GC/EM) do produto <b>23a</b> de redução do cicloexanol ( <b>23</b> ) com os grãos de <i>X. americana</i> .....	149
Figura 161 – Espectro de massas de <b>23</b> , T <sub>R</sub> = 3,814 minutos .....	149
Figura 162 – Espectro de massas de <b>23a</b> , T <sub>R</sub> = 7,428 minutos .....	149
Figura 163 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, 300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>23a</b> .....	150
Figura 164 – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>23a</b> .....	150
Figura 165 – Cromatograma (CG/EM) do produto <b>24a</b> de acetilação do álcool <i>n</i> -octanol ( <b>24</b> ) com grãos de <i>X. americana</i> .....	151
Figura 166 – Espectro de massas de <b>24</b> , T <sub>R</sub> = 8,042 minutos .....	151
Figura 167 – Espectro de massas de <b>24a</b> , T <sub>R</sub> = 9,911 minutos .....	152
Figura 168 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, 300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>24a</b> .....	152
Figura 169 – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , de <b>24a</b> .....	153
Figura 170 – Aparelhagem para a determinação do teor de proteínas totais .....	157

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	– Reação de sililação do ácido palmítico com BSTFA e TMCS .....	29
Esquema 2	– Reação geral de saponificação/metilação de um glicerídeo .....	30
Esquema 3	– Fragmentação do TMS éter do ácido palmítico (ácido hexadecanoico) <i>m/z</i> 313, 145, 132, 117.....	41
Esquema 4	– Fragmentação do éter TMS do $\beta$ -sitosterol .....	44
Esquema 5	– Formação do fragmento <i>m/z</i> 204 via rearranjo tipo McLafferty .....	48
Esquema 6	– Formação do fragmento <i>m/z</i> 204 via rotas alternativas em piranosídeos ..	48
Esquema 7	– Formação dos íons em <i>m/z</i> 217 e 437 da <i>D</i> -Frutose TMS .....	49
Esquema 8	– Obtenção dos extratos e frações da <i>X. americana</i> Linn .....	69
Esquema 9	– Reações de biorredução de cetonas catalisadas pelos grãos de <i>X americana</i> .....	77
Esquema 10	– Reações de biorredução de aldeídos catalisadas pelos grãos de <i>X americana</i> .....	106
Esquema 11	– Reações de hidrólise de ésteres catalisadas pelos grãos de <i>X. americana</i> .	121
Esquema 12	– Reações de acetilação de alcoóis catalisadas pelos grãos de <i>X. americana</i> .....	137

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das enzimas segundo a IUBMB .....	34
Tabela 2 – Principais coatores em biocatálise .....	34
Tabela 3 – Extratos hexânico (EHXA) e etanólico (EEXA) x frações de partição .....	37
Tabela 4 – Constituintes identificados por CG/EM no extrato hexânico sililado dos grãos de <i>X. americana</i> Linn .....	40
Tabela 5 – Constituintes identificados por CG/EM no extrato etanólico sililado dos grãos de <i>X. americana</i> Linn .....	46
Tabela 6 – Ácidos graxos identificados como ésteres metílicos (AGME 24-28) .....	51
Tabela 7 – Dados espectrais de RMN de <sup>13</sup> C dos triterpenos <b>XA-2a</b> , <b>XA-2b</b> , <b>XA-2c</b> ...	66
Tabela 8 – Percentual de atividade antioxidante (%AA) dos extratos das sementes de <i>X. americana</i> frente ao DPPH .....	67
Tabela 9 – Fracionamento cromatográfico do produto metilado .....	74
Tabela 10 – Percentagens relativas de bioconversão obtidas por CG/EM e excesso enantioméricos obtidos por CG/DIC dos produtos da biorredução de <b>1–8</b> ...	78
Tabela 11 – Percentagens relativas obtidas por CG/EM dos produtos da biorredução de <b>9–13</b> .....	103
Tabela 12 – Percentagens relativas obtidas por CG/EM dos produtos da hidrólise de <b>14–18</b> .....	121
Tabela 13 – Percentagens relativas obtidas por CG/EM dos produtos da acetilação de <b>19–24</b> .....	137

## LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etila
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimetilsilila)trifluoroacetamida
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG/DIC	Cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização em chamas
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CENAUREM	Centro Nordeste de Aplicações e Uso da Ressonância Magnética Nuclear
DCM	Diclorometano
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsufóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EEXA	Extrato etanólico da <i>Ximenia americana</i>
EHXA	Extrato hexânico da <i>Ximenia americana</i>
FHEHXA	Fração hexânica do extrato hexânico da <i>Ximenia americana</i>
FDEHXA	Fração diclorometano do extrato hexânico da <i>Ximenia americana</i>
FAEHXA	Fração acetato de etila do extrato hexânico da <i>Ximenia americana</i>
HEX	Hexano
IV	Infravermelho
LDL-C	<i>Low Density Lipoprotein cholesterol</i>
LEMANOR	Laboratório de Espectrometria de Massas do Nordeste
min	minutos
m/v	Relação massa/volume
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
TMCS	Trimetilclorosilano
TMS	Trimetilsilila
T <sub>R</sub>	Tempo de retenção

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	24
<b>2</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	27
<b>2.1</b>	<b>Espécie botânica, uso medicinal popular, atividade biológica, metabólitos nas cascas, folhas e raízes</b> .....	27
<b>2.2</b>	<b>Reações de derivatização</b> .....	29
<b>2.2.1</b>	<i>Sililação</i> .....	29
<b>2.2.2</b>	<i>Metilação</i> .....	30
<b>2.3</b>	<b>Atividades biológicas</b> .....	31
<b>2.3.1</b>	<i>Antioxidante</i> .....	31
<b>2.3.2</b>	<i>Inibição da enzima acetilcolinesterase</i> .....	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	34
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	34
<b>4</b>	<b>PARTE 1: INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS HEXÂNICO E ETANÓLICO DOS GRÃOS DE <i>X. americana</i></b> .....	35
<b>4.1</b>	<b>Resultados e discussão</b> .....	35
<b>4.1.1</b>	<i>Rendimentos de extratos e frações</i> .....	35
<b>4.1.2</b>	<i>Identificação dos derivados trimetilsilil (TMS) por CG/EM</i> .....	35
<b>4.1.2.1</b>	<i>Derivados no extrato hexânico</i> .....	35
<b>4.1.2.2</b>	<i>Derivados no extrato etanólico</i> .....	42
<b>4.1.3</b>	<i>Identificação de ácidos graxos através dos derivados metilados por CG/EM</i> .	47
<b>4.1.4</b>	<i>Caracterização de XA-2</i> .....	53
<b>4.1.5</b>	<i>Caracterização de XA-1</i> .....	59
<b>4.1.6</b>	<i>Atividade antioxidante</i> .....	62
<b>4.1.7</b>	<i>Inibição da enzima acetilcolinesterase</i> .....	63
<b>5</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	63
<b>5.1</b>	<b>Material vegetal</b> .....	63
<b>5.2</b>	<b>Reagentes, solventes e equipamentos</b> .....	63
<b>5.3</b>	<b>Obtenção dos extratos</b> .....	64
<b>5.4</b>	<b>Cromatografia de adsorção</b> .....	69
<b>5.5</b>	<b>Métodos físicos de análise orgânica</b> .....	69

5.5.1	<i>Espectrometria de absorção na região do infravermelho (IV)</i> .....	69
5.5.2	<i>Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)</i> .....	69
5.5.3	<i>Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM)</i> .....	70
5.6	<b>Determinação do teor de proteínas totais nos grãos de <i>X. americana</i></b> .....	70
5.7	<b>Determinação do teor de óleo</b> .....	72
5.8	<b>Determinação do teor de umidade</b> .....	72
5.9	<b>Outros parâmetros físicos</b> .....	73
5.10	<b>Derivatização</b> .....	73
5.10.1	<i>Sililação</i> .....	73
5.10.2	<i>Análise dos produtos sililados</i> .....	73
5.10.3	<i>Saponificação/metilação</i> .....	73
5.10.4	<i>Análise dos produtos metilados</i> .....	74
5.11	<b>Isolamento de XA-1</b> .....	74
5.12	<b>Isolamento de XA-2</b> .....	75
5.13	<b>Atividade antioxidante</b> .....	75
5.14	<b>Inibição da enzima acetilcolinesterase</b> .....	76
6	<b>PARTE 2: INVESTIGAÇÃO DO USO DOS GRÃOS DE <i>X. americana</i> COMO CATALISADOR EM BIOTRANSFORMAÇÕES</b> .....	76
6.1	<b>Resultados e discussão</b> .....	76
6.1.1	<i>Determinação de proteína pelo método de Kjeldahl</i> .....	76
6.1.2	<i>Redução de cetonas</i> .....	77
6.1.3	<i>Redução de aldeídos</i> .....	102
6.1.4	<i>Hidrólise de ésteres</i> .....	121
6.1.5	<i>Esterificação (acilação) de alcoóis</i> .....	135
6.2	<b>Parte experimental</b> .....	153
6.2.1	<i>Material vegetal</i> .....	153
6.2.2	<i>Reagentes e solventes</i> .....	153
6.2.3	<i>Métodos cromatográficos</i> .....	154
6.2.4	<i>Métodos espectrométricos</i> .....	154
6.2.4.1	<i>Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de Massa (CG/EM)</i> .....	154
6.2.4.2	<i>Cromatografia gasosa acoplado ao detector de ionização em chama (CG/DIC)</i> .....	154
6.2.4.3	<i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C)</i> .....	155

6.2.5	<i>Transformações biocatalisadas</i> .....	155
6.2.5.1	<i>Redução de aldeídos e cetonas</i> .....	155
6.2.5.2	<i>Hidrólise de ésteres</i> .....	156
6.2.5.3	<i>Acetilação de alcoóis</i> .....	156
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	157
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	159



## 1 INTRODUÇÃO

O homem, desde o início da civilização, vem buscando no seu cotidiano na natureza, soluções para o combate às enfermidades. A eficácia terapêutica das plantas para a saúde humana continua a ser demonstrada ao longo dos séculos em todo o mundo. Um grande número (aproximadamente 40%) de medicamentos disponíveis na terapêutica atual foi desenvolvido a partir de fontes naturais (CARNEIRO *et al.*, 2014), a maior parte, de plantas. O Brasil possui a maior biodiversidade do planeta, com cerca 14% da diversidade de plantas do mundo (CALIXTO, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2014).

Uma parcela significativa dessa biodiversidade está no semiárido nordestino brasileiro, conhecido como “caatinga”, também com variada riqueza em espécies vegetais pouco estudadas e com grande potencial não aproveitado (NASCIMENTO *et al.*, 2011; SARMENTO, 2013). Diversas espécies frutíferas não tradicionais são utilizadas, eventualmente, pelas populações locais por apresentarem cor, aroma e sabor atraentes, entretanto, na maioria das vezes, as informações acerca dos valores nutritivos e medicinais agregadas a esses vegetais não bastam.

*Ximения americana* é uma espécie abundante no Nordeste do Brasil, especialmente no Ceará, onde é conhecida como ameixa-do-mato (MATOS, 2007). Partes desta planta, principalmente, as cascas, são utilizadas popularmente no tratamento de diversas enfermidades como, por exemplo: antimicrobiana, pesticida, analgésica, antiviral, toxicidade e anticâncer. Existem relatos na literatura, incluindo estudos do nosso grupo de pesquisa, sobre a caracterização de constituintes químicos (sesquiterpenos, triterpenos, ácidos graxos insaturados, entre alguns outros) a partir de extratos hexano e alcoólico do caule, cascas e raízes de *X. americana* (CHAVES *et al.*, 2014; MONTE *et al.*, 2012). Seus frutos são comestíveis e os grãos, com grande massa lipídica, altos teores de proteínas e de óleo, eventualmente, podem ter aproveitamentos nutracêutico (humano ou animal), medicamentoso, cosmético (BOMBARDELLI *et al.*, 1994; CRISTONI *et al.*, 1999; LIU; LONGMORE; FOX, 1996), ou ainda, como matéria prima para a produção de biodiesel.

Os ácidos graxos naturais esterificados têm papel de destaque na alimentação humana, desempenhando funções biológicas importantes no metabolismo. Os chamados ácidos graxos essenciais fazem parte das membranas celulares e são precursores de mediadores de respostas imunológicas e inflamatórias, ao passo que, os ácidos graxos insaturados, exercem efeito protetor do organismo por reduzirem os níveis sanguíneos de LDL-C (colesterol ruim) e triglicerídeos, resultando em proteção cardiovascular

(NASCIUTTI *et al.*, 2015). Os sais desses ácidos obtidos por ação de álcalis são usados na fabricação de sabões e detergentes ou, são acidificados, para outros usos, inclusive alimentares. Embora os ácidos graxos insaturados sejam os mais saudáveis, estudos são ainda necessários para melhorar a conservação de óleos comestíveis, sobretudo, em óleos com alta concentração de insaturados, em consequência da auto-oxidação (rancidez) (VIANNI; BRAZ-FILHO, 1996). Vale acrescentar o emprego de ácidos graxos naturais para a produção de biocombustíveis através de esterificação com alcoóis leves (metanol, etanol).

Os carboidratos são macronutrientes que, quando ingeridos e absorvidos, são responsáveis por liberar glicose e fornecer energia para as células do corpo. Na falta de carboidratos, os músculos são afetados, pois, as proteínas passam a ser utilizadas como fonte de energia. Especificamente, caso o indivíduo não tenha glicose disponível para a utilização nas células, como nos casos de jejum ou dietas restritivas, os lipídios serão oxidados, formando uma quantidade excessiva de cetonas que poderão causar uma acidose metabólica no organismo, podendo levar a sintomas como dores de cabeça, tontura, mau hálito, cansaço, náuseas, nervosismo, fraqueza e tremores. Estudos publicados (LOPES; PELUZIO; HERMSDORFF, 2016) apontam que o desequilíbrio na proporção dos macronutrientes pode ser prejudicial à saúde, uma vez que a troca de carboidratos por proteínas leva o indivíduo a um quadro de cetose, acarretada pela restrição da glicose. A deficiência dos macronutrientes é causada pela diminuição do consumo de frutas, vegetais e grãos, levando ao aumento da ureia e do ácido úrico devido ao excesso de proteínas na dieta.

A segunda parte do projeto envolveu o uso dos grãos de *X. americana* como biocatalisador em síntese orgânica. Conforme os diversos trabalhos constantes da literatura (CORDELL *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2015), o uso de vegetais como biocatalisadores em reações orgânicas pode oferecer uma excelente alternativa para a realização de transformações químicas na obtenção de intermediários ou de produtos acabados com potencial farmacêutico, cosmético ou agrícola. Estas transformações químicas levam em conta vários aspectos significativos: a) a utilização de vegetais localmente disponíveis; b) técnicas laboratoriais simples, com vantagens econômicas e ecológicas; c) os sistemas enzimáticos são renováveis e biodegradáveis; d) enzimas reagem com substratos diversos catalisando processos quimio-, regio- e enantiosseletivamente.

Com o progresso no uso de plantas em biotransformações, três sistemas distintos têm sido utilizados para a modificação de substratos: e) cultura de células; f) enzimas isoladas; g) partes integrais. Diversos exemplos relacionados ao uso dos sistemas vegetais acima descritos podem ser citados. Por exemplo, no tocante ao primeiro, foi observado a

biotransformação de uma série de monoterpenos através de cultura de células de *Nicotiana tabacum*, onde a reação dominante foi a oxidação regioseletiva de grupo metil a grupo hidroxila (CORDELL *et al.*, 2007). Outros exemplos, utilizando a mesma cultura de células e monoterpenos monocíclicos como substratos, foram dados pela oxidação do  $\alpha$ -terpineol a 7-hidroxi- $\alpha$ -terpineol e do *trans*- $\beta$ -terpineol a 4-hidroxi e 10-hidroxi-*trans*- $\beta$ -terpineol, revelando em todos eles, oxidação estereosseletiva alílica.

No caso de enzimas isoladas, lípases derivadas de plantas foram utilizadas para a transformação biocatalítica de lipídeos, particularmente, na hidrólise de ésteres por triacilglicerol acilhidrolases (CORDELL *et al.*, 2007). Outro fato foi dado pelo uso da isoenzima lipoxigenase na modificação de ácidos graxos naturais e sintéticos para gerar derivados hidroperóxidos regio- e estereoespecificamente (HANSEN, 2013).

Com relação ao uso dos sistemas intactos de plantas, diversas vantagens podem ser enumeradas. Não há a necessidade de cofatores, os quais são providos pelas próprias plantas; dependendo do vegetal, um determinado enantiômero pode ser formado com alto rendimento e alto excesso enantiomérico, satisfazendo, eventualmente, a necessidade de um produto bioativo. Em adição, os fatores como menor tempo, menor custo e fácil manipulação do sistema reativo tornam o uso de plantas intactas uma alternativa muito econômica. Vale ressaltar a possibilidade de reuso (4–6 vezes) destes sistemas sem substancial perda de atividade, o que reduz bastante custos adicionais. Os trabalhos pioneiros utilizaram raízes de *Daucus carota* (cenoura) para a redução de metilciclohexanona (CORDELL *et al.*, 2007) com obtenção de derivados esteroisoméricos em diferentes proporções, dependendo do tempo de reação. Estes resultados motivaram estudos posteriores empregando sistemas integrais de plantas ao invés de sistemas de células imobilizadas ou derivados de enzimas; diversas cetonas alifáticas e aromáticas e  $\beta$ -cetoésteres foram reduzidos enantioselectivamente pelo uso das raízes de *D. carota* com excessos enantioméricos acima de 90% e rendimentos de 50-82% (CORDELL *et al.*, 2007; OMORI; PORTAS; OLIVEIRA, 2012).

No caso das acetofenonas, foi observado que a presença de grupos doadores de elétrons diminuiu a velocidade de reação e, para dois  $\beta$ -cetoésteres racêmicos, o isômero *R* foi reduzido mais rápido que o enantiômero-*S* originando o produto (1*R*,2*S*). Muitos outros exemplos com fins científico e/ou biotecnológico já são conhecidos e devidamente publicados na literatura. Pesquisas avaliando vegetais e derivados vegetais abundantes e localmente disponíveis representam uma possibilidade para expandir o papel dos produtos naturais na busca de insumos ou de produtos finais, com interesse farmacêutico, agroquímico e químico-industrial.

Assim, esta segunda parte teve como objetivo investigar a possibilidade do uso dos grãos de *X. americana* como biocatalisador na forma de material integral em reações de redução de aldeídos e cetonas, esterificação (acetilação) de alcoóis e hidrólise de ésteres.

## 2 CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 2.1 Considerações botânicas sobre a planta

*Ximenia americana* Linn (Figura 1) conhecida como “ameixa do mato”, é uma espécie espontaneamente adaptada à região semiárida do Brasil. É uma planta cosmopolita caracterizada como um arbusto de 3-4 metros de altura ou árvore pequena espinhosa de casca fina, avermelhada ou cinza, lisa ou pouco rugosa, com folhas pequenas, simples, inteiras e flores branco-amareladas e aromáticas. Seus frutos são aromáticos, do tipo drupa, de cor amarelo alaranjado (MATOS, 2007). Pertencente à família Olacaceae, a planta ocorre predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais: África, Índia, Nova Zelândia, América Central e América do Sul (CHAVES *et al.*, 2014). É conhecida também como ameixa-brava, ameixa-do-sertão e ameixera-do-Brasil (SOUZA; LORENZI, 2005); os frutos, cascas, folhas e raízes são utilizados para o tratamento de diversas patologias em humanos. A casca, em específico, é relatada para o tratamento da hanseníase, malária, infecções na pele, hemorroidas, inflamações de mucosa oral, e inflamações gerais, úlceras estomacais, cefaleia e dores gástricas (REZANKA e SIGLER, 2007; BRASILEIRO *et al.*, 2008; OGUNLEYE; IBITOYE, 2003; LE *et al.*, 2012).

Figura 1 – Fotos da espécie *X. americana* Linn



Fonte: adaptado de <http://www.acguanacaste.ac.cr>

Muitos estudos de diferentes partes da planta evidenciaram que o extrato aquoso da casca apresenta diferentes efeitos biológicos, tais como, atividade antimalárica, anticancerígena e antinociceptiva. Já o extrato etanólico da casca foi relacionado às atividades antimicrobiana, antioxidante, antiparasitária e anti-inflamatória (SILVA, 2013).

Os extratos aquoso e metanólico das folhas, cascas e raízes de *X. americana*, apresentam na sua composição química a presença de carboidratos na forma de açúcares e amido solúvel, compostos fenólicos, como os derivados de ácido gálico e flavonoides, saponinas, taninos e glicosídeos cardiotônicos (JAMES *et al.*, 2007; OGUNLEYE; IBITOYE, 2003; EROMOSELE; EROMOSELE, 2002; MEVY *et al.*, 2006; ARAÚJO; MONTE; BRAZ-FILHO, 2009). Entretanto, poucos estudos têm relacionado os constituintes químicos dessa planta com os seus efeitos biológicos (LE *et al.*, 2012).

## **2.2 Reações de derivatização**

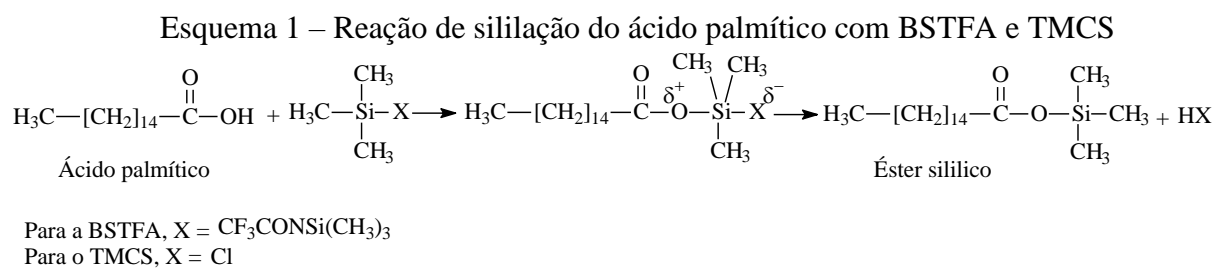
### **2.2.1. Sililação**

Tendo em vista um dos objetivos principais do estudo, ou seja, a identificação dos componentes químicos no óleo dos grãos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) e, considerando o desconhecimento prévio das classes de compostos presentes (hidrocarbonetos, alcoóis, ésteres de ácidos graxos, açúcares, etc.), a preparação de derivados voláteis tornou-se um imperativo básico.

A derivatização, para o caso em questão, ao modificar a funcionalidade da molécula, ostenta diversos benefícios, pois, diminui a polaridade, aumenta a volatilidade e a estabilidade térmica, facilitando a separação cromatográfica dos componentes. Em adição, evita a perda de analito por adsorção na coluna melhorando a resposta no detector e uma separação mais eficiente dos picos cromatográficos (SEBBEN, 2007), isto é, melhora o perfil cromatográfico. A escolha do reagente derivatizante baseia-se no grupo funcional (aminas, ácidos carboxílicos, cetonas, aldeídos e alcoóis) que é necessário derivatizar, na estrutura química e nas propriedades da molécula. Vale ressaltar, porém que, conforme aumenta o número de grupos derivatizados na molécula, há o risco, de que a massa molecular da substância derivatizada se encontre fora da faixa de detecção do espectrômetro de massas (HALKET *et al.*, 2005).

Os métodos mais comumente utilizados de derivatização são a sililação, acetilação e alquilação, ocorrendo uma substituição do hidrogênio ativo dos grupos polares, como, NH,

OH, e SH por grupos silila, acila, alquila, respectivamente. Essas substituições aumentam significativamente a volatilização das amostras (SEBBEN, 2007). A combinação do *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) e trimetilclorosilano (TMCS) resulta num produto versátil, que reage com uma grande quantidade de compostos orgânicos. O TMCS aumenta a reatividade do BSTFA na sililação dos analitos (FREITAS, 2007). Em adição, os derivados sililados, além de serem facilmente sintetizados, permitem ser analisados diretamente, ou seja, sem tratamento prévio. O Esquema 1 representa a reação de sililação do ácido palmítico.



Fonte: adaptado de Silva (2012).

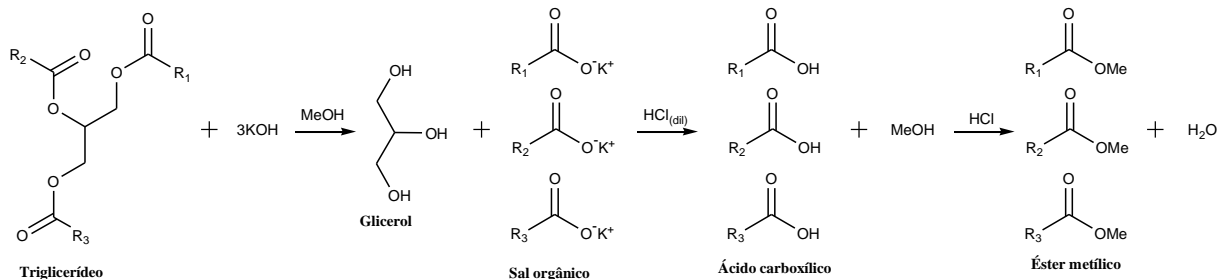
### 2.2.2 Metilação

Basicamente, dois caminhos reacionais têm sido mais frequentemente utilizados para converter ácidos graxos em ésteres metílicos: a metanólise alcalina branda e a saponificação seguida da metilação dos ácidos graxos (saponificação/metilação) (Esquema 2, p. 30). A metanólise alcalina branda é uma reação de transesterificação em uma única etapa, catalisada por um álcali na presença de metanol, eficiente, principalmente, para a formação de ésteres metílicos de ácidos graxos a partir de lipídios com ligações éster (KATES, 1986).

O caminho via saponificação/metilação é eficiente para produzir ésteres metílicos de ácidos graxos (e outros compostos metilados) a partir de ácidos graxos e aldeídos livres, bem como, a partir de lipídios com ligações éster, éter e amina. O processo é realizado em duas etapas, ambas sob temperatura elevada, que incluem a saponificação catalisada por uma base (usualmente NaOH ou KOH) e a metilação catalisada por ácido (HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) na presença de metanol. Na primeira etapa são formados sais de cadeia longa de metais alcalinos (saponificação), os quais, em uma segunda etapa, são convertidos nas formas voláteis (ésteres metílicos) para análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM).

O Esquema 2 representa as reações de saponificação e metilação a partir de um glicerídeo genérico.

Esquema 2 – Reação geral de saponificação/metilação de um glicerídeo



Fonte: elaborado pelo autor.

## 2.3 Atividades biológicas

### 2.3.1 Antioxidante

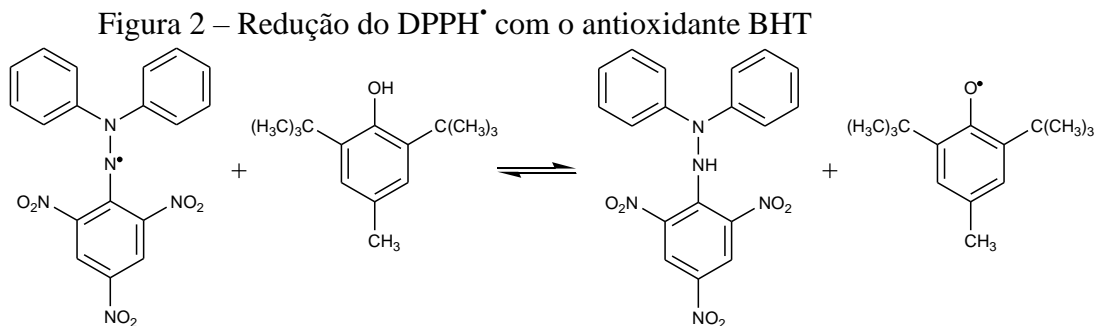
Os antioxidantes são utilizados para impedir a oxidação de outras substâncias químicas que ocorre por reações metabólicas ou devido a fatores exógenos como as radiações ionizantes (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

Considerando a diversidade da estrutura química dos compostos antioxidantes e de seus mecanismos de ação, vários ensaios têm sido desenvolvidos para avaliar o potencial antioxidante de diferentes compostos. Alguns deles determinam a habilidade dos antioxidantes para sequestrar radicais livres gerados no meio da reação, enquanto outros avaliam a eficiência dos antioxidantes em inibir a peroxidação lipídica, como dienos conjugados e hidroperóxidos, bem como dos produtos de decomposição da peroxidação lipídica, através da quantificação dos produtos da reação utilizando lipídeos como substrato (ANTOLOVICH *et al.*, 2002; GIADA; MANCINI-FILHO, 2004).

Um desequilíbrio entre as fontes exógenas (radiação, fumo, poluentes, praguicidas, estresse, drogas) e os agentes antioxidantes do organismo pode implicar em inúmeros processos patológicos como câncer, diabetes, isquemia, cirrose, artrite reumatoide, doenças vasculares, mal de Alzheimer, mal de Parkinson e envelhecimento precoce (DALLE-DONE *et al.*, 2003; CAETANO, 2009; SOUZA, 2010).

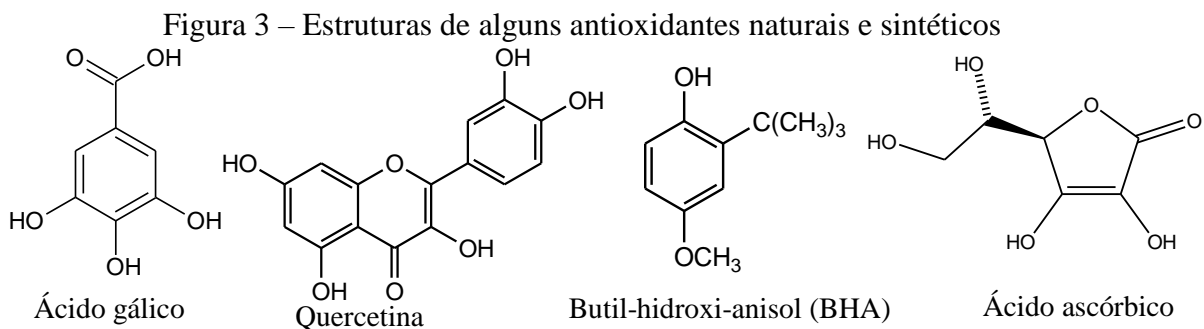
Os métodos que envolvem um radical cromóforo recebem destaque porque simulam as espécies reativas de oxigênio. Um dos radicais mais utilizados é o DPPH<sup>•</sup> (2,2-

difenil-1-picrilhidrazila). Este método, por ser prático, rápido e sensível, é amplamente empregado (ARNAO, 2000). O DPPH<sup>•</sup> é um radical livre estável, de cor violeta, com banda de absorção em solução metanólica centrada em 517 nm e o método utilizando esse radical foi proposto inicialmente por Blois (1958). Neste ensaio, o antioxidante reage com o radical DPPH<sup>•</sup>, convertendo-o em sua forma reduzida (Figura 2). Nesta reação, a solução metanólica de DPPH<sup>•</sup>, inicialmente de coloração violeta, torna-se descolorida e o grau desta descoloração indica a habilidade do antioxidante em sequestrar o radical livre (MOLYNEUX, 2004).

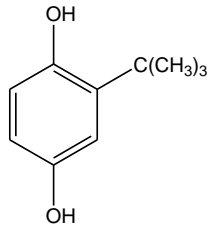


Fonte: Adaptado de Silva (2012).

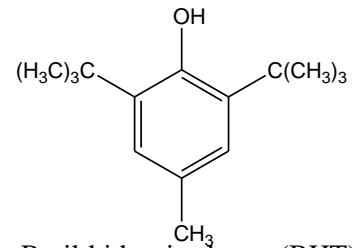
Os metabólitos secundários das plantas como taninos, lignanas, cumarinas, quinonas, ácidos fenólicos, flavonoides e proantocianinas podem prevenir ou impedir o início de doenças degenerativas, devido a sua propriedade redox, permitindo que atuem como doadores de hidrogênio reduzindo agentes oxidantes como os radicais hidroxila ou sequestrando radicais como o superóxido (BIANCHI; ANTUNES, 1999; KUSKOSKI *et al.*, 2005; SUN *et al.*, 2011). Entre os antioxidantes naturais podem ser citados os tocoferóis, carotenos, ácidos fenólicos e flavonoides e, entre os antioxidantes sintéticos o butilhidroxitolueno (BHT), o butilhidroxianisol (BHA) e o terciobutilhidroxinona (TBHQ) (Figura 3).







Terc-butyl-hidroxi-quinona (TBHQ)



Butil-hidroxi-tolueno (BHT)

Fonte: elaborado pelo autor.

Levando em consideração esses fatos de extremo interesse, surge à necessidade de pesquisar o potencial antioxidante das mais diversas matérias primas, sobretudo, as de origem de vegetais com potencial medicinal.

### 2.3.2 Inibição da enzima acetilcolinesterase

A atividade antiacetilcolinesterásica é a capacidade de uma substancia em inativar reversível e/ou irreversivelmente a enzima acetilcolinesterase (AChE). Esta atividade inibitória pode ser avaliada nos modos qualitativos e quantitativos. A AChE presente nos sistemas nervoso central e periférico, é responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas através da reação de hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) (PETRONILHO; PINTO; VILLARA, 2011).

O sitio ativo é composto por uma tríade catalítica que possui resíduos dos aminoácidos serina (Ser-200), histidina (His0440) e glutamato (Glu-327). No mecanismo de hidrólise do neurotransmissor é gerado um intermediário que produz colina livre e serina acetilada. A hidrólise deste grupo acetila pela água recupera o sitio ativo da enzima (TREVISAN *et al.*, 2003).

Segundo trabalhos publicados (PETRONILHO; PINTO; VILLARA, 2011), a enzima acetilcolinesterase está envolvida nos processo do mal de Alzheimer. Esta doença tem como característica a diminuição da capacidade cognitiva, causando demência e atingindo principalmente pessoa com mais de 60 anos, sendo o sistema colinérgico o mais afetado (FORLENZA, 2005). Um tratamento promissor é conseguido pelo aumento do nível circulante de acetilcolina no cérebro usando inibidores da enzima acetilcolinesterase (SERENIKI e VITAL, 2008).

Estudos mostraram que essa inibição pode ser obtida através de metabólitos provenientes de espécies vegetais, incluindo aquelas substâncias que apresentam atividade antioxidante (FEITOSA *et al.*, 2015; BANDEIRA *et al.*, 2002; ).

## **2.4 Biocatálise**

A biocatálise é uma área multidisciplinar e a cada dia torna-se mais importante principalmente para a fabricação de novos materiais e no melhoramento de processos industriais. Há muitos anos utilizam-se os catalisadores biológicos, mas a compreensão do funcionamento das reações biológicas veio apenas com o avanço da biologia molecular e da enzimologia, permitindo o uso de enzimas isoladas, normalmente obtidas comercialmente, micro-organismos (marinhos e terrestres) e usando células animais e vegetais (ROSSET, 2011).

A aplicação da biocatálise na química apresenta com grande vantagem a obtenção de compostos quirais, ou seja, na produção de substâncias enantiomericamente puras. O mercado da produção de fármacos quirais cresce a cada dia, devido ao alto valor agregado de um medicamento "quiral". Isso é explicado principalmente pela dificuldade de produção utilizando somente a síntese orgânica para se obter uma única substância totalmente pura enantiomericamente (ASSUNÇÃO, 2008; MANOEL, 2011). Como solução para este problema deve-se fazer a união da biocatálise com a síntese orgânica no desenvolvimento de novas moléculas complexas e mais eficazes no tratamento de doenças.

Com as novas tecnologias que estão sendo desenvolvidas, enzimas mais compatíveis com solventes orgânicos e altas temperaturas estão se tornando cada vez mais disponíveis, o que certamente levará às indústrias a utilizarem a biocatálise como uma alternativa técnica e economicamente viável para a síntese assimétrica.

### **2.4.1 Enzimas**

A importância do uso de enzimas em biocatálise tem se mostrado cada vez mais evidente grande versatilidade de reações catalisadas, condições brandas de reação, natureza regio, quimio e enantiosseletiva são algumas de suas vantagens. As enzimas são classificadas e codificadas pela *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) e estão divididas em seis classes principais e várias subclasses, de acordo com a reação química envolvida (Tabela 1, p. 34).

Tabela 1 – Classificação das enzimas segundo a IUBMB

Classe	Tipo de reação	Subclasse
1 Oxirredutase	Reações de oxi-redução, ou seja, transferência de elétrons	Desidrogenases, desaturases, hidroxilases, oxidases, oxigenases, redutases,
2 Transferases	Transferência de grupos (aminas, acilas, carboxilas)	Quinases, algumas mutases, fosforilases, polimerases, transaldolases, transcetolases, transaminases, transcarboxilases
3 Hidrolases	Reações de hidrólise covalente	Lípases, esterases, Nucleosidases, nucleotidases, peptidases, fosfatases, sulfatases
4 Liases	Reações de adição de grupos a dupla ligações ou formação de duplas ligações por remoção de grupos	Aldolases, descarboxilases, hidratases, sintases, fosfatases
5 Isomerasas	Reações de interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos	Racemases, epimerases, mutases
6 Ligases	Formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O e ésteres de fosfato	Sintetases e carboxilases

Fonte: *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* - IUBMB (Out, 2016).

Muitos biocatalisadores requerem a presença de cofatores para ativar a função das proteínas. as necessárias pra função de uma enzima. Estes cofatores não estão ligados permanentemente à molécula da enzima, mas na ausência deles a enzima é inativa (ASSUNÇÃO, 2008). Os cofatores enzimáticos podem ser íons metálicos ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ ) ou moléculas orgânicas, chamadas de coenzima (quase sempre derivados de vitaminas) (Tabela 2).

Tabela 2 – Principais cofatores em biocatálise

Coenzima	Tipo de reação
$\text{NAD}^+/\text{NADH}$	Remoção ou adição de hidrogênio
$\text{NADP}^+/\text{NADPH}$	Remoção ou adição de hidrogênio
ATP, GTP, CTP e UTP	Fosfoliração
SAM	$\text{C}_1$ -alquilação
Acetil-CoA	$\text{C}_2$ -alquilação
Flavinas	Oxigenação

Fonte: Assunção (2008).

Nas biorreduções de aldeídos e cetonas por oxirredutases são utilizados os cofatores NADH e NADPH, pois estas substâncias garantem a transferência dos elétrons necessários para o processo de redução.

#### ***2.4.2 Vantagens e desvantagens***

O interesse, principalmente pela indústria farmacêutica, por compostos enantiomericamente puros, vêm incentivando os químicos orgânicos a desenvolverem metodologias de síntese altamente seletivas. O uso de biocatalisadores com esta finalidade representa uma importante alternativa, associado a algumas vantagens e desvantagens, tais como:

- **Vantagens:** são capazes de acelerar as reações de  $10^6$  a  $10^{12}$  vezes em relação a uma reação correspondente não catalisada; são ecologicamente corretos por serem biodegradáveis e não gerarem resíduos altamente tóxicos; atuam sob condições brandas de reações; interagem com uma grande variedade de substratos sintéticos; atuam em meios aquosos e em solventes orgânicos; podem catalisar uma ampla faixa de reações químicas, além de apresentarem quimio-, regio- e enantiosseletividade.

- **Desvantagens:** são sensíveis a condições energéticas; apresentam atividade máxima em água; algumas enzimas necessitam de cofatores e estes são caros e de difícil recuperação; impossibilidade de inversão quiral e podem causar alergias, em casos específicos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Investigar os extratos hexânico e etanólico dos grãos de *X. americana*, identificando seus principais componentes como derivados sililados e metilados utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM) como técnica principal. Em adição, investigar a possibilidade do uso dos grãos da planta na forma integral como catalisador em reações de biotransformações.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Identificar os componentes químicos presentes nos grãos utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas;
- Contribuir com o estudo químico do óleo fixo de *X. americana*;
- Isolar e elucidar a estrutura de metabólitos diversos presentes nos extratos por espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ ), de Massa e no Infravermelho (IV);
- Verificar a possível capacidade antioxidante dos extratos hexânico e etanólico dos grãos de *X. americana* através dos métodos do radical DPPH $^\bullet$ ;
- Avaliar a possível inibição da enzima acetilcolinesterase utilizando extratos hexânico e etanólico dos grãos de *X. americana*;
- Registrar o possível uso dos grãos de *X. americana* em reações de biotransformações (redução, hidrólise e esterificação) de forma simples, econômica e ambientalmente sustentável.

## 4 PARTE 1: INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS HEXÂNICO E ETANÓLICO DOS GRÃOS DE *X. americana*

### 4.1 Resultados e discussão

#### 4.1.1 Rendimentos de extratos e frações

Em experimentos separados, os extratos hexânico e etanólico das sementes de *X. americana* foram submetidos a partição em coluna filtrante utilizando os solventes com polaridade crescente: hexano, DCM, AcOEt e MeOH. Os respectivos rendimentos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Extratos hexânico (EHXA) e etanólico (EEXA) x frações de partição

Extratos	Frações dos extratos			
	Hex	DCM	AcOEt	MeOH
EHXA (34,89%)	56,42%	10,67%	7,68%	3,57%
EEXA (2,63%)	4,28%	-	38,12%	22,26%

EHXA: extrato hexânico; EEXA: extrato etanólico; Hex: hexânico; DCM: diclorometano; AcOEt: acetato de etila; MeOH: metanol.

Fonte: elaborado pelo autor.

Conforme os resultados (Tabela 3), o extrato hexânico apresentou maior rendimento quando comparado ao extrato etanólico. Na pré-concentração dos extratos, a fração hexânica apresentou o maior rendimento no extrato hexânico e a fração AcOEt maior rendimento no extrato etanólico.

#### 4.1.2 Teor de óleo e umidade

Após a extração do óleo com hexano utilizando um extrator do tipo Soxhlet por um período ininterrupto de 6 horas a partir de 21,394 g dos grãos, foi obtida a massa 5,904 g do óleo, representando o teor de 27,71% de óleo presente nos grãos de *X. americana*.

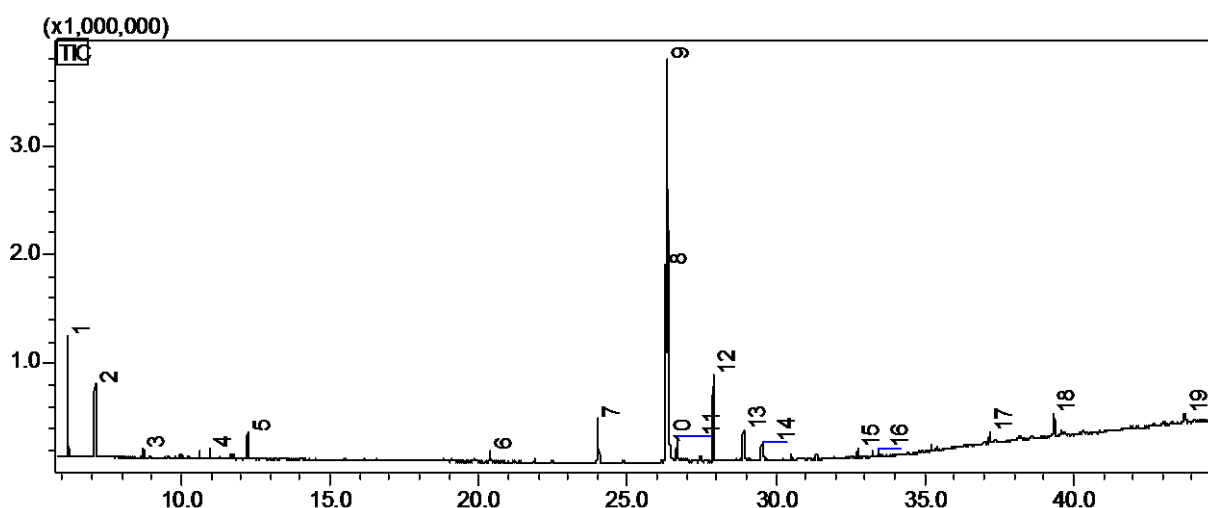
O teor de umidade foi determinado utilizando-se 30,974 g dos grãos, que após a desidratação no período de 24 horas, forneceu a massa constante de 21,394 g, representando o teor de umidade de 31,32%.

### 4.1.3 Identificação dos derivados trimetilsilil (TMS)

#### 4.1.3.1 Do extrato hexânico

Após a sililação do extrato hexânico com BSTFA e TMCS, seguido de análise em CG/EM, a comparação dos espectros de massas obtidos com espectros de massas registrados na literatura, destacando, em vários casos, picos correspondentes a fragmentos característicos, permitiu a identificação de 19 substâncias, tendo como constituinte majoritário o ácido *cis*-octadec-9-enoico (38,14%). O cromatograma de íons totais do extrato hexânico é visto na Figura 4 e, os constituintes correspondentes aos seus picos foram relacionados na Tabela 4 (p. 40).

Figura 4 – Cromatograma de íons totais do extrato hexânico sililado dos grãos de *X. americana*



Entre os compostos identificados, a maioria são ácidos graxos, com destaque para os ácidos *cis*-octadec-9-enoico (38,14%), *cis,cis*-9,12-octadecadienoico (18,83%), *cis,cis,cis*-9,12,15-octadecatrienoico (7,22%) e hexadecanoico (4,17%), conhecidos como ácidos oleico, linoleico, linolênico e palmítico, respectivamente.

Os espectros de massas dos trimetilsilil (TMS) derivados desta classe de compostos apresentam um perfil de fragmentação característico. Assim, seus espectros de massas além do pico do íon molecular ( $[M]^+$ ), mostram como principais sinais, os dos íons em  $m/z$  73, 117, 132, 145 e 313, correspondentes aos fragmentos  $[(CH_3)_3Si]^+$ ,  $[(CH_3)_3SiCO_2]^+$ ,  $[(CH_3)_3SiCO_2CH_3]^+$ ,  $[(CH_3)_3SiCO_2C_2H_4]^+$  e  $[(CH_3)_2SiCO_2C_{15}H_{31}]^+$ , respectivamente (BUDZIKIEWICZ; DJERASSI; WILLIAMS, 1967; FREIRE; SILVESTRE; PASCOAL

NETO, 2002). Em geral, nos espectros de massa com ionização por impacto eletrônico (EI) a 70 eV desses trimetilsilil derivados, o fragmento em  $m/z$  73 ( $\text{TMS}^+$ ) (sem muito significado do ponto de vista estrutural), é registrado como o pico base. Como exemplo, o espectro de massa (Figura 5, p.38) do componente com tempo de retenção 24,0 minutos (Tabela 2, p.34), identificado como sendo o ácido palmítico ( $\text{RCOOTMS}$ ,  $\text{R} = \text{C}_{15}\text{H}_{31}$ ), mostrou um pico de íon molecular em  $m/z$  328.

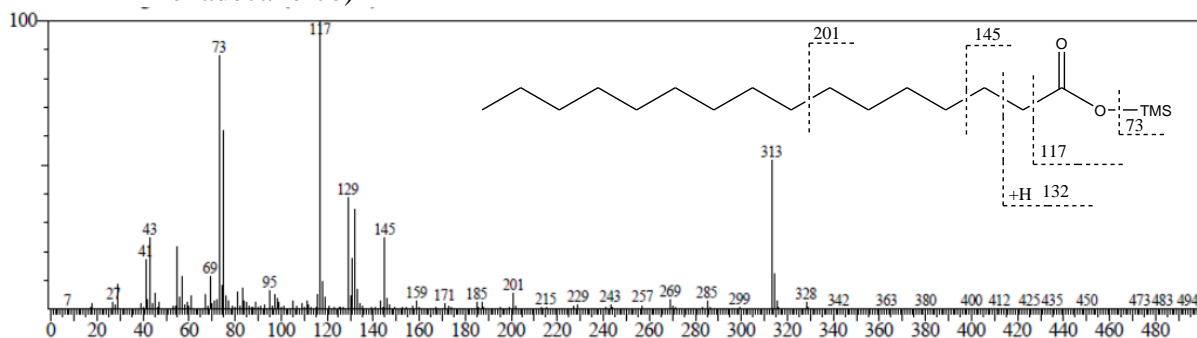


Tabela 4 – Constituintes identificados por CG/EM no extrato hexânico sililado dos grãos de *X. americana* Linn

Pico	Compostos	TR	Área (%)	Principais Fragmentos
1	Ácido etanodioico	6,186	8,21	73(29), 75(39), 90(28), 147(100)
2	Hexametildissiloxano	7,100	5,10	66(12), 73(22), 147(100), 148(17)
3	Dodecametilpentasiloxano	8,732	0,69	73(81), 147(100), 281(91), 369(18)
4	Glicerol	10,957	0,76	73(100), 103(18), 117(19), 147(49), 205(22), 218(14)
5	n.i	12,230	1,89	73(66), 146(100), 205(62), 279(51) 367(100)
6	Ácido nonanodioico	20,403	0,97	55(46), 73(100), 75(76), 117(28), 129(30), 317(21)
7	Ácido hexadecanoico	24,023	4,17	73(89), 75(62), 117(100), 129(40), 132(35), 145(26), 313(52), 328(5)
8	Ácido (9Z,12Z)-octadec-9,12-dienoico	26,297	18,83	73(100), 75(98), 117(20), 129(27), 132(4), 145(8), 337(39), 352(4)
9	Ácido <i>cis</i> -octadec-9-enoico	26,358	38,14	73(100), 75(85), 117(65), 129(70), 132(19), 145(33), 339(47), 354(6)
10	Ácido <i>trans</i> -octadec-9-enoico	26,440	1,70	73(100), 75(80), 117(80), 129(49), 132(15), 145(40), 339(67), 354(7)
11	Ácido octadecanoico	26,666	2,17	73(79), 75(58), 117(100), 129(38), 132(37), 145(27), 341(50), 356(4)
12	Ácido $\alpha$ -linolênico	27,887	7,22	73(80), 75(83), 79(100), 117(22), 129(19), 132(4), 145(10), 335(7), 350(3)
13	Ácido octadecadi-9,12-inoico	28,907	2,52	73(95), 75(100), 91(82), 105(84), 117(50), 119(58), 129(29), 132(7), 145(12), 148(57), 333(8), 348(4)
14	<i>trans</i> -8-trimetilsililoxi-octadec-9-in-11-enoato de metila	29,526	1,24	73(100), 147(13), 217(12), 237(90), 365(4)
15	1-Monooleoilglicerol	32,741	0,90	55(55), 73(94), 103(48), 117(18), 129(100), 147(71), 201(20), 203(28), 205(12), 265(9), 397(40), 410(5), 485(6), 500(3)
16	Ácido tetracosanóico	33,449	0,58	73(100), 75(75), 117(79), 129(30), 132(34), 145(33), 201(12), 425(40), 440(8)
17	Ácido <i>cis</i> -tetracos-15-enóico	37,198	1,13	73(100), 75(82), 117(62), 129(68), 132(22), 145(34), 423(32), 438(8)
18	$\beta$ -Sitosterol	39,343	3,04	43(58), 73(52), 129(100), 255(14), 357(42), 381(22), 396(40), 471(9), 486(14)
19	Lupeol	43,736	0,74	73(50), 189(100), 203(52), 218(38), 279(10), 369(12), 393(9), 408(5), 483(4), 498(9)

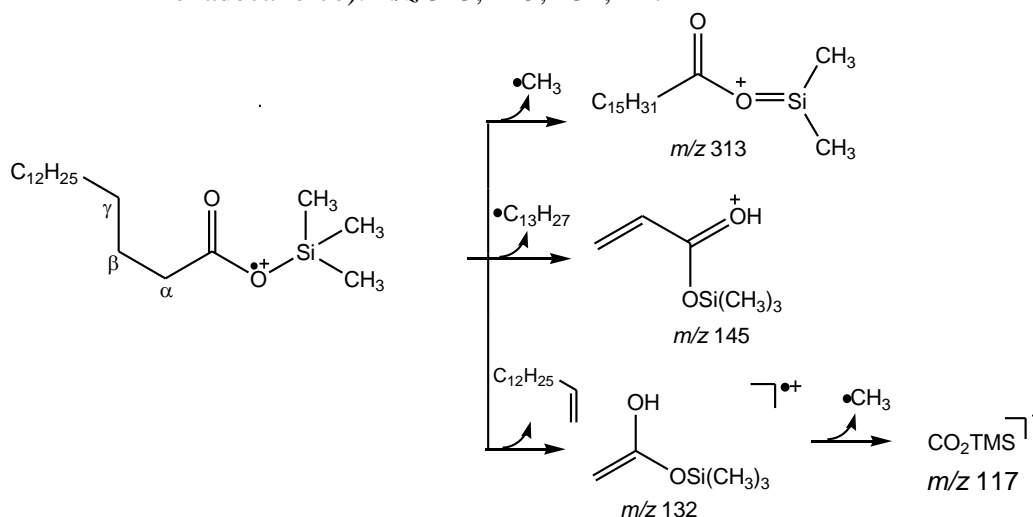
n.i = não identificado; Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 5 – Espectro de massas do derivado TMS do ácido palmítico (ácido hexadecanoico)



A perda de radical metila para originar o fragmento  $m/z$  313 (M-15) ocorre, principalmente, a partir do grupo trimetilsilil (formação de cátion mais estável) (CLAYDEN *et al.*, 2004), embora, esta perda possa ocorrer também a partir da cadeia carbônica (R). Os picos dos fragmentos em  $m/z$  145 e  $m/z$  132 foram explicados através de fissão da ligação  $\beta,\gamma$  (relativo ao grupo C=O) da cadeia carbônica com possível transferência de hidrogênio via um mecanismo envolvendo quatro centros e, através do clássico rearranjo de McLafferty, respectivamente. O cátion-radical em  $m/z$  132, por sua vez, perde radical metila originando o cátion  $m/z$  117 (100%) (SILVÉRIO, 2008) (Esquema 3).

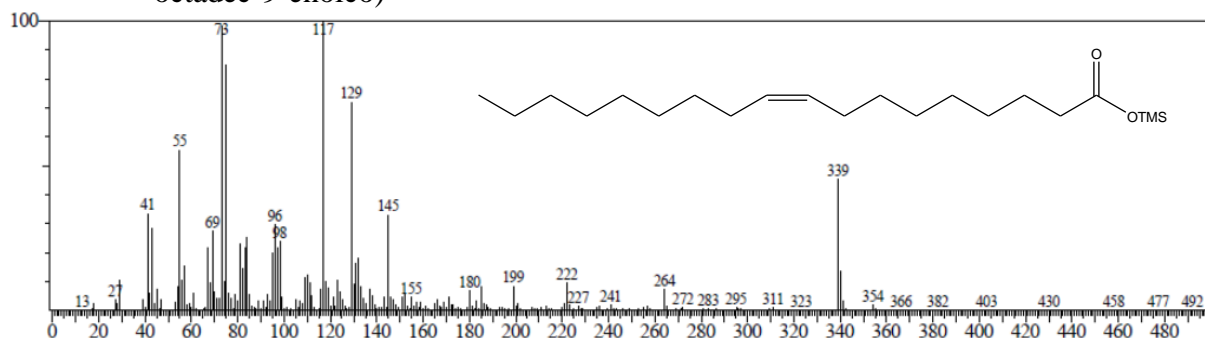
Esquema 3 – Fragmentação do TMS éter do ácido palmítico (ácido hexadecanoico):  $m/z$  313, 145, 132, 117



Fonte: Adaptado de Silvério (2008).

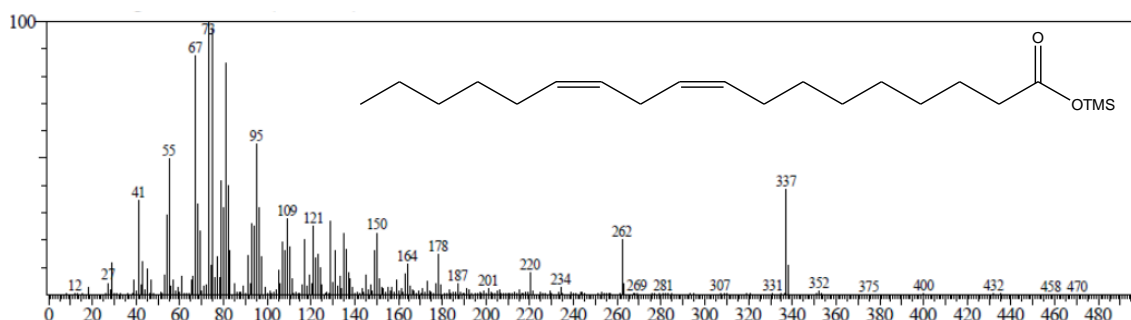
O padrão de fragmentação dos ácidos graxos com número par e número ímpar de carbono é similar, assim, como nos ácidos graxos com uma ligação dupla (C=C) (Figura 6, p. 39) os quais, não apresentam diferenças significativas.

Figura 6 – Espectro de massas do derivado TMS do ácido oleico (ácido *cis*-octadec-9-enoico)

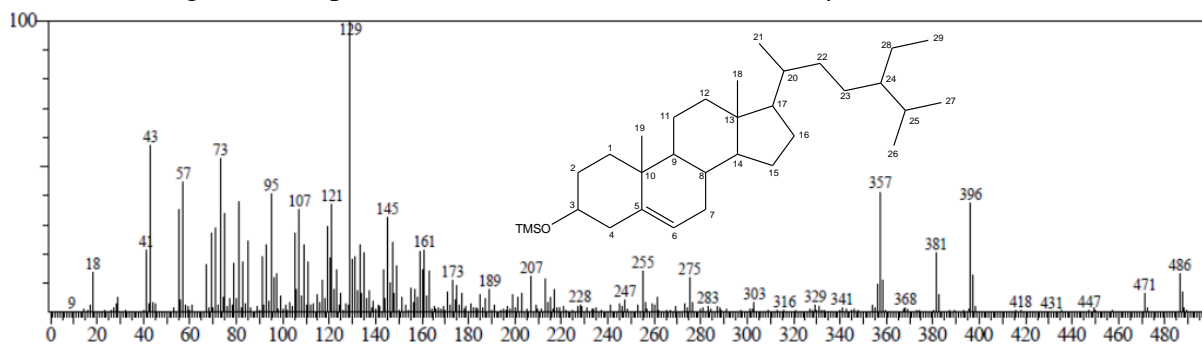


Já, naqueles com duas insaturações, embora o perfil de fragmentação seja semelhante, os picos correspondentes aos fragmentos  $m/z$  145, 132 e 117 são bem menos intensos (Figura 7). Os espectros de massas desses compostos foram comparados com dados de espectros de massas da literatura (biblioteca NIST).

Figura 7 – Espectro de massas do derivado TMS do ácido linoleico (ácido *cis,cis*-9,12-octa-decadienoico)



A técnica (CG/EM) permitiu também detectar a presença de um esteroide como componente do óleo em estudo. Esteroides, em geral, exibem um padrão de fragmentação muito semelhante e, nos espectros de massas de esteroides derivatizados com TMS os picos dos íons moleculares são facilmente reconhecidos. O espectro de massa (Figura 8, p. 40) do constituinte com tempo de retenção 39,3 min (Tabela 4, p. 40) mostrou pico do íon molecular em  $m/z$  486 e foi identificado como o  $\beta$ -Sitosterol.

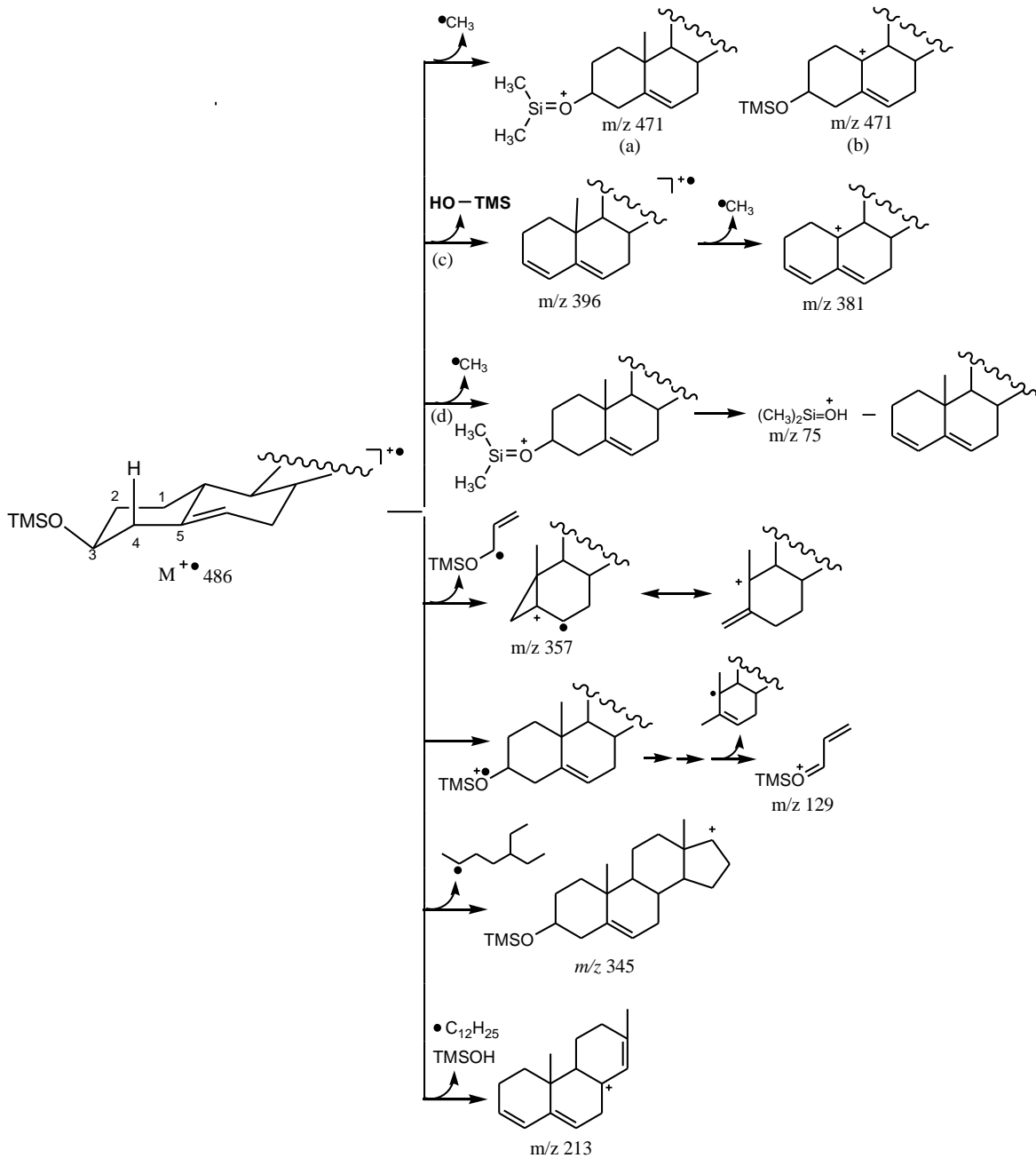
Figura 8 – Espectro de massas do derivado TMS do  $\beta$ -Sitosterol

Os picos em  $m/z$  471, 396, 381, 357, 213 e 129 são os mais representativos do espectro. Correspondem aos fragmentos de maiores massas e são também, relativamente, intensos. O íon em  $m/z$  471 (M-15) pode ser explicado por dois caminhos (Esquema 4, p. 44): fissão de uma ligação C-Si (a) ou da ligação C-10 – C-19 (b). Estudos com marcação isotópica (DIEKMAN e DJERASSI, 1967) em compostos semelhantes confirmaram que o local mais atrativo para a perda do grupo metila está na clivagem da ligação C-Si (a), um tipo de fragmentação muito comum nos espectros de massa de TMS éteres e ésteres. O fragmento responsável pelo pico em  $m/z$  396 [M-90] foi justificado (DIEKMAN e DJERASSI, 1967) pela eliminação de uma molécula de trimetilsilanol [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SiOH] formada mediante a migração de um átomo de hidrogênio via um rearranjo de quatro centros com a consequente formação do sistema dieno ionizado (c).

Estudos com 2,2,4,4-*d*<sub>4</sub> esteroides sugeriram que o hidrogênio migrante origina-se a partir do carbono C-4 e que, com base em considerações estereoquímicas, o hidrogênio axial (H-4 $\beta$ ) é, provavelmente, o átomo migrante (DIEKMAN E DJERASSI, 1967). Outra fragmentação relacionada à M-90 é encontrada através do íon em  $m/z$  75, para o qual, medidas de massa em alta resolução indicaram a composição (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SiOH. O processo se inicia pela perda de um radical metila (M-15) a partir do grupo funcional TMS seguido de formação do cátion dimetilsilanol ( $m/z$  75) conforme mostrado no Esquema 4 (d), p. 44. Marcação com deutério e substituição de átomo hidrogênio por grupo metila no carbono C-4 (DIEKMAN e DJERASSI, 1967) revelaram situação idêntica com a transferência de hidrogênio envolvida na fragmentação M-90, ou seja, cerca de 40% do hidrogênio transferido é proveniente do carbono C-4 e que, provavelmente, o átomo implicado é o hidrogênio H-4 $\beta$  (11). Por sua vez, o fragmento em  $m/z$  396 perde radical metila para produzir o  $m/z$  381. Também, conforme estudos anteriores (SILVERIO *et al.*, 2008), na formação do  $m/z$  357 (M-129), o hidrogênio H-2 é transferido para o carbono C-6 via um sistema de seis centros seguido de clivagem da ligação alílica C-3 e rearranjo no anel (Esquema 4, p.44). O pico base em  $m/z$  129 foi

justificado através de uma fragmentação complexa no anel A. Estudos de marcação isotópica com deutério (DIEKMAN e DJERASSI, 1967; GUSTAFSSON; RYHAGE; SJÖVALL, 1968; BROOKS, 1979) mostraram que o carbono C-4 não faz parte de  $m/z$  129.

Esquema 4 – Fragmentação do éter TMS do  $\beta$ -sitosterol



Fonte: Adaptado de Diekman e Djerassi (1967).

Outros picos devidos a íons ( $m/z$  275, 303, 213, 184, 121, 95, 57, 43) resultantes de fragmentação do núcleo esteroidal e da cadeia lateral foram observados (BUDZIKIOWICZ; DJERASSI; WILLIAMS, 1967; DIEKMAN e DJERASSI, 1967;

BROOKS, 1979). O íon em  $m/z$  213 corresponde à perda de silanol (TMSOH), da cadeia lateral e de três átomos de carbono do anel D, acompanhado pela transferência de um hidrogênio proveniente da espécie iônica (BUDZIKIOWICZ; DJERASSI; WILLIAMS, 1967; DIEKMAN e DJERASSI, 1967). Esta fragmentação foi proposta por Diekman e Djerassi (1967), e confirmada por estudos com marcação de deutério (BROOKS, 1979).

#### 4.1.3.2 Do extrato etanólico

O extrato etanólico (EEXA) foi submetido a reação de sililação com BSTFA/TMCS, em seguida o produto bruto foi injetado no CG/EM, obtendo-se um cromatograma. Os constituintes correspondentes aos 19 picos no cromatograma de íons totais foram identificados mediante a comparação dos espectros de massas obtidos com dados de espectros de massas registrados na literatura, bem como, em função de determinados picos correspondentes de fragmentações características. O componente majoritário foi a *D*-(+)-Sacarose (29,36%). O cromatograma de íons totais está apresentado na Figura 9 e os constituintes relacionados na Tabela 5 (p. 46).

Figura 9 – Cromatograma de íons totais do extrato etanólico sililado dos grãos de *X. americana*

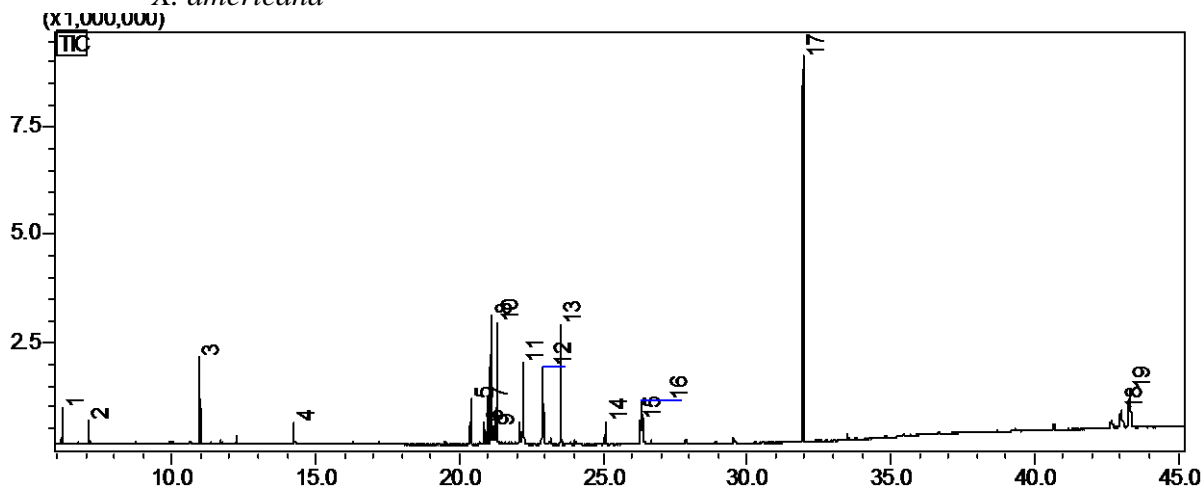


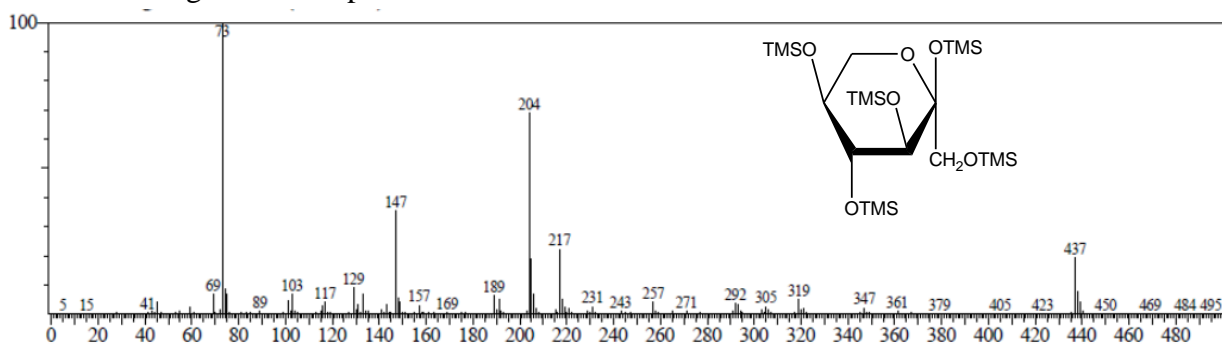
Tabela 5 – Constituintes identificados por CG/EM no extrato etanólico sililado dos grãos de *X. americana* Linn

Pico	Compostos	TR	Área (%)	Principais Fragmentos
1	Etilenoglicol	6,181	2,13	147(100), 73(58), 191(23)
2	Hexametildisiloxano	7,097	1,46	66(12), 73(22), 147(100), 148(14)
3	Glicerol	10,958	5,58	73(100), 103(18), 117(19), 147(80), 205(38), 218(15)
4	n.i	14,239	1,41	172(100), 82(94), 73(22)
5	$\beta$ -D-Galactofuranosídeo-ethyl	20,404	3,04	73(100), 217(82), 147(33)
6	D-frutose	20,856	1,48	73(100), 217(55), 147(25)
7	Ácido manônico	20,982	3,08	73(100), 217(65), 147(27)
8	L(-)-Sorbose	21,091	9,19	73(100), 217(33), 75(23), 204(68)
9	D-Galactose	21,182	1,54	204(100), 73(82), 147(51)
10	Inositol	21,305	8,34	73(100), 147(42), 217(38)
11	$\alpha$ -D-Glicopiranoose	22,212	5,15	204(100), 73(82), 191(40)
12	D-Manitol	22,916	6,27	73(100), 147(51), 319(42)
13	D-glucose	23,521	7,45	204(100), 191(41), 217(18)
14	Scyllo-inositol	25,082	1,62	305, 318, 147
15	Ácido octadec-9,12-dienoico	26,297	1,91	73(94), 75(100), 129(25), 337(34)
16	Ácido octadec-9-enoico	26,353	3,31	73(96), 75(100), 117(79), 129(68), 145(32), 339(42)
17	D-(+)-Sacarose	31,944	29,36	361(100), 73(80), 217(32), 147(23), 103(20), 437(12), 540
18	4,4,6a,11,11,14b-hexametil-1,2,4a,5,6,6b,7,8,10,12,14,14a-dodecahidropiceno-3,9-diona	43,022	1,79	73(100), 75(90), 117(55)
19	Cicloartenol	43,309	5,89	73(100), 117(62), 75(57)

n.i: não identificado; Fonte: elaborada pelo autor.

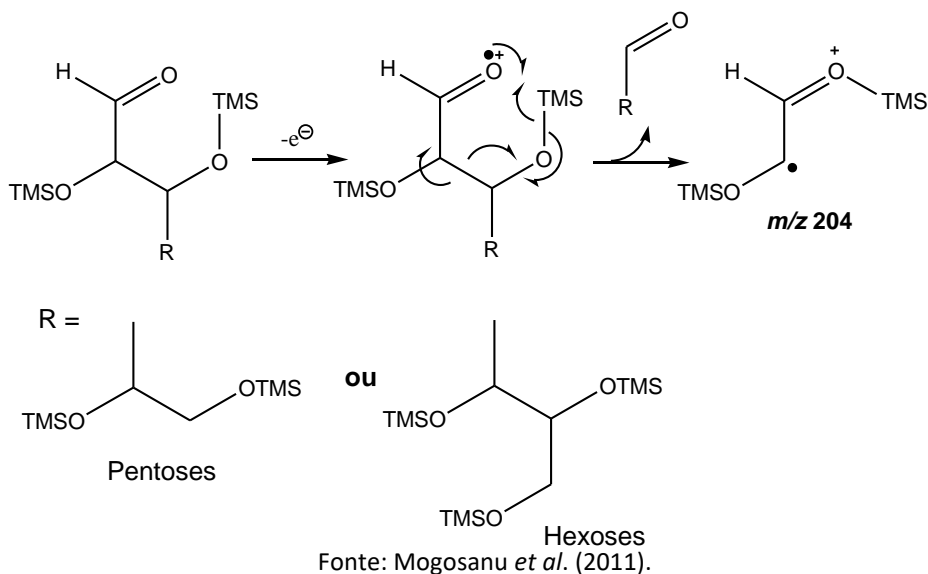
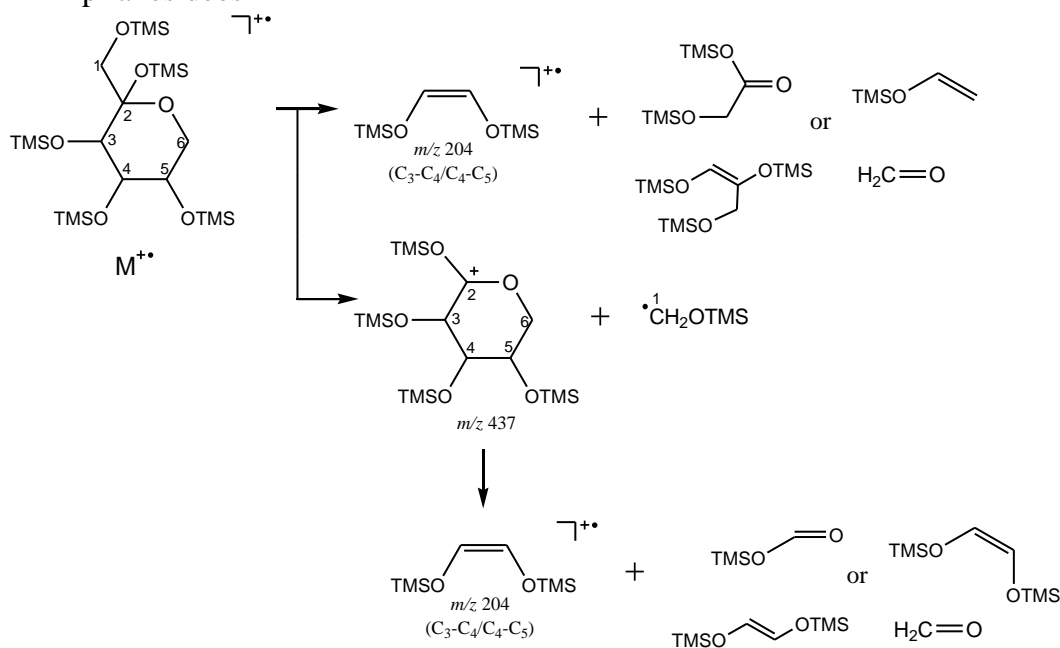
A maioria dos constituintes identificados no EEXA foram carboidratos nas formas furanósica e piranósica tendo, com principais componentes, *D*-(+)-Glicose (29,36%), *L*-(-)-Sorbose (9,19%), *Scyllo*-Inositol (8,34%) e *D*-Glicose (7,45%). A identificação das substâncias como derivados trimetilsilil (TMS), através de CG/EM, foi efetuada em vista da presença de picos nos espectros de massa representantes de fragmentos característicos, de acordo com estudos publicados na literatura (CHIZNOV; MOLODTSOV, 1967; MEDEIROS; SOMONEIT, 2007; FERREIRA, 2011). Por exemplo, os fragmentos em  $m/z$  204 e 217 são comuns nos espectros de massa de trimetilsilil éteres de carboidratos. Os dois picos correspondentes a esses fragmentos são vistos nos espectros de massa de TMS éteres, entretanto, o pico em  $m/z$  204 é, geralmente, o pico mais intenso em derivados de carboidratos na forma de anel piranose. Este detalhe foi observado no espectro de massa (Figura 10) do componente com tempo de retenção 21,09 min (Tabela 5, p. 46). A origem do íon em  $m/z$  204 pode ser explicada segundo diferentes mecanismos. Um deles, percebido em carboidratos em cadeia aberta, envolve o grupo TMS em um rearranjo do tipo McLafferty (PETERSSON, 1972; MOGOSANU *et al.*, 2011) o fragmento sendo formado pelos átomos de carbono C-1–C-2 (Esquema 5, p. 48).

Figura 10 – Espectro de massas do derivado TMS da *L*-Sorbose



Em adição, foi observado que este fragmento constituído de dois carbonos, comumente responsável pelo pico dominante nos espectros de massa de derivados piranosídeos (aldo, ceto e glicosídeos) é formado, prioritariamente, pelos carbonos C-2–C-3 e C-3–C-4 em aldopiranoses (DeJONGH *et al.*, 1969) ou pelos carbonos C-3–C-4 e C-4–C-5 em cetopiranoses (KARADY; PINES, 1970), podendo ser originado a partir do íon molecular ou a partir do íon em  $m/z$  437, em ambos os casos através de fragmentação cíclica (Esquema 6, p. 48).

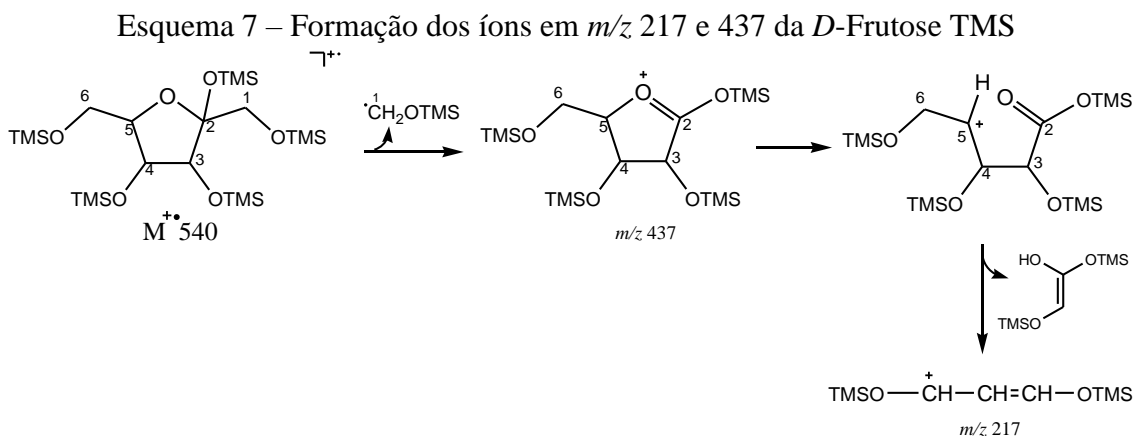
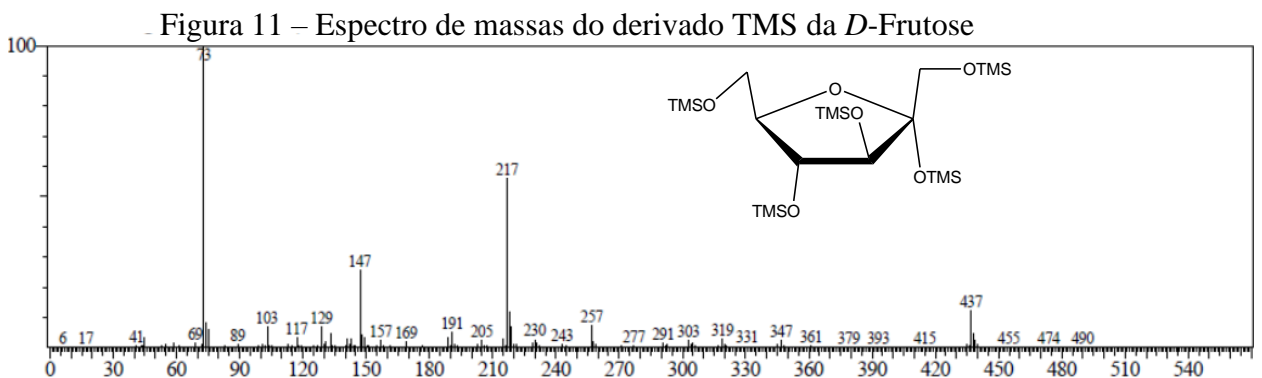


Esquema 5 – Formação do fragmento  $m/z$  204 via rearranjo tipo McLaffertyEsquema 6 – Formação do fragmento  $m/z$  204 via rotas alternativas em piranosídeosFonte: Adaptado de Mogosanu *et al.* (2011).

No caso de aldohexoses o pico em  $m/z$  437, resultante da perda do carbono C-6 e seu substituinte ( $\text{C}^6\text{H}_2\text{OTMS}$ ; fissão da ligação C-5–C-6) é de baixa intensidade, porém, no caso de 2-cetohexoses constitui um pico relativamente intenso e característico (DeJONGH *et al.*, 1969; KARADY; PINES, 1970; GARCIA-RASO *et al.*, 1989), sendo resultante da perda do carbono C-1 e seu substituinte ( $\text{C}^1\text{H}_2\text{OTMS}$ ) através da fissão da ligação C-1–C-2 (DeJONGH *et al.*, 1969; KARADY; PINES, 1970). No presente trabalho, o componente com  $T_R$  21,09 min exibiu em seu espectro de massas um intenso pico em  $m/z$  204, assim como, o

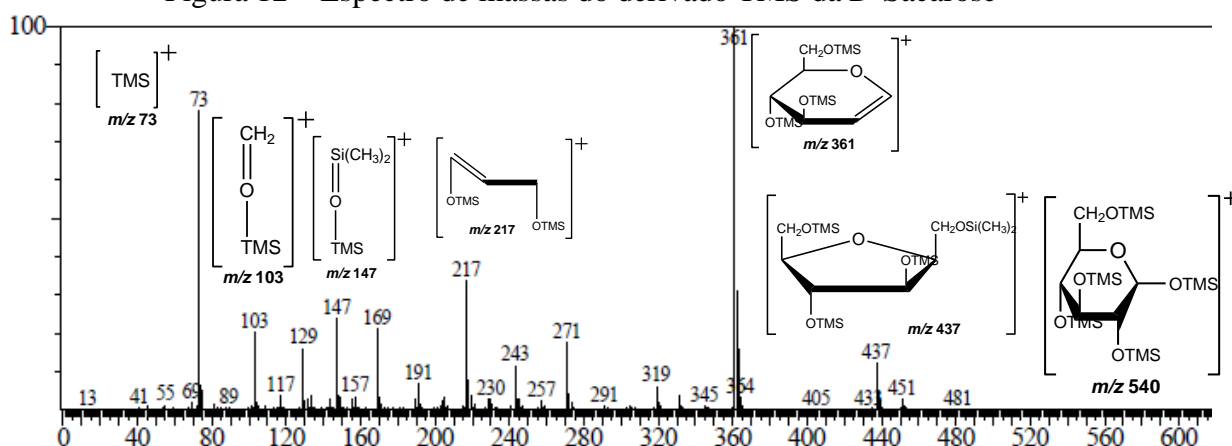
pico em  $m/z$  437 (a partir do íon molecular ( $[M]^+$  540, não registrado no espectro) e, por comparação com dados publicados (MEDEIROS; SIMONEIT, 2007; CHIZHOV; MOLODTSOV; KOCHETKOV, 1967), foi identificado com sendo o carboidrato *L*-Sorbose na forma de anel piranose (Figura 10, p. 44).

Por outro lado, o pico em  $m/z$  204 que é o pico mais intenso nos espectros de massa de glicopiranosídeos é drasticamente reduzido nos espectros de massas de glicofuranosídeos. Em monossacarídeos com anel furanose, o íon em  $m/z$  217 é caracteristicamente intenso (GARCIA-RASO *et al.*, 1989) e, por vezes, o pico base. A alta intensidade relativa deste pico foi observada no espectro de massa do componente com  $T_R$  20,85 min (Tabela 5, p. 46). No espectro (Figura 11), não foi registrado o íon molecular ( $[M]^+$  540), porém, foi registrado o pico em  $m/z$  437 (M-CH<sub>2</sub>OTMS) atribuído, neste caso, a um fragmento típico de cetoses (GARCIA-RASO *et al.*, 1989; KARADY; PINES, 1970) (Esquema 7). Assim, por comparação com do espectro de massa obtido no presente estudo com dados da literatura (MEDEIROS; SIMONEIT, 2007), o componente ( $T_R$  20,85 min) foi identificado como a *D*-Frutose (éter TMS) (Figura 11) como uma estrutura furanosídica.



Finalmente, a comparação do espectro de massa (Figura 12) do componente com  $T_R$  31,94 min (Tabela 5, p. 46) com dados de espectro de massa da literatura (FERREIRA, 2011) permitiu identificar o dissacarídeo *D*-Sacarose (éter TMS), ou seja, as unidades de monossacarídeos sob as formas de anéis piranose e furanose. Vale ressaltar no espectro os picos em  $m/z$  540 (monossacarídeo), 437 (M-CH<sub>2</sub>OTMS), 361, 319, 217 e 204 (baixa intensidade).

Figura 12 – Espectro de massas do derivado TMS da *D*-Sacarose



Os demais constituintes foram identificados (Tabela 5, p. 46) por comparação dos tempos de retenção e dados de espectros de massa registrados na literatura (biblioteca NIST; MEDEIROS; SIMONEIT, 2007; FERREIRA, 2011; DeJONGH *et al.*, 1969).

#### 4.1.4 Identificação de ácidos graxos

O extrato hexânico (EHXA) foi submetido à reação de saponificação (KOH/MeOH) para obtenção dos sais de ácidos graxos livres (item 5.10.3, p. 73) os quais, após acidificação, foram esterificados (MeOH/HCl) para produzirem os respectivos ácidos graxos metilados - AGME. Cromatografia em coluna de gel de sílica do produto bruto de reação originou as frações AGME 24-28, AGME 29-30 e AGME 31-39 (item 5.10.3, p. 73).

Análise de AGME 24-28 em CG/EM mostrou a presença de dez ácidos graxos (Tabela 6, p. 51) através dos íons moleculares  $[M]^+$  (consistentes com as fórmulas moleculares respectivas) e correspondentes aos picos com tempos de retenção ( $T_R$ ) e percentagens (%) no cromatograma de íons totais (Figura 13, p. 48).

Figura 13 – Cromatograma dos íons totais de AGME 24-28

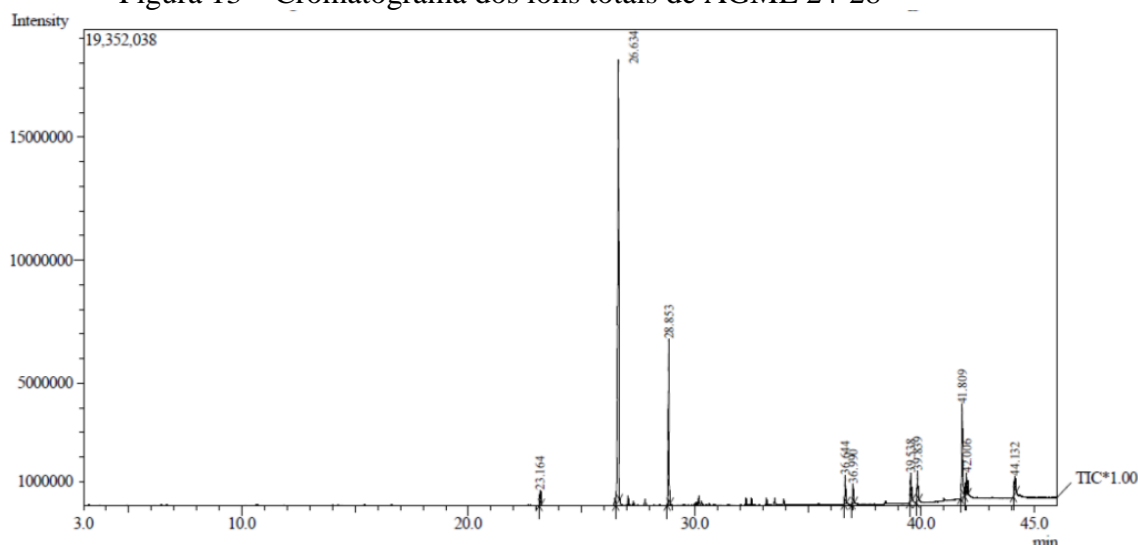


Tabela 6 – Ácidos graxos identificados como ésteres metílicos (AGME 24-28)

	SUBSTÂNCIA	NOME COMUM	T <sub>R</sub> (min)	TEOR (%)	M.M	F.M
1	Ácido hexadecanoico	Ácido palmítico	23,16	1,46	256	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
2	Ácido <i>cis</i> -octadec-9-enoico	Ácido oleico	26,63	55,05	282	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
3	Ácido octadeca-9-in-11- <i>trans</i> -enoico	Ácido ximeninico	28,85	17,38	278	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>
4	Ácido <i>cis</i> -tetracos-15-enoico	Ácido nervonico	36,64	3,00	366	C <sub>24</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>
5	Ácido tetracosanoico	Ácido lignocérico	36,99	2,05	368	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>
6	Ácido <i>cis</i> -hexacos-17-enoico	Ácido ximenico	39,54	3,06	394	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>
7	Ácido hexacosanoico	Ácido cerótico	39,84	3,34	396	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>
8	Ácido <i>cis</i> -octacos-19-enoico	Ácido Ximenixico <sup>a</sup>	41,81	9,85	422	C <sub>28</sub> H <sub>54</sub> O <sub>2</sub>
9	Ácido octacosanoico	Ácido montânico	42,01	2,28	424	C <sub>28</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>
10	Ácido <i>trans</i> -triacont-21-enoico	Ácido lumequeico	44,13	2,22	450	C <sub>30</sub> H <sub>58</sub> O <sub>2</sub>

T<sub>R</sub> : Tempo de retenção; M.M: Massa molar (g mol<sup>-1</sup>); F.M : Fórmula molecular; a: nome comum usado neste trabalho; Fonte: elaborada pelo autor.

Os espectros de massa (EM) dos componentes foram também comparados com espectros de massa de ésteres metílicos de ácidos graxos registrados na literatura e foram concordantes com as estruturas propostas, exibindo fragmentos com relação *m/z* característicos de seus ésteres metílicos. Os componentes principais foram os ácidos *Z*-octadec-9-enoico (55,05%), octadeca-9-in-11-*trans*-enoico (17,38%) e *Z*-docos-13-enoico, conhecidos como ácidos oleico, ximeninico e *cis*-19-octacosenoico, respectivamente (Tabela 6).

Os quatro ácidos graxos saturados (AG1, AG5, AG7 e AG9) exibiram, exatamente, o mesmo padrão de fragmentação, apresentando picos devidos a rupturas da

cadeia alcânica [M-15 (CH<sub>3</sub>) a M-183 (C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>, **AG1**), M-295 (C<sub>21</sub>H<sub>43</sub>, **AG5**), M-323 (C<sub>23</sub>H<sub>47</sub>, **AG7**) e M-351 (C<sub>25</sub>H<sub>51</sub>, **AG9**), picos principais em *m/z* 41, 43, 55, 57, 74, 87 e 143 e pico base em *m/z* 74, este último, resultante de fragmentação retro Diels-Alder.

**AG1.** T<sub>R</sub> 23,16 min: M<sup>+</sup> *m/z* 270 (fórmula molecular C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>), 239 [(M-31)<sup>+</sup>, perda de OCH<sub>3</sub>], 227 (M-43)<sup>+</sup>, 213 (M-57)<sup>+</sup>, 199 (M-71)<sup>+</sup>, 185 (M-85), 171 (M-99)<sup>+</sup>, 143 (C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sup>+</sup>, 101 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sup>+</sup>, 87 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sup>+</sup>, 74 [H<sub>2</sub>C=C(OH)OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 55 (H<sub>2</sub>CCH=C=O)<sup>+</sup>, 57 (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sup>+</sup>, 43 (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sup>+</sup> e 41 (C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>)<sup>+</sup>: Ácido palmítico.

**AG5.** T<sub>R</sub> 36,99 min: M<sup>+</sup> 382 (fórmula molecular C<sub>25</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>), 367 (M-15), 351 (M-31), 353 (M-29), 339 (M-43), 325 (M-57), 311 (M-71), 297 (M-85), 283 (M-99). Os picos principais foram em *m/z* 41 (C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>)<sup>+</sup>, 43 (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sup>+</sup>, 55 (H<sub>2</sub>CCH=C=O)<sup>+</sup>, 57 (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sup>+</sup>, 74 (H<sub>2</sub>C=C(OH)OCH<sub>3</sub>)<sup>+</sup>, 87 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sup>+</sup> e 143 (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sup>+</sup>: Ácido lignocérico.

**AG7.** T<sub>R</sub> 39,54 min: M<sup>+</sup> 410 (fórmula molecular C<sub>27</sub>H<sub>54</sub>O<sub>2</sub>), 395 (M-15), 381 (M-29), 367 (M-43), 353 (M-57), 339 (M-71), 325 (M-85) e 311 (M-99). Os picos principais foram em *m/z* 41 (C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>)<sup>+</sup>, 43 (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sup>+</sup>, 55 ((H<sub>2</sub>CCH=C=O)<sup>+</sup>, 57 (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sup>+</sup>, 74 (H<sub>2</sub>C=C(OH)OCH<sub>3</sub>)<sup>+</sup>, 87 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sup>+</sup> e 143 (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sup>+</sup>: Ácido cerílico.

**AG9.** T<sub>R</sub> 42,00 min: M<sup>+</sup> 438 (fórmula molecular C<sub>29</sub>H<sub>58</sub>O<sub>2</sub>), 409 (M-29), 395 (M-43), 381 (M-57), 367 (M-71), 353 (M-85) e 339 (M-99). Os picos principais em *m/z* 41 (C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>)<sup>+</sup>, 43 (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sup>+</sup>, 57 (C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>)<sup>+</sup>, 55 (H<sub>2</sub>CCH=C=O)<sup>+</sup>, 74 (H<sub>2</sub>C=C(OH)OCH<sub>3</sub>)<sup>+</sup>, 87 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sup>+</sup> e 143 (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sup>+</sup>: Ácido montânico.

Por sua vez, os cinco ácidos monoinsaturados (**AG2**, **AG4**, **AG6**, **AG8** e **AG10**) exibiram o mesmo padrão de fragmentação, mostrando os principais os picos em *m/z* 41, 43, 55, 69, 74, 83, 97, 98 e 111. Vale destacar em todos estes casos, o pico devido ao fragmento em M-32 (M-CH<sub>3</sub>OH), assim como, o pico base em *m/z* 55.

**AG2.** T<sub>R</sub> 26,63 min: M<sup>+</sup> 296 (fórmula molecular C<sub>19</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>), *m/z*: 265 (M-31), 264 (M-32), 222 (M-74), 111 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sup>+</sup>, 98 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sup>+</sup>, 97 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sup>+</sup>, 87 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sup>+</sup>, 83 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>)<sup>+</sup>,

74 ( $[\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{OH})\text{OCH}_3]^+$ ), 69 ( $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)^+$ ), 55 ( $[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)^+$  e/ou  $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CO})^+$ ], 43 ( $(\text{C}_3\text{H}_7)^+$ ) e 41 ( $(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)^+$ ); Ácido oleico.

**AG4.**  $T_R$  36,64 min:  $M^+$  380 (fórmula molecular  $\text{C}_{25}\text{H}_{48}\text{O}_2$ ),  $m/z$ : 349 (M-31), 348 (M-32), 306 (M-74), 111 ( $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)^+$ ), 97 ( $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)^+$ ), 83 ( $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)^+$ ), 74 ( $[\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{OH})\text{OCH}_3]^+$ ), 69 ( $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)^+$ ), 57 ( $(\text{C}_4\text{H}_9)^+$ ), 55 ( $[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)^+$  e/ou  $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CO})^+$ ], 43 ( $(\text{C}_3\text{H}_7)^+$ ), 41 ( $(\text{C}_3\text{H}_5)^+$ ); Ácido nervônico.

**AG6.**  $T_R$  39,54 min:  $M^+$  408 (fórmula molecular  $\text{C}_{27}\text{H}_{52}\text{O}_2$ ),  $m/z$ : 377 (M-31), 376 (M-32), 334 (M-74), 111 ( $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)^+$ ), 97 ( $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)^+$ ), 83 ( $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)^+$ ), 74 ( $[\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{OH})\text{OCH}_3]^+$ ), 69 ( $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)^+$ ), 57 ( $(\text{C}_4\text{H}_9)^+$ ), 55 ( $[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)^+$  e/ou  $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CO})^+$ ], 43 ( $(\text{C}_3\text{H}_7)^+$ ), 41 ( $(\text{C}_3\text{H}_5)^+$ ); Ácido ximenico.

**AG8.**  $T_R$  41,81 min:  $M^+$  436 (fórmula molecular  $\text{C}_{29}\text{H}_{56}\text{O}_2$ ),  $m/z$ : 405 (M-31), 404 (M-32), 362 (M-74), 111 ( $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)^+$ ), 97 ( $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)^+$ ), 83 ( $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)^+$ ), 74 ( $[\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{OH})\text{OCH}_3]^+$ ), 69 ( $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)^+$ ), 57 ( $(\text{C}_4\text{H}_9)^+$ ), 55 ( $[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)^+$  e/ou  $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CO})^+$ ], 43 ( $(\text{C}_3\text{H}_7)^+$ ), 41 ( $(\text{C}_3\text{H}_5)^+$ ); Ácido ximenixico (*cis*-19-octacosenoico).

**AG10.**  $T_R$  44,13 min:  $M^+$  464 (fórmula molecular  $\text{C}_{31}\text{H}_{60}\text{O}_2$ ),  $m/z$ : 433 (M-31), 432 (M-32), 390 (M-74), 111 ( $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)^+$ ), 97 ( $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)^+$ ), 83 ( $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)^+$ ), 74 ( $[\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{OH})\text{OCH}_3]^+$ ), 69 ( $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)^+$ ), 57 ( $(\text{C}_4\text{H}_9)^+$ ), 55 ( $[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)^+$  e/ou  $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CO})^+$ ], 43 ( $(\text{C}_3\text{H}_7)^+$ ), 41 ( $(\text{C}_3\text{H}_5)^+$ ); Ácido lumequeico.

No caso do componente com tempo de retenção 28,853 min (**AG3**) foi observado um padrão de fragmentação distinto dos demais. Com exceção dos picos em  $m/z$  41 e 43, fragmentos comuns a todos e do pico em  $m/z$  55, observados nos espectros dos ácidos insaturados **AG2**, **AG4**, **AG6**, **AG8** e **AG10**, o espectro de massa de **AG3** mostrou os picos principais em  $m/z$  67, 79, 80, 93 e 150, com o pico base em  $m/z$  79. Os destaques foram os picos devidos a fragmentos em  $m/z$  261 (M-31 perda de  $\text{OCH}_3$ ), 219 (M-73, perda de  $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), além de dois outros,  $m/z$  164  $[\text{H}-(\text{CH}=\text{CH})_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3]^+$  e  $m/z$  150

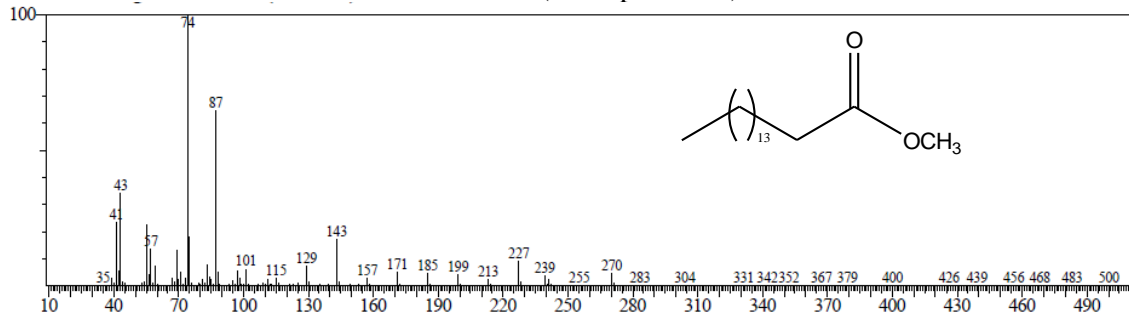
$[\text{H}_2\text{C}=\text{C}=\text{CHCH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3]^+$ , ambos indicativos de uma estrutura  $\text{C}_{18}$ -enino com a ligação tripla entre os carbonos  $\text{C}_9$  e  $\text{C}_{10}$  (SPITZER *et al.*, 1991; KLEIMAN *et al.*, 1976). O pico base em  $m/z$  79 ( $\text{C}_6\text{H}_7^+$ ) indicou a presença de mais de uma ligação dupla ou tripla na cadeia do ácido graxo (MURPHY, 1993).

**AG3.** 28,853 min:  $\text{M}^+$  292 (fórmula molecular  $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_2$ ),  $m/z$ : 261 (M-31), 219 (M-73), 164, 150, 135 ( $[\text{H}_2\text{C}=\text{C}=\text{CHCH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5]^+$ ), 121 ( $[\text{H}_2\text{C}=\text{C}=\text{CHCH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4]^+$ ), 107 ( $[\text{H}_2\text{C}=\text{C}=\text{CHCH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3]^+$ ), 93 ( $[\text{H}_2\text{C}=\text{C}=\text{CHCH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2]^+$ ), 79 ( $[\text{H}_2\text{C}=\text{C}=\text{CHCH}=\text{CHCH}_2]^+$ ), 67 ( $[\text{HCC}(\text{CH}_2)_3]^+$ ), 55 ( $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}/\text{C}_4\text{H}_7^+$ ), 43 ( $\text{C}_3\text{H}_7^+$ ) e 41 ( $\text{C}_3\text{H}_5^+$ ); Ácido ximeminico.

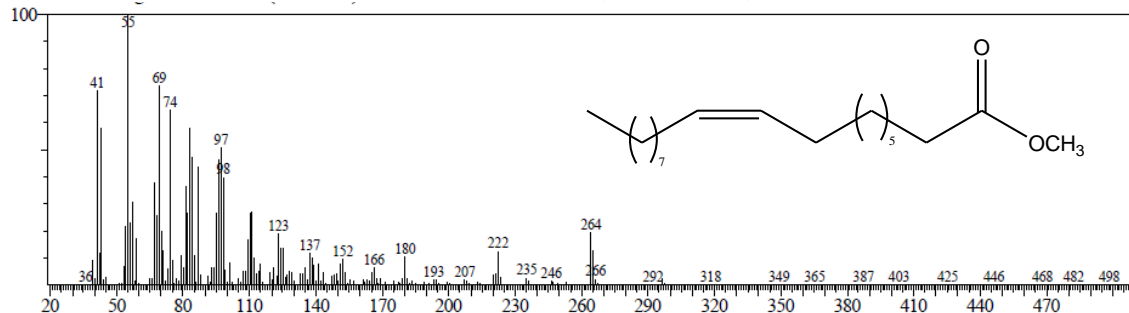
As estruturas e os espectros de massas dos ácidos graxos identificados nos grãos de *X. americana* são mostradas na Figura 14. As frações AGME 29-30 e AGME 32-39, por análise em CG/EM, conduziram, praticamente, aos mesmos constituintes da fração AGME 24-28.

Figura 14 – Ácidos graxos (**AG1–AG10**) identificados como ésteres metílicos

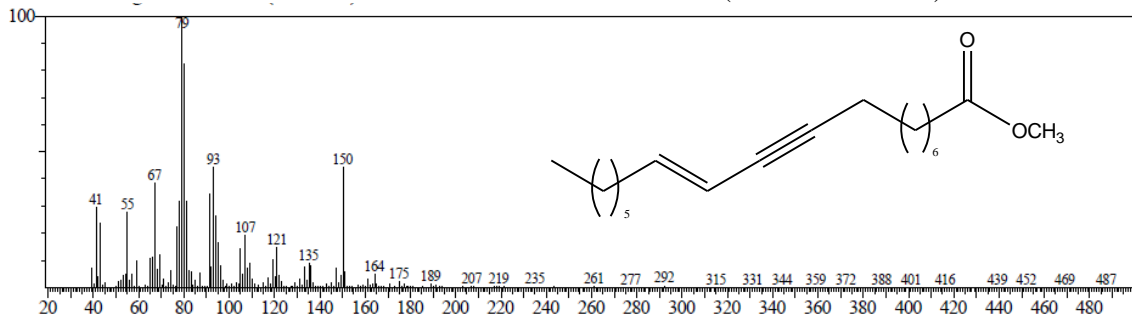
**AG1:** Éster metílico do ácido hexadecanoico (ácido palmítico)



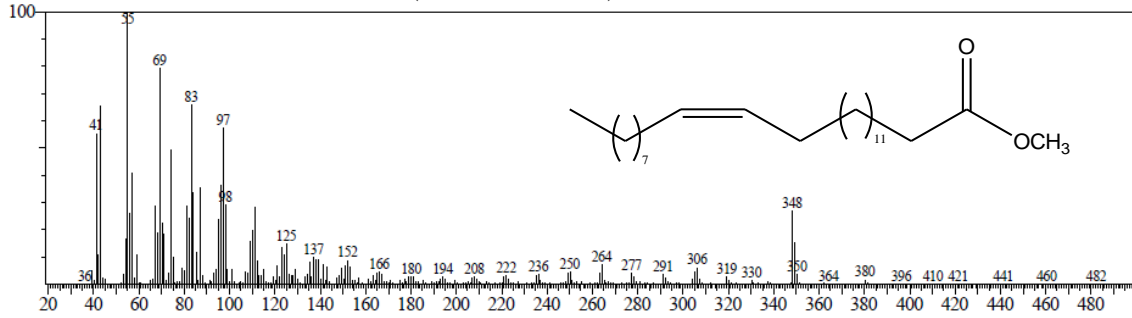
**AG2:** Éster metílico do ácido *Z*-octadec-9-enoico (ácido oleico)



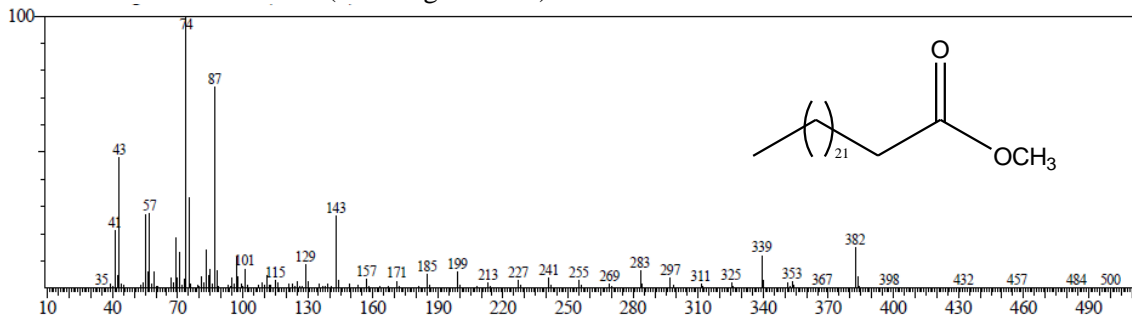
**AG3:** Éster metílico do ácido octadeca-9-in-11-*trans*-enoico (ácido ximeninico)



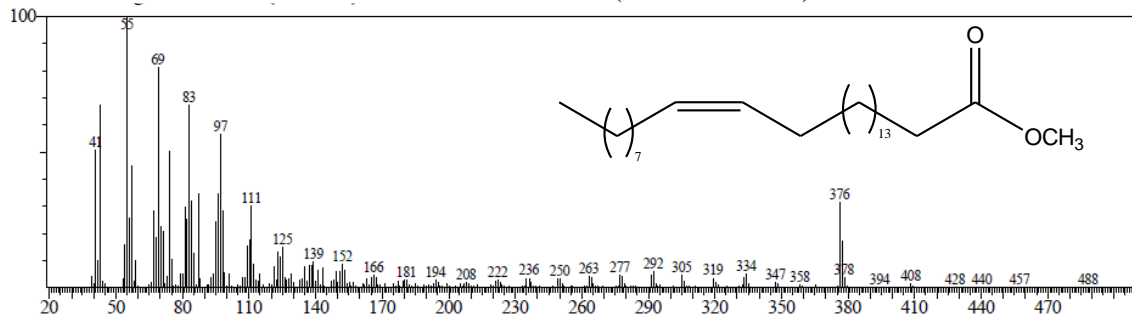
**AG4:** Ácido Z-tetracos-15-enoico (ácido nervônico)



**AG5:** Ácido tetracosanoico (ácido lignocérico)

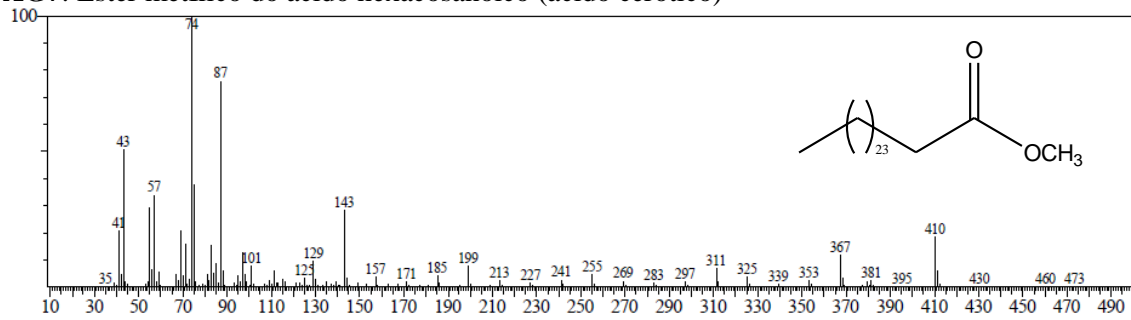


**AG6:** Éster metílico do ácido Z-hexacos-17-enoico (ácido ximenico)

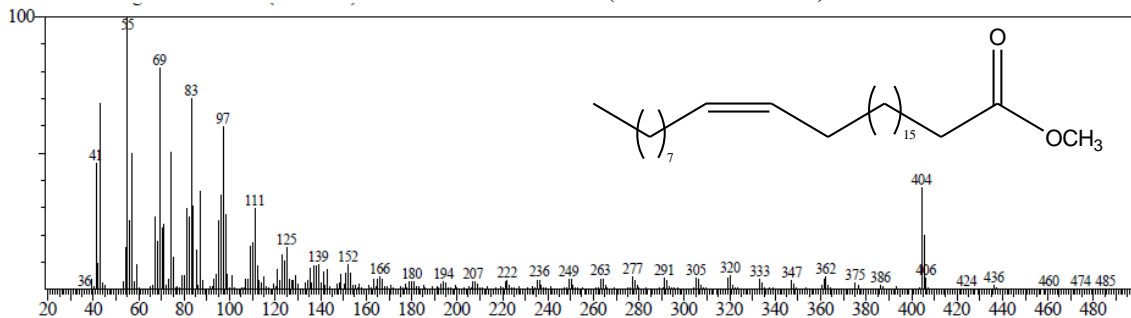




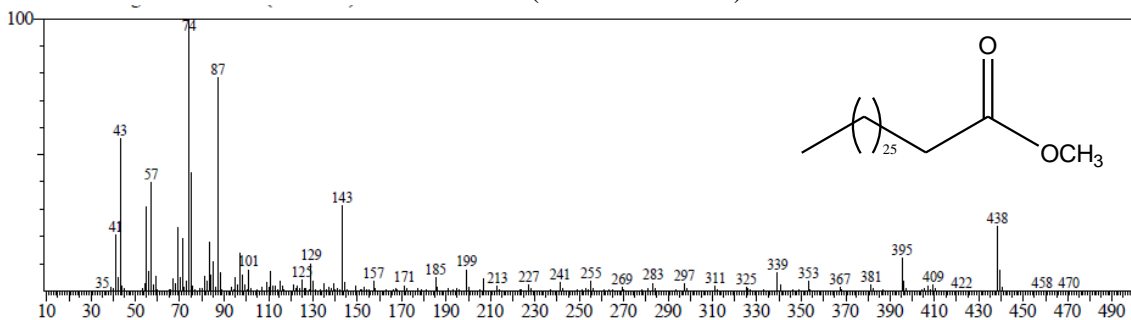
AG7: Éster metílico do ácido hexacosanoico (ácido cerótico)



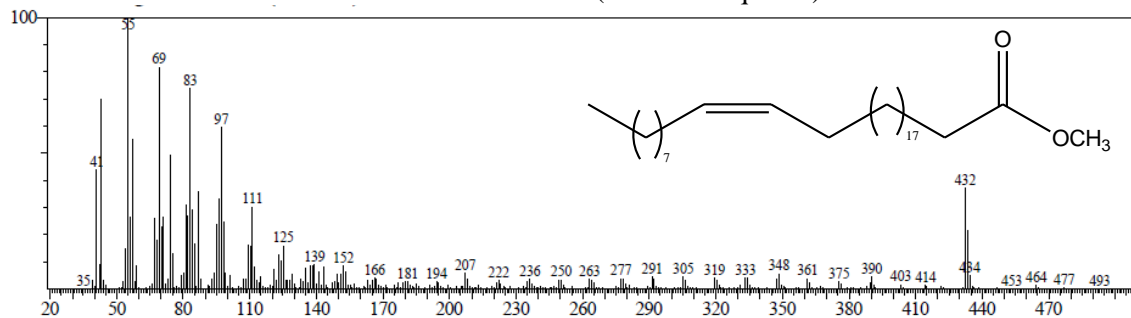
AG8: Éster metílico do ácido Z-octacos-19-enoico (ácido ximenixico)



AG9: Éster metílico do ácido octacosanoico (ácido montânico)



AG10: Éster metílico do ácido triacont-21-enoico (ácido lumequeico)



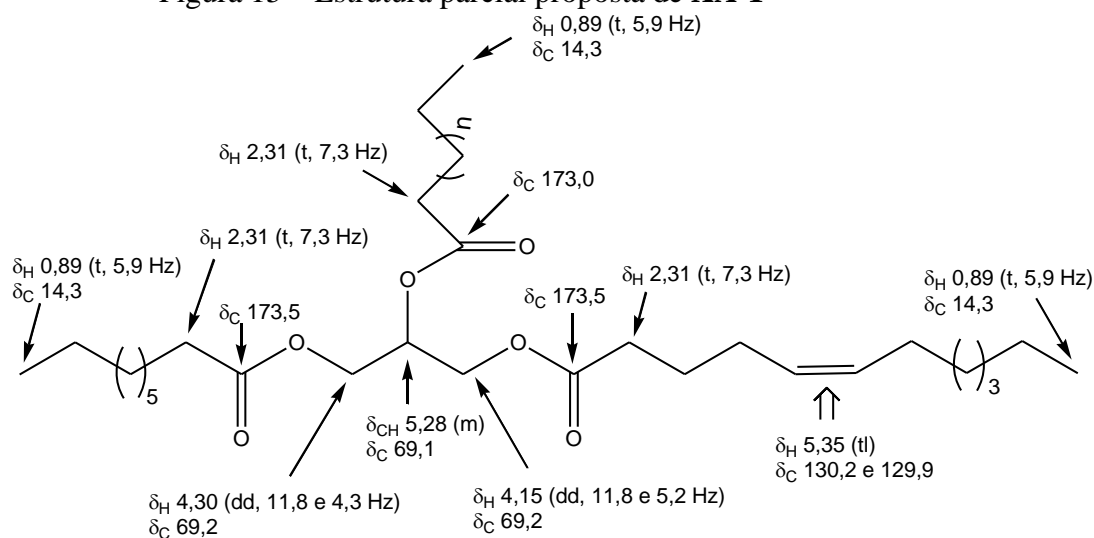
#### 4.1.5 Caracterização de XA-1

A amostra **XA-1** foi obtida como um material graxo a partir da fração hexânica do extrato hexânico das sementes de *X. americana*, segundo o Esquema 8 (p. 68).

O espectro na região do IV (Figura 26, p. 60) de **XA-1** exibiu bandas indicativas ésteres de ácidos graxos: deformação axial de ligação C–H alifáticas ( $2927$  e  $2852\text{ cm}^{-1}$ ) e deformação angular de grupos  $\text{CH}_2$  ( $1461$  e  $725\text{ cm}^{-1}$ ) e deformações axiais de ligações  $\text{C}=\text{O}$  ( $1741\text{ cm}^{-1}$ ) e  $\text{C}-\text{O}$  ( $1162\text{ cm}^{-1}$ ).

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 27, p. 61), de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 28, p. 61) e COSY (Figura 29, p. 62) de **XA-1** exibiram sinais que o caracterizaram como um triglicerídeo, conforme ilustrado na estrutura parcial proposta na Figura 15.

Figura 15 – Estrutura parcial proposta de **XA-1**



No espectro bidimensional de correlação homonuclear  $^1\text{H}-^1\text{H}$  foram observados picos transversais correspondentes aos acoplamentos que justificaram os assinalamentos dos átomos de hidrogênio e de carbono-13 indicados. Assim, foram registradas as seguintes correlações: hidrogênio H-2 com os hidrogênios 2H-1 e 2H-3; hidrogênios olefínicos  $\text{CH}=\text{CH}$  com os hidrogênios alílicos  $\text{CH}_2$ ; hidrogênios  $\text{CH}_2$  *alfa* aos grupos  $\text{C}=\text{O}$  com os hidrogênios  $\text{CH}_2$  *beta*; hidrogênios alílicos  $\text{CH}_2$  com outros hidrogênios  $\text{CH}_2$  vicinais; e, hidrogênios metílicos com respectivos hidrogênios  $\text{CH}_2$  vicinais. Além deste, outros triglicerídeos foram isolados, porém, todos em pequenas quantidades que não permitiram a realização de reações de hidrólise para posterior análise e consequente identificação dos ácidos graxos respectivos.

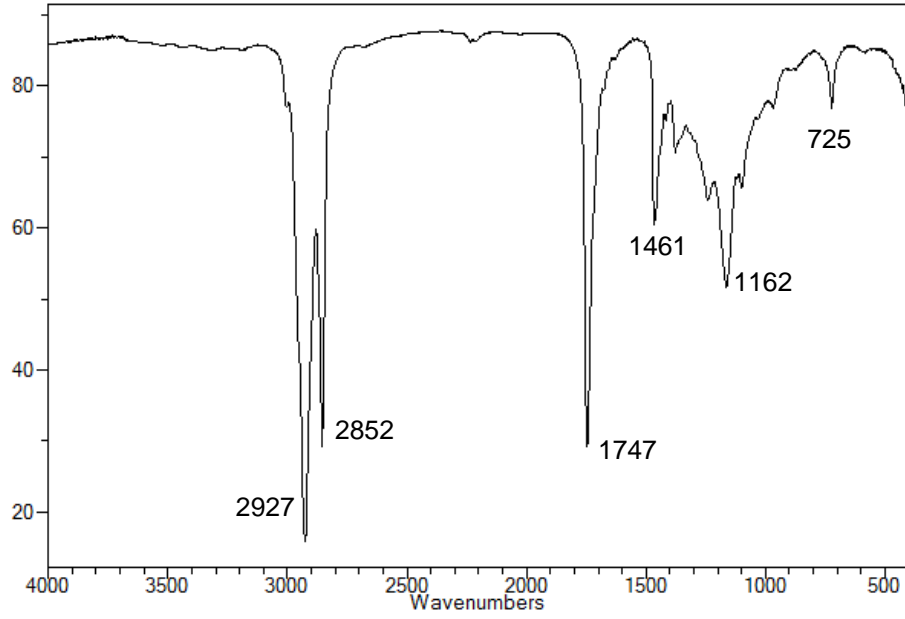
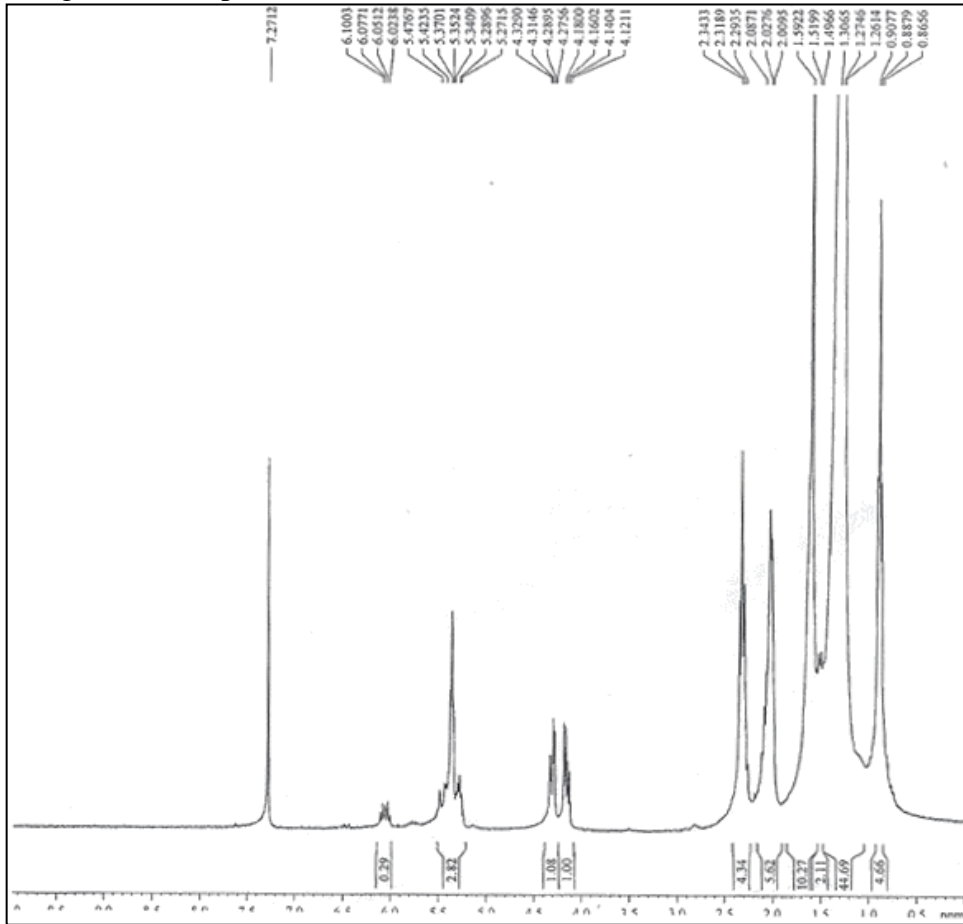
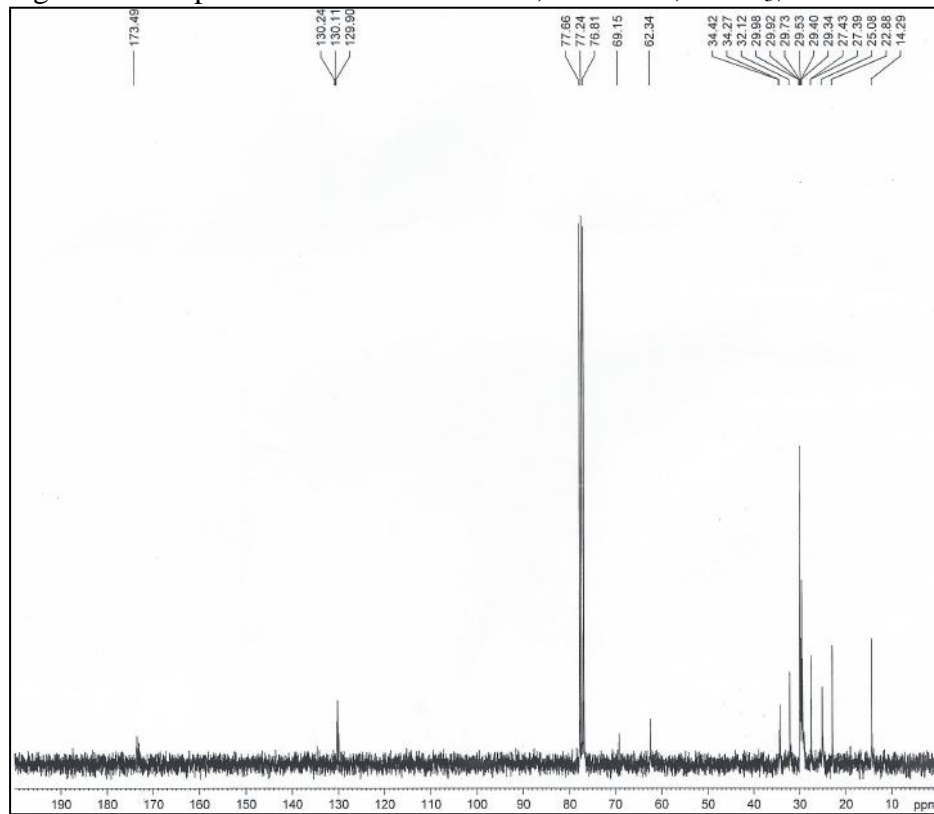
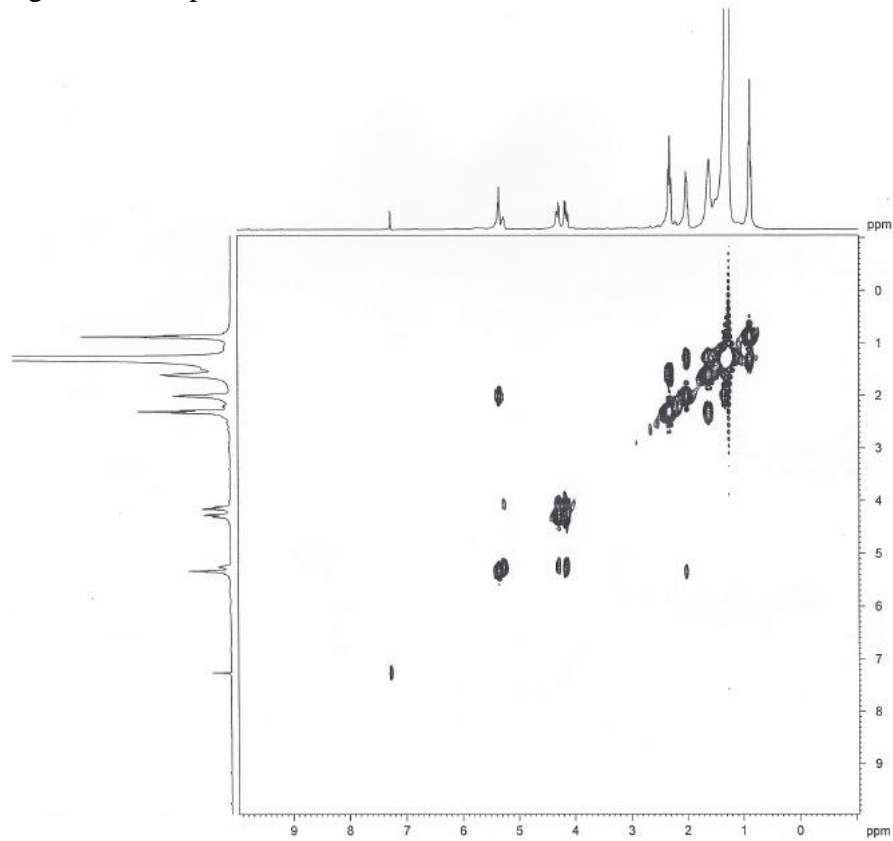
Figura 16 – Espectro de infravermelho de **XA-1**Figura 17 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **XA-1**

Figura 18 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -BB, 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **XA-1**Figura 19 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}\times^1\text{H}$  – COSY, 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **XA-1**

#### 4.1.6 Caracterização de **XA-2**

Durante a concentração da solução etanólica para obtenção do respectivo extrato, ocorreu a formação de um precipitado amarelado que, após recristalização em metanol originou um sólido branco (**XA-2**) (Esquema 8, p. 68). O espectro de absorção na região do IV (Figura 20, p. 61) exibiu como destaque as bandas de estiramento axial do grupo OH em  $3230\text{ cm}^{-1}$ , estiramento C-H em  $2918/2919\text{ cm}^{-1}$  (característico de grupos  $\text{CH}_3/\text{CH}_2$ ), estiramento da carbonila em  $1683\text{ cm}^{-1}$  (C=O) e estiramento C-O em  $1029\text{ cm}^{-1}$ .

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 21 e 22, p. 62; 23, p. 63) e, principalmente, o de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 24, p. 63; 25 e 26, p. 64) que exibiu excessivo número de sinais na faixa correspondente a carbonos saturados (14,0 a 60,0 ppm), foram indicativos de uma mistura de compostos semelhantes da classe dos triterpenos. Assim, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 21, p. 62) revelou a presença de vários grupos metila (0,83 a 1,80 ppm), um deles como um singlete largo em  $\delta_{\text{H}} 1,80$  (sl, 3H) ligado a carbono  $\text{sp}^2$  e dois singletos largos em  $\delta_{\text{H}} 4,96$  (sl, 1H) e  $4,78$  (sl, 1H) mutualmente acoplados, correlacionados a hidrogênios vinílicos em uma ligação dupla terminal. Estes dois hidrogênios, juntamente com o grupo metila em  $\delta_{\text{H}} 1,80$  formaram o grupo isopropenila, característica de triterpenos do tipo lupano (MAHATO; KUNDU, 1994; COSTA *et al.*, 2010). O espectro mostrou também sinais como tripleto largo em  $\delta_{\text{H}} 5,72$  (1H) e singlete largo em  $\delta_{\text{H}} 5,51$  (1H) devidos a outros tipos de hidrogênios olefínicos consistentes com a presença de triterpenos dos tipos oleanano/ursano (HENRIQUE *et al.*, 2014).

Por sua vez, o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 24, p. 63) em acordo o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  registrou sinais para triterpeno lupano [ $\delta_{\text{C}} 151,7$  (C-20) e  $110,3$  (C-29)], bem como, sinais compatíveis com triterpeno oleanano [ $\delta_{\text{C}} 122,9$  (C-12),  $56,1$  (C-5),  $42,4$  (C-18),  $46,8$  (C-19),  $33,5$  (C-21) e  $32,2$  (C-22)] (MAHATO; KUNDU, 1994; CURSINO *et al.*, 2009); o espectro mostrou também sinais em  $\delta_{\text{C}} 78,4$  (carbono  $\text{sp}^3$  oxigenado, C-3) e  $19,1$ , correlacionado ao carbono metílico C-30 em triterpeno lupano (MAHATO; KUNDU, 1994). Em adição, os sinais em  $\delta_{\text{C}} 180,5$  e  $179,2$  característicos de ácidos carboxílicos com intensidades relativas 1:2, respectivamente. O experimento DEPT  $135^\circ$  (Figuras 27 e 28, p. 65) confirmou os carbonos hidrogenados, especialmente, carbonos CH oxigenados ( $\delta_{\text{C}} 78,4$ ),  $\text{CH}_2\text{ sp}^2$  ( $\delta_{\text{C}} 110,3$ ), CH  $\text{sp}^2$  ( $\delta_{\text{C}} 122,9$ ), CH  $\text{sp}^3$  ( $\delta_{\text{C}} 56,1$  e  $42,4$ ) e  $\text{CH}_2\text{ sp}^3$  ( $\delta_{\text{C}} 46,8$ ,  $33,5$  e  $32,2$ ). Assim, com base na comparação com dados espectrais da literatura, foi concluído que **XA-2** era uma mistura constituída pelos triterpenos ácido betulínico (**XA-2a**, 56%) (Figura 24, p. 59), ácido oleanólico (**XA-2b**, 35%) (Figura 29, p. 66) e um terceiro triterpeno em

menor proporção (**XA-2c**, 9%) derivado do ácido oleanólico (Tabela 7, p. 66). As percentagens acima foram determinadas a partir das integrações dos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  3,57, 3,48 e 3,33 registrados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e atribuídos a hidrogênios carbinólicos (H-3).

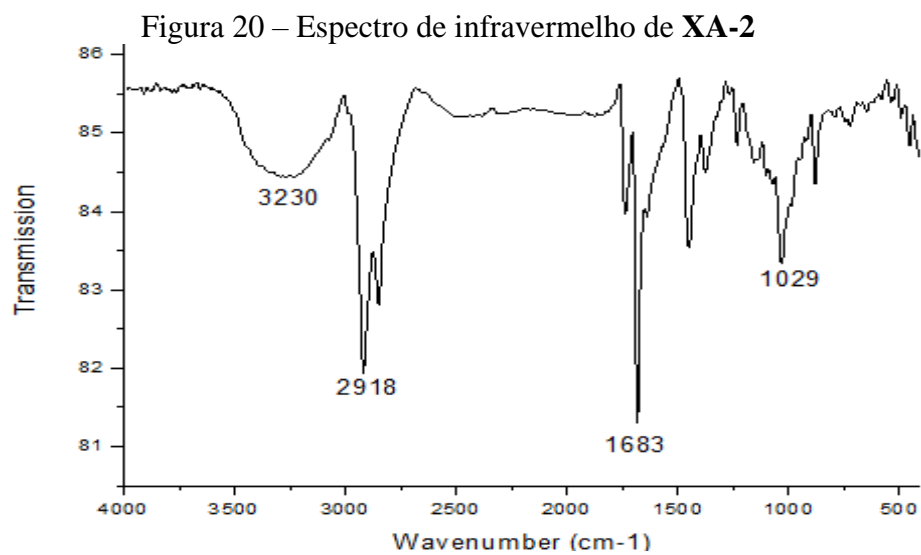


Figura 21 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , 500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , de **XA-2**

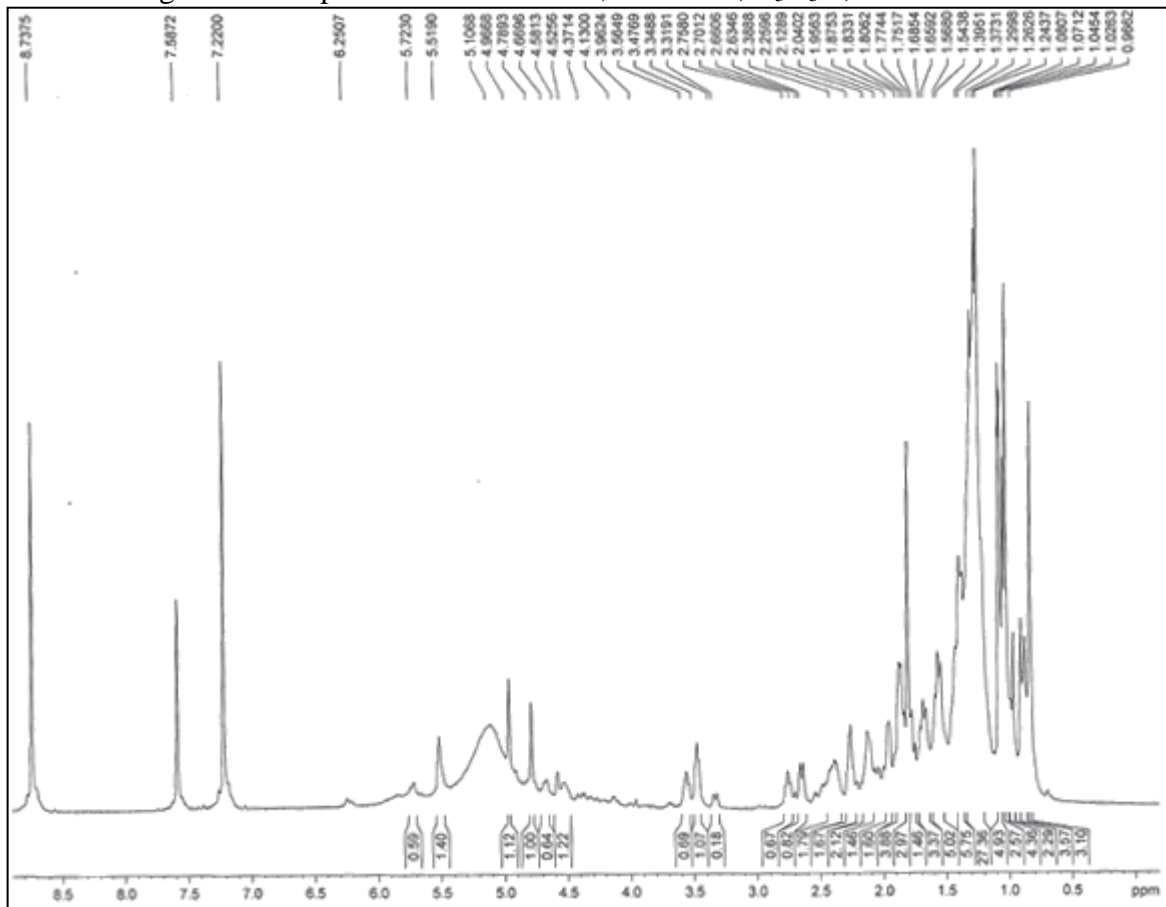


Figura 22 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , 500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , de **XA-2**

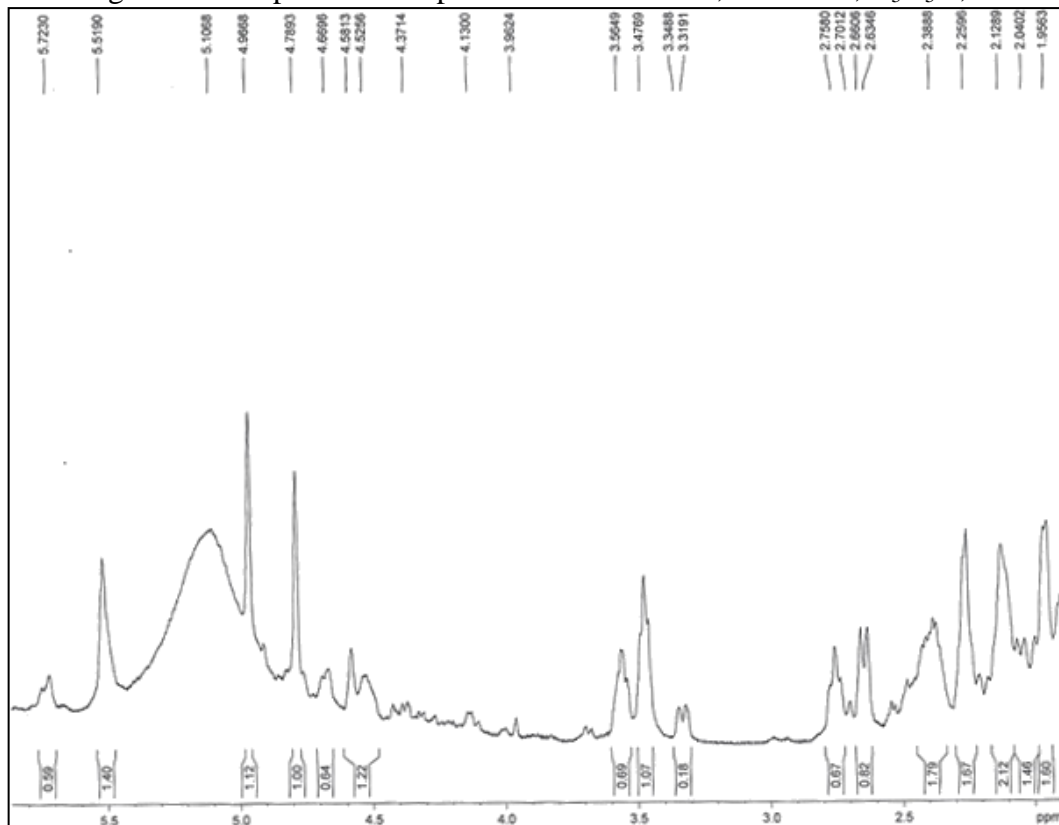


Figura 23 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , 500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , de **XA-2**

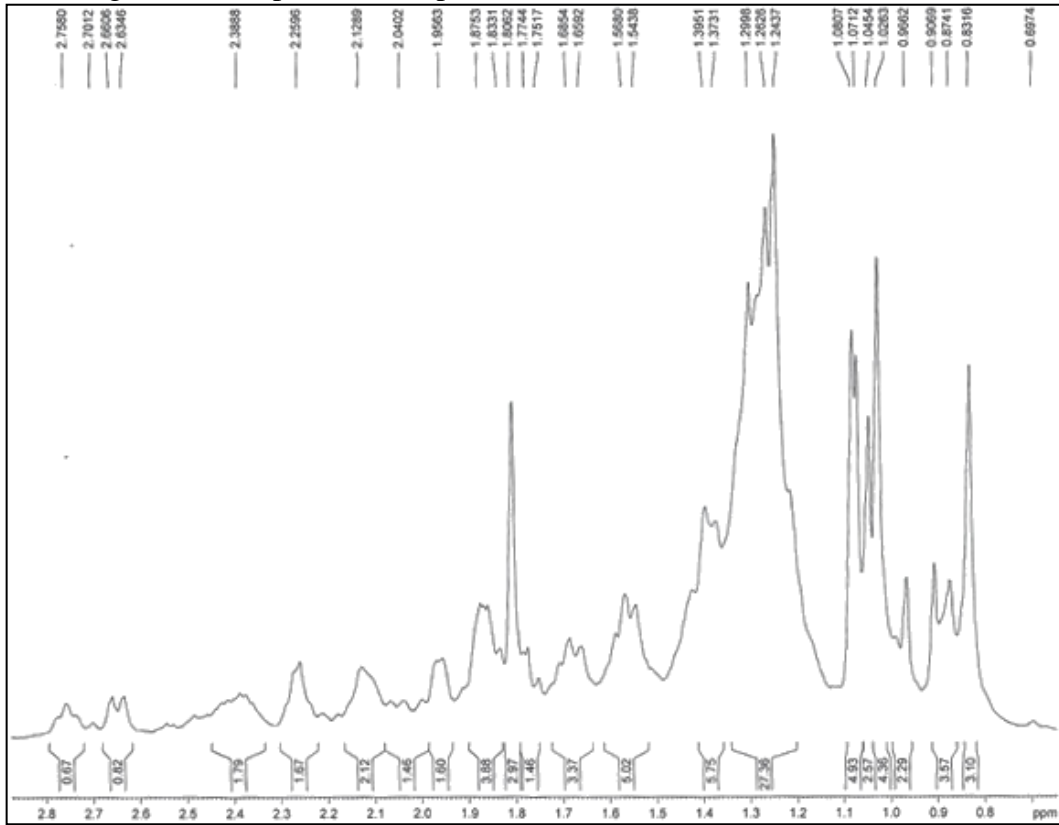


Figura 24 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -BB, 125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , de **XA-2**

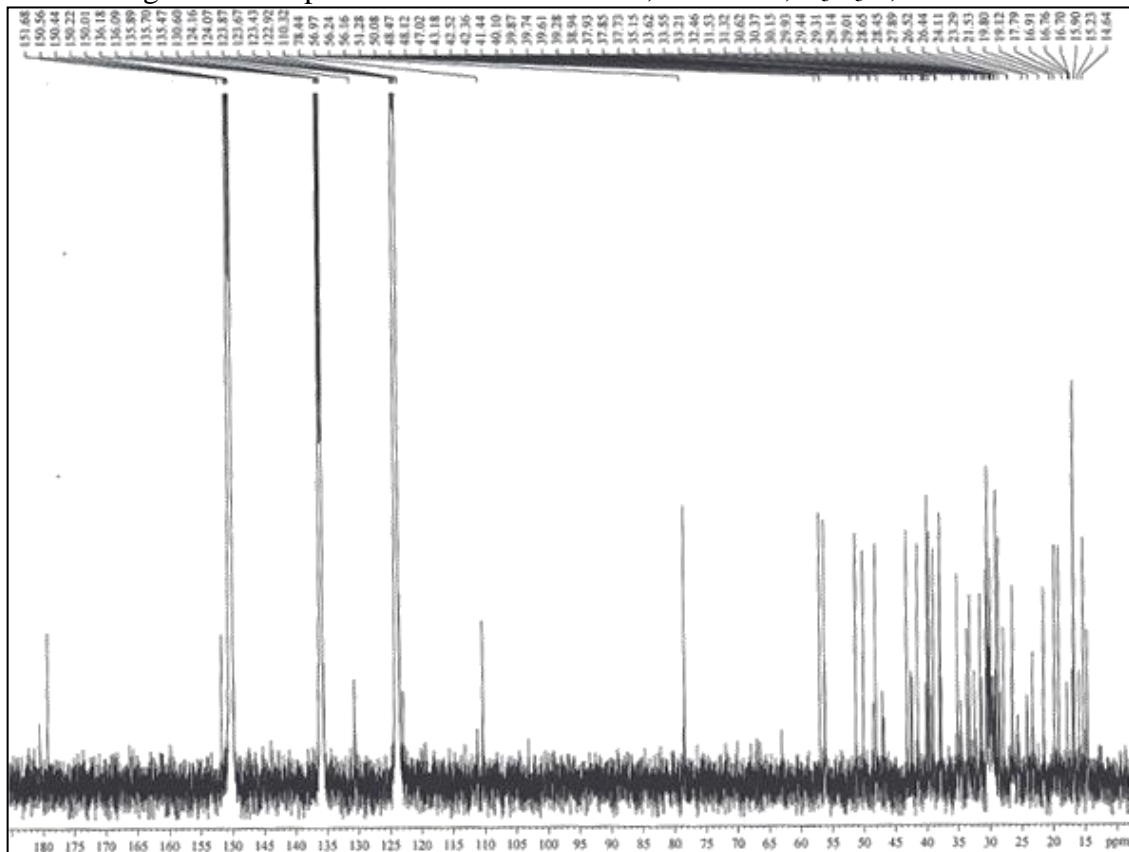




Figura 25 – Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -BB, 125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , de **XA-2**

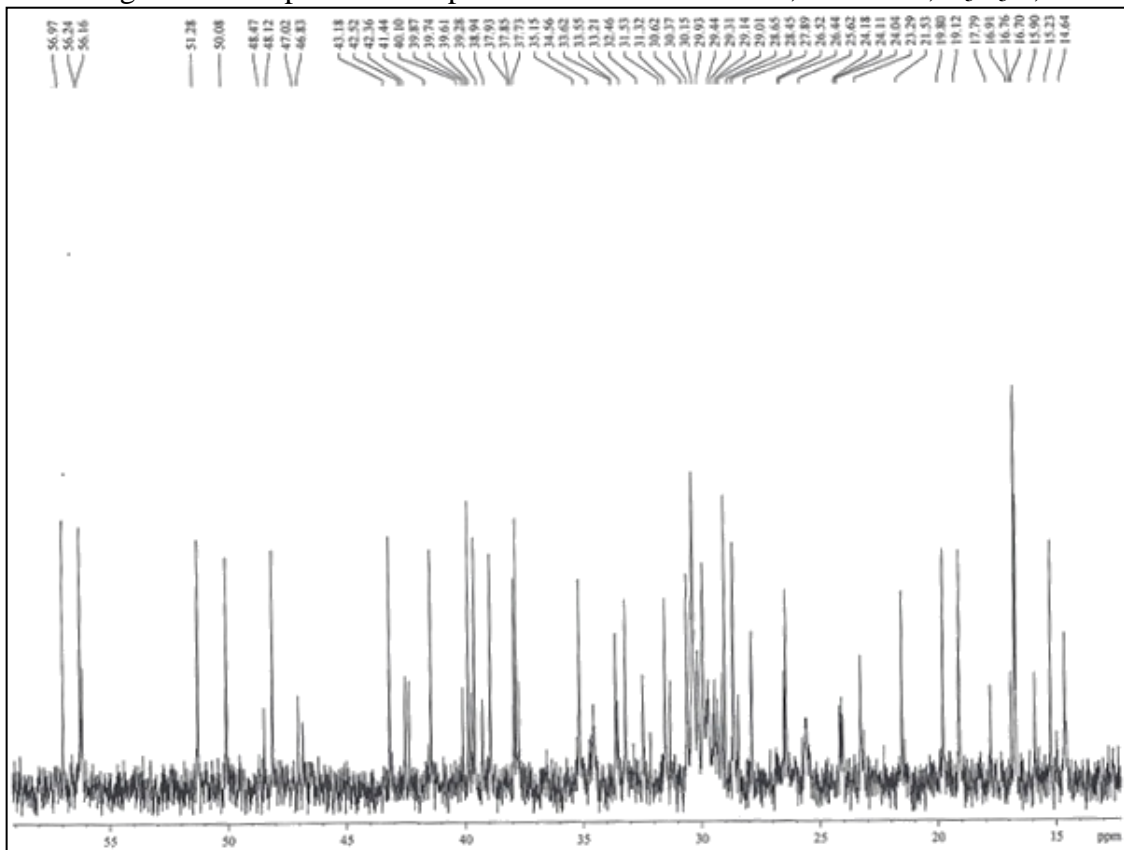


Figura 26 – Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -BB, 125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , de **XA-2**

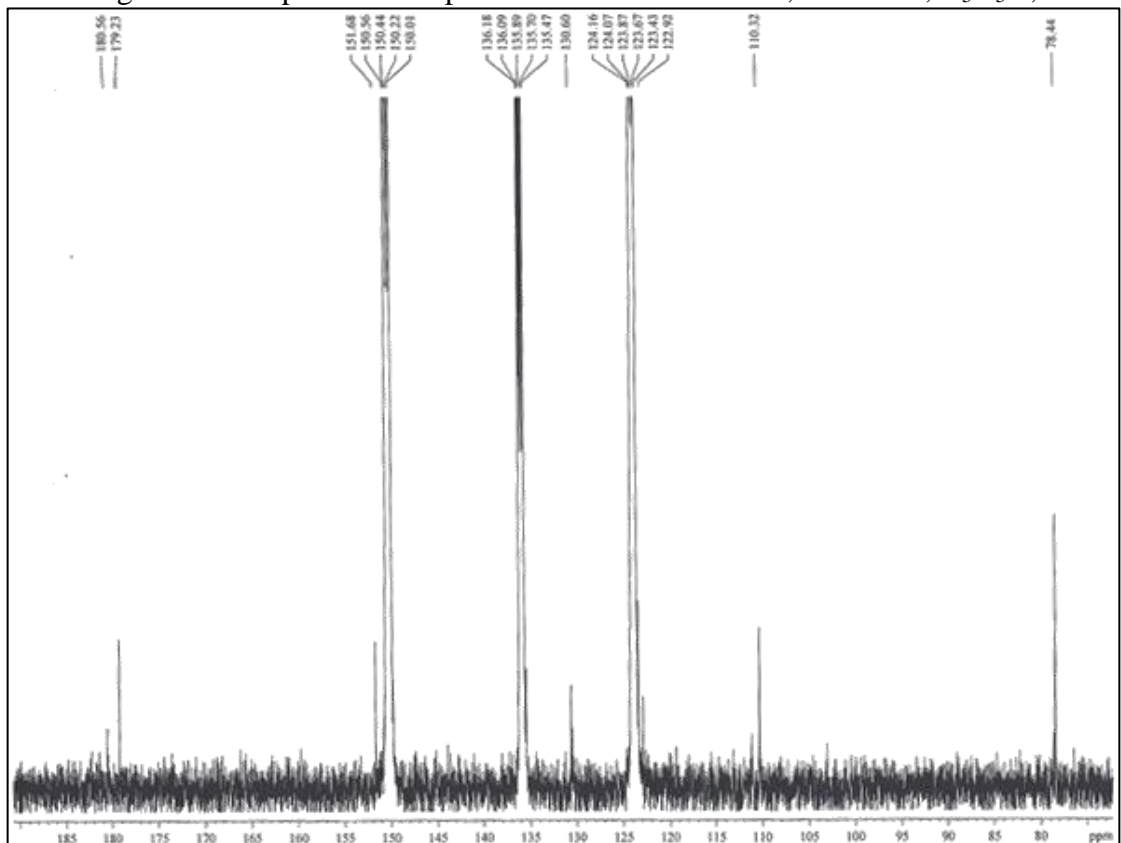


Figura 27 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135°, 125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , de **XA-2**

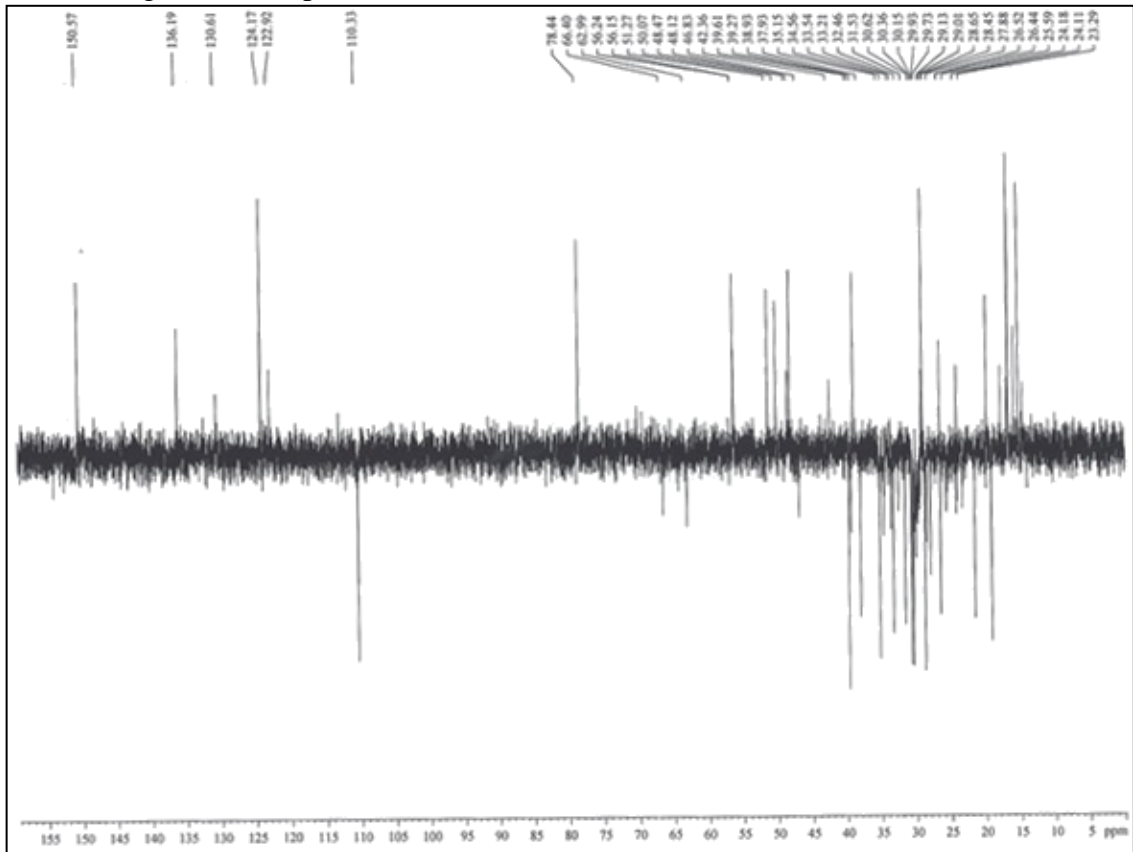


Figura 28 – Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135°, 125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , de **XA-2**

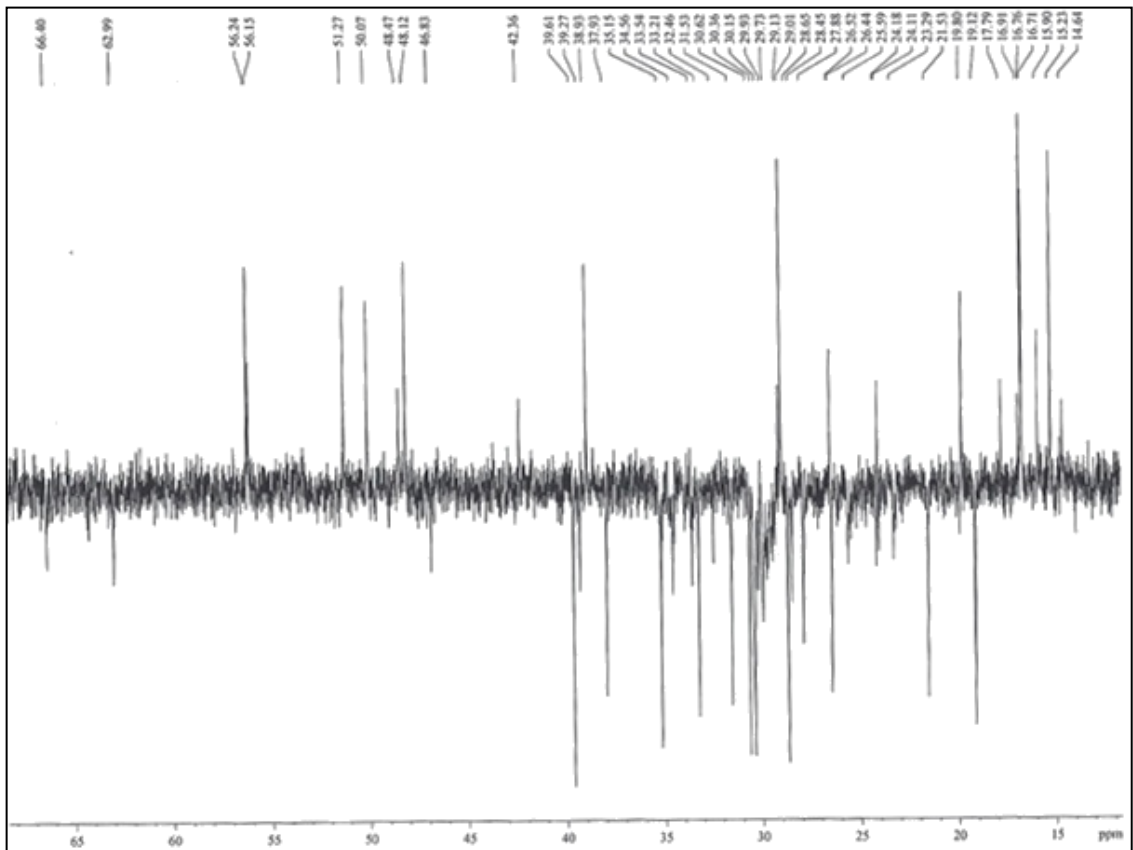
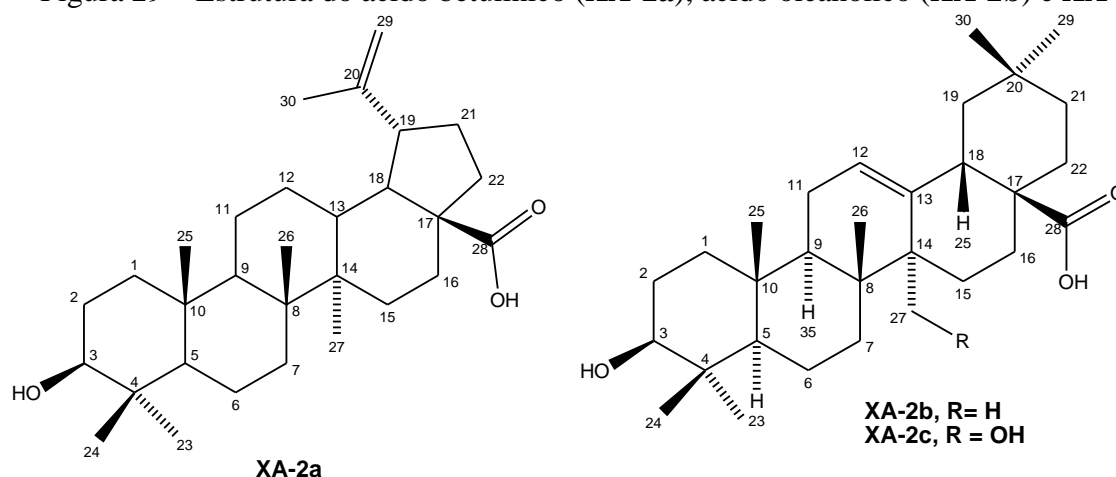


Figura 29 – Estrutura do ácido betulínico (XA-2a), ácido oleanólico (XA-2b) e XA-2c

Tabela 7 – Dados espectrais de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos triterpenos XA-2a, XA-2b, XA-2c

	Triterpeno 1	Triterpeno 2	Triterpeno 3		Triterpeno 1	Triterpeno 2	Triterpeno 3
C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	38,7	38,5	38,1	16	32,1	23,4	22,4
2	27,4	27,4	27,1	17	56,3	46,6	46,0
3	78,9	78,4	78,8	18	46,8	42,4	40,4
4	38,8	38,7	38,7	19	49,2	46,8	44,9
5	56,3	56,1	54,8	20	151,7	30,6	30,7
6	18,3	18,3	18,2	21	29,7	33,5	33,4
7	34,3	32,6	32,4	22	37,0	32,2	32,3
8	40,7	39,3	39,7	23	27,9	28,1	28,0
9	50,5	47,6	48,3	24	15,3	15,6	15,7
10	37,2	37,0	37,1	25	16,0	15,3	15,5
11	20,8	23,1	24,1	26	16,1	16,8	18,5
12	25,5	122,9	129,7	27	14,7	26,0	63,0
13	38,4	143,4	137,7	28	180,5	181,0	183,0
14	42,4	41,6	47,5	29	110,3	33,1	33,0
15	30,5	27,7	24,5	30	19,1	23,6	23,0

Fonte: elaborada pelo autor.

#### 4.1.7 Atividade antioxidante

Os resultados do potencial antioxidante determinados pelo método de redução do radical livre DPPH $^{\bullet}$ , para os extratos dos grãos de *X. americana* estão representados na Tabela 8 (p. 67). Foi observado que o extrato hexânico apresentou percentual de redução do radical livre maior que o extrato etanólico em todas as concentrações utilizadas na análise. Quando a porcentagem de atividade antioxidante dos extratos foi comparada com a da rutina, observou-se que os extratos apresentaram baixo potencial antioxidante. Isto pode ser justificado pelos constituintes químicos de natureza lipídica identificados nos extratos, isto é, com características não antioxidante.

Tabela 8 – Percentual de atividade antioxidante (%AA) dos extratos das sementes de *X. americana* frente ao DPPH

Amostras	%AA ± DP					
	25 µg mL <sup>-1</sup>	50 µg mL <sup>-1</sup>	100 µg mL <sup>-1</sup>	150 µg mL <sup>-1</sup>	200 µg mL <sup>-1</sup>	250 µg mL <sup>-1</sup>
EHXA	13,25 ± 0,17	15,24 ± 0,31	15,81 ± 0,15	16,54 ± 0,09	17,05 ± 0,03	18,24 ± 0,06
EEXA	7,36 ± 0,12	9,11 ± 0,06	11,55 ± 0,15	12,21 ± 0,14	13,71 ± 0,09	15,36 ± 0,06
Rutina	42,17 ± 0,36	61,26 ± 0,15	93,06 ± 0,05	93,51 ± 0,12	94,24 ± 0,02	94,48 ± 0,01

DP: desvio padrão; Fonte: elaborada pelo autor.

#### 4.1.8 Inibição da enzima acetilcolinesterase

Este ensaio é baseado em procedimento descrito por Ellman, Courtney e Andress (1961), adaptado para CCD por Rhee *et al.* (2001). É considerado um método colorimétrico e que pode ser utilizado de forma qualitativa e quantitativa, mas nesse trabalho foi utilizada somente a forma qualitativa. É um método rápido e sensível para a seleção de amostras com ação anticolinesterásica (TREVISAN *et al.*, 2003).

Após a borrifação da solução da enzima AChE sobre a placa contendo as amostras dos extratos e os controles positivo e negativo, ocorreu o surgimento de uma coloração amarela nos dois extratos após 10 minutos. Porém, foi observado um halo branco somente em torno do “spot” do extrato etanólico (a coloração branca desaparece em 20-30 minutos), indicando a inibição da enzima para este extrato. Como controle positivo foi utilizada solução do padrão sal de Eserina (2 mg mL<sup>-1</sup>) e como controle negativo, foram utilizados solventes.

O EHXA não apresentou potencial de inibição da enzima AChE, mas o EEXA apresentou moderada atividade de inibição da enzima AChE.

Os testes foram realizados no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, de acordo com a metodologia desenvolvida por Rhee *et al.* (2001).

## 5 PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1 Material vegetal

Os grãos de *X. americana* Linn foram coletadas na localidade de Garapa (latitude 5,056797° sul e longitude 42,811083° oeste), município de Acarape, Estado do Ceará, no mês de janeiro de 2014. A planta foi identificada no Departamento de Biologia da Universidade

Federal do Ceará por Luiz Wilson Lima-Verde, onde foi depositada uma exsicata no Herbário Prisco Bezerra com a identificação N° 040411.

## **5.2 Reagentes, solventes e equipamentos**

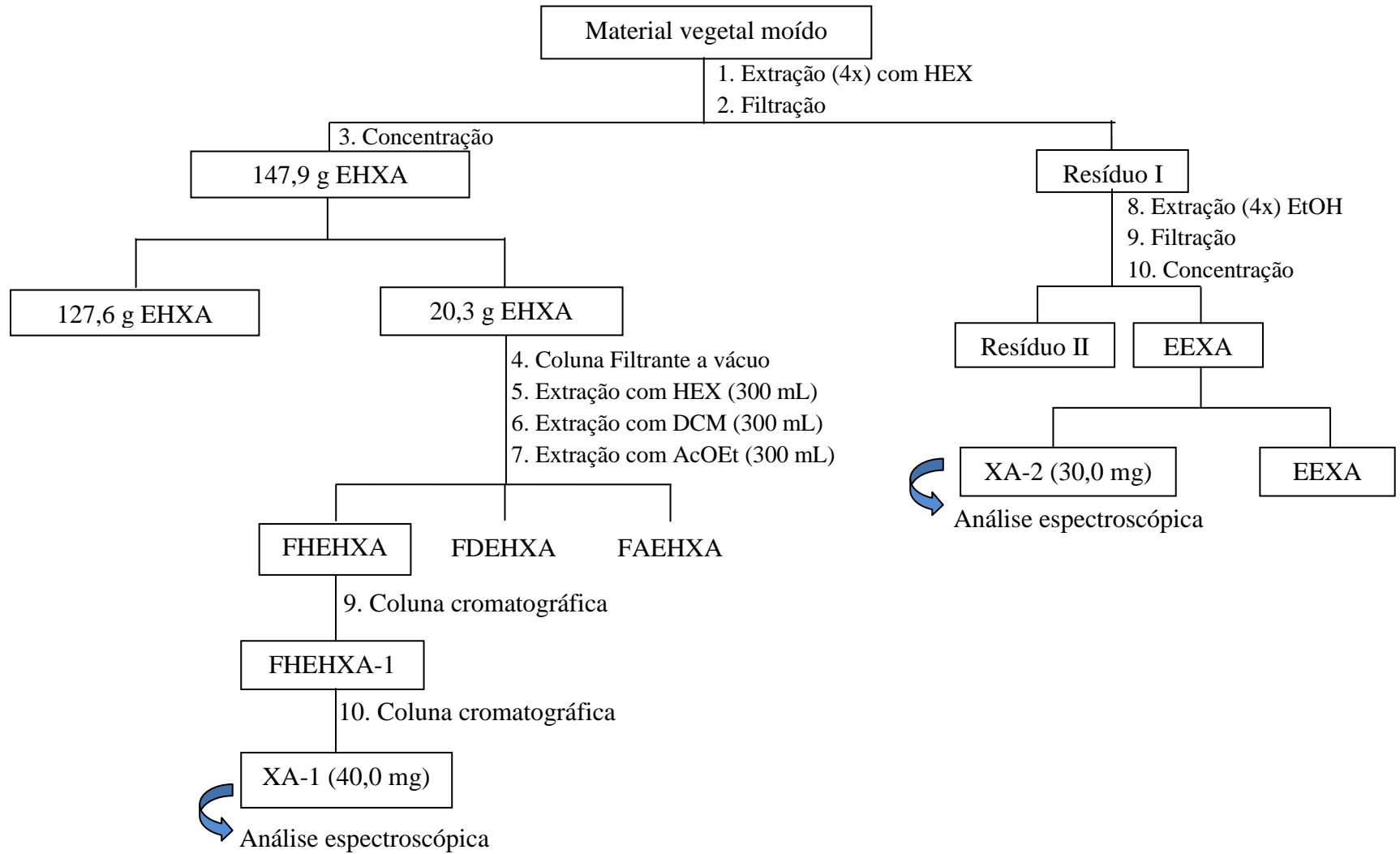
Na preparação dos extratos e frações foram utilizados solventes e reagentes de grau analítico (PA) comerciais (Synth, Vetec e Merck). A evaporação dos solventes à pressão reduzida foi realizada em evaporador rotativo Laborota 4000 da Heidolph com auxílio de bombas de vácuo BUCHI, modelo Vacuum Pump V-700; os extratos foram dissolvidos utilizando ultrassom Modelo Cleaner Thornton T1425 da Marconi. As pesagens foram realizadas em balança Kern 410 e Digimed KN5000L da Marconi; o extrato etanólico na forma de material semi sólido foi liofilizado em Micro Modulyo Edwards acoplado a uma bomba de alto vácuo ValPump VLP80 Savant;

## **5.3 Obtenção e fracionamento dos extratos**

O material vegetal (424,00 g) foi seco à temperatura ambiente e triturado em moinho de facas, seguido de maceração com hexano na proporção 1:3 m/v, por quatro vezes consecutivas, tendo cada extração, a duração de três dias. Os sobrenadantes foram filtrados, reunidos e concentrados em rota-evaporador resultando no extrato hexânico (EHXA, 147,94 g).

Parte desse extrato (20,30 g) foi submetida a uma coluna filtrante em gel de sílica sob vácuo, eluída com solventes em polaridades crescentes (hexano, diclorometano e acetato de etila). As soluções correspondentes foram concentradas sob pressão reduzida e pesadas, fornecendo as frações hexano (FHEHXA, 11,45 g), diclorometano (FDEHXA, 2,17 g) e acetato de etila (FAEHXA, 1,56 g).

A torta resultante da extração com hexano foi submetida à extração com etanol na proporção 1:3 (m/v) por três vezes consecutivas, cada extração com a duração de três dias. As soluções foram filtradas, reunidas e o EtOH removido sob pressão reduzida produzindo o extrato EtOH (EEXA, 11,15 g) na forma de um material pastoso escuro (Esquema 8, p. 69).

Esquema 8 – Obtenção dos extratos e frações da *X. americana* Linn

## 5.4 Cromatografia de adsorção

Para cromatografia em coluna (CC) gravitacional e sob média pressão (CC “flash”) foram utilizadas gel de sílica 60 Å com granulometria 70-230 mesh (Vetec). O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com as alíquotas das amostras. Na cromatografia de camada delgada (CCD) foi empregada cromatoplasca de gel de sílica 60, 2-25 µm, com indicador de fluorescência F<sub>254</sub> com suporte de papel alumínio (Merck). A revelação das substâncias nas cromatoplasca analíticas foi obtida por exposição à luz ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm), realizada em aparelho da marca Vilber Lourmat e por borrifação com solução de vanilina em ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) e etanol, seguido de aquecimento em soprador térmico por aproximadamente 1 minuto; os solventes utilizados como eluentes foram: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol puros ou combinados em proporções de crescentes polaridades.

## 5.5 Métodos físicos de análise orgânica

### 5.5.1 Espectrometria de absorção na região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em espectrômetro Perkin-Elmer, modelo Spectrum 100 FT-IR, na região de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>, usando o aparelho UATR (Universal Attenuated Total Reflectance) pertencente ao Laboratório de Espectrometria de Massas do Nordeste (LEMANOR) do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

### 5.5.2 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de <sup>1</sup>H) e ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN de <sup>13</sup>C) uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro Bruker modelos DPX-300 DRX-500, operando nas frequências de 300 e 500 MHz para hidrogênio e 75 e 125 MHz para carbono-13, respectivamente.

Na dissolução das amostras para obtenção dos espectros foram usados como solventes: clorofórmio (CDCl<sub>3</sub>) e piridina (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) deuterados. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados nos espectros de RMN de <sup>1</sup>H pelo pico do hidrogênio pertencente à fração não deuterada dos solventes: clorofórmio (δ<sub>H</sub>,

7,27) e piridina ( $\delta_{\text{H}}$ , 7,22; 7,58 e 8,73), e para os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  pelos picos de carbono-13 dos solventes: clorofórmio  $\delta$  (77,23) e piridina os três quartetos  $\delta$  (123,83; 135,89 e 150,44).

As multiplicidades dos sinais de hidrogênio nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram indicadas segundo a convenção: *s* (simpleto), *sl* (simpleto largo), *d* (duplete), *dd* (duplo duplete), *dt* (duplete triplo), *td* (tripleto duplo), *t* (tripleto) e *m* (multiplete).

Segundo a convenção, através da utilização da técnica DEPT 135° foi determinado o padrão de hidrogenação dos carbonos: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico),  $\text{CH}_2$  (carbono metilênico) e  $\text{CH}_3$  (carbono metílico).

Os espectros de RMN foram obtidos em equipamentos do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREM), do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

### 5.5.3 Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM)

As análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM) foram efetuadas em aparelho Shimadzu GC/MS, modelo QP2010SE Plus usando coluna capilar Rtx®-5MS (95% dimetilpolisiloxano e 5% difenil) de 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,1  $\mu\text{m}$  de espessura do filme da fase fixa; as temperaturas do injetor e do detector foram 260 e 300 °C, respectivamente; condições da coluna: 60 °C (0,5 min) para 260 °C (5 min) a 6 °C  $\text{min}^{-1}$ , então 12 °C  $\text{min}^{-1}$  até 300 °C (10 min) usando He como gás de arraste com vazão de 1,7  $\text{mL min}^{-1}$  (*split mode*). A análise com o detector de massa foi no modo *scan* com tempo de análise em 52 min; o registro dos espectros de massa foi na faixa de 47 a 600 Daltons por impacto de elétrons (EMIE) com energia de ionização de 70 eV (voltagem de 1,5 KV), analisador do tipo quadrupolo e fonte de íons a 200 °C.

Os cromatogramas e espectros de massa foram obtidos em equipamento da Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

## 5.6 Determinação do teor de óleo

O teor de óleo foi determinado a partir da parte interna dos grãos (matéria desidratada = 21,394 g) utilizando um extrator do tipo Soxhlet e hexano como solvente em



um processo de extração contínua e ininterrupta por 6 h. Após este período, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida fornecendo uma massa de óleo fixo (5,904 g).

### **5.7 Determinação do teor de umidade**

Os grãos (30,974 g) foram colocados em estufa a uma temperatura de 105 °C por 24 h, tempo necessário para a obtenção de uma massa constante (21,394 g). O teor de umidade foi obtido conforme equação abaixo:

$$\text{Umidade (\%)} = (m_i - m_f) / m_i \times 100$$

Onde:  $m_i$  = massa inicial das sementes;  $m_f$  = massa final das sementes

### **5.8 Outros parâmetros físicos**

Os pontos de fusão das substâncias isoladas foram determinados em equipamento da Mettler Toledo, modelo FP62. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 2 °C min<sup>-1</sup>.

### **5.9 Derivatização**

#### **5.9.1 Sililação**

Os constituintes dos extratos hexânico e etanólico foram convertidos em derivados sililados segundo a metodologia de Isidorov *et al.*, (2009) com modificações. À mistura constituída de 2 mg de amostra foram adicionados 100 µL de BSTFA + 1% TMCS e mantida sob agitação a 60 °C durante 1 hora.

#### **5.9.2 Análise dos produtos sililados**

As amostras sililadas foram analisadas em aparelho SHIMADZU GC-2010 Plus acoplado a um espectrômetro de massas GCMS-QP2010SE, equipado com uma coluna Rtx®-5MS (95% dimetilpolisiloxano e 5% difenil) de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme da fase fixa; temperatura do injetor 260 °C e a do detector 300 °C; programação de temperatura da coluna: 60 °C (0,5 min) com taxa de

aquecimento de  $6\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até  $260\text{ }^{\circ}\text{C}$  (5 min), em seguida elevou-se a uma taxa de  $12\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ , então mantida nesta temperatura por 10 min. O gás de arraste foi o hélio, com vazão de  $1,7\text{ mL min}^{-1}$ . A análise com o detector de massas foi realizado no modo *scan*, tempo de análise 52,21 min; a aquisição dos espectros de massas foi feita na faixa de 47 a 600 Dalton por impacto de elétrons, com energia de ionização de 70 eV (voltagem 1,5 KV, analisador do tipo quadrupolo) e fonte de íons a  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 5.9.3 Saponificação/metilação

Ao extrato hexânico (EHXA, 10,0 g) em MeOH (80 mL) foi adicionado KOH (10,0 g) e a mistura foi refluxada durante 1 h. Após resfriamento, foi adicionado  $\text{H}_2\text{O}$  destilada (240 mL) e a solução hidroalcoólica alcalina foi submetida a extração com hexano (3 x 50 mL) em funil de decantação. As fases orgânicas foram reunidas, secas com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentradas sob pressão reduzida, originando os insaponificáveis como um sólido amarelo claro (1,87 g). A fase hidroalcoólica foi acidificada com HCl 20% até pH 3–4 e então submetida à extração com AcOEt (3 x 50 mL). As fases orgânicas foram reunidas, secas com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentradas sob pressão reduzida, fornecendo os saponificáveis como um sólido esbranquiçado (7,15 g).

Ao material (2,0 g) saponificável em MeOH (20,0 mL) foi adicionado HCl concentrado (1,0 mL) e a mistura foi refluxada durante 1 hora. Após resfriamento à temperatura ambiente foi adicionado  $\text{H}_2\text{O}$  (10 mL), a mistura reacional foi submetida a extração com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 10 mL) e as fases orgânicas foram reunidas e secas com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Concentração sob pressão reduzida forneceu o produto metilado (1,39 g) que foi, então, purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica 60G e obtido 44 frações. Utilizou-se como eluentes os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila com polaridades crescentes (Tabela 9, p. 74). Após comparação em CCD as frações foram reunidas em 3 subgrupos de maior pureza: AGME 24-28, AGME 29-30 e AGME 31-39 (AGME = ácidos graxos metilados), e foram submetidas a análises por CG/EM.

Tabela 9 – Fracionamento cromatográfico do produto metilado

<b>Eluente</b>	<b>Frações</b>
Hexano	1 – 4
Hexano/Diclorometano (9:1)	5 – 12
Hexano/Diclorometano (8:2)	13 – 26
Hexano/Diclorometano (1:1)	27 – 31
Hexano/Acetato de etila (8:2)	32 – 39
Acetato de etila	40 – 44

Fonte: elaborada pelo autor.

#### 5.9.4 Análise dos produtos metilados

As análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM) foram efetuadas em aparelho Shimadzu GC-2010 acoplado a um espectrômetro de massa GCMS-QP2010SE equipado com coluna Rtx®-5MS (95% dimetilpolisiloxano e 5% difenil) de 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme da fase fixa. Condições: 80 °C (3 min) para 280 °C (5 min) a 5 °C min<sup>-1</sup>, então 20 °C min<sup>-1</sup> até 300 °C (5 min) usando He como gás de arraste com vazão de 1,7 mL min<sup>-1</sup>; temperatura do injetor de 250 °C e do detector de 300 °C. A análise com o detector de massa foi no modo *scan* com tempo de análise em 40 min; o registro dos espectros de massa foi na faixa de 35 a 500 Daltons por impacto de elétrons com energia de ionização de 70 eV (voltagem de 1,5 KV), analisador do tipo quadrupolo e fonte de íons a 240 °C.

#### 5.10 Isolamento de XA-1

A fração FHEHXA (2,0182 g) (Esquema 8, p. 69) foi adsorvida em gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e submetida a cromatografia em coluna de gel de sílica empacotada com hexano. A coluna foi eluída com hexano e, a seguir, com quantidades crescentes de AcOEt em hexano, obtendo-se 26 frações. Após análise por CCD as frações semelhantes foram reunidas. As frações 17-20 [eluente Hex:AcOEt (8:2)] foram recromatografadas em coluna de gel de sílica empacotada com hexano. A eluição foi realizada usando como eluentes a mistura hexano-diclorometano em ordem crescente de polaridade: 9:1; 8:2; 7:3; 6:4 e 5:5. A análise em CCD permitiu a reunião das frações 16-44 (40 mg)

(eluente Hex:DCM 30%), resultando na amostra pastosa rotulada como **XA-1**. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  revelaram tratar-se de triglicerídeos.

### 5.11 Isolamento de XA-2

Durante a concentração do extrato etanólico (EEXA) (Esquema 8, p. 69) sob vácuo, precipitou um material amarelado que após recristalização em metanol resultou em um sólido (60 mg) branco amorfo, solúvel em piridina, denominado **XA-2**. Os dados dos espectros de RMN (de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ ) e IV de **XA-2**, após comparação com dados registrados na literatura, revelaram a presença de uma mistura de triterpenos.

### 5.12 Atividade antioxidante

Foi preparada uma solução estoque de DPPH a  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ , dissolvendo-se 4,0 mg de DPPH em 100 mL de metanol. Pesou-se 25 mg dos extratos EHXA e EEXA e do padrão (rutina) e dissolveu-se em metanol obtendo-se uma solução estoque de concentração  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Em seguida, fez-se diluições para a obtenção das concentrações finais 200, 150, 100, 50 e  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Uma alíquota de  $300 \mu\text{L}$  da solução dos extratos ou padrão foi transferida para um tubo de ensaio e foi adicionado  $2700 \mu\text{L}$  da solução estoque de DPPH. Após 30 minutos, foi medida a absorvância das misturas reacionais em espectrofotômetro UV-Vis, no comprimento de onda 516 nm. O teste foi Realizado em triplicata.

Os valores da absorvância nas concentrações de 250, 200, 150, 100, 50 e  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , no tempo de 30 min foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA%), determinados pela seguinte equação (TEPE; SOKMEN, 2007; HUANG *et al.*, 2003):

$$AA(\%) = 100(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{DPPH+amostra}})/A_{\text{DPPH}}$$

Onde:

$A_{\text{DPPH}}$ : absorvância inicial da solução do radical DPPH ( $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ )

$A_{\text{DPPH+amostra}}$ : absorvância de cada concentração da amostra + DPPH

### 5.13 Inibição da enzima acetilcolinesterase

A metodologia consiste em retirar uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  dos extratos na concentração 10  $\text{mg mL}^{-1}$  e 2  $\text{mg mL}^{-1}$  para compostos puros e aplicar em uma cromatoplaça. Após a evaporação do solvente, foi borrifado uma mistura (1:1) de iodeto de acetilcolina (ATCI) 1  $\text{mmol L}^{-1}$  com o reagente de Ellman o ácido 5,5'-Ditiobis-(2-nitrobenzoico), DTNB, 1  $\text{mmol L}^{-1}$ , deixando em repouso por 3 minutos para a secagem da placa. Em seguida foi borrifado a solução da enzima acetilcolinesterase (3  $\text{U mL}^{-1}$ ). Após 10 minutos, ocorre o surgimento de uma coloração amarela, porém, onde há inibição da enzima, observa-se um halo branco em torno dos “spots” onde foram aplicadas as amostras. Em 20-30 minutos a coloração desaparece. Como controle positivo foi utilizada solução do padrão sal de Eserina (2  $\text{mg mL}^{-1}$ ) e como controle negativo, foram utilizados solventes.

## 6 PARTE 2: INVESTIGAÇÃO DO USO DOS GRÃOS DE *X. americana* COMO CATALISADOR EM BIOTRANSFORMAÇÕES

### 6.1 Resultados e discussão

A utilização direta de partes de plantas em reações de biotransformações é vantajosa, pois, evita fatores como perda de tempo e os cuidados necessários ao isolamento de enzimas ou a preparação de culturas de células, entre diversas outras vantagens.

A análise dos substratos e produtos foi realizada utilizando cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM), cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de ionização de chama (CG/DIC) e, na maioria dos casos, Ressonância Magnética Nuclear (RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ ).

#### 6.1.1 Determinação de proteína pelo método de Kjeldahl

As proteínas desempenham papéis extremamente relevante na maioria dos processos biológicos, atuando, inclusive, como catalisadores. Assim, a determinação de proteínas pode servir como uma estimativa do potencial enzimático de um material biológico (ASSUNÇÃO, 2008). O desenvolvimento de metodologia para a determinação do teor de proteínas é de fundamental importância em diversas áreas da Ciência, com destaque para a nutrição humana, animal e análises clínicas.

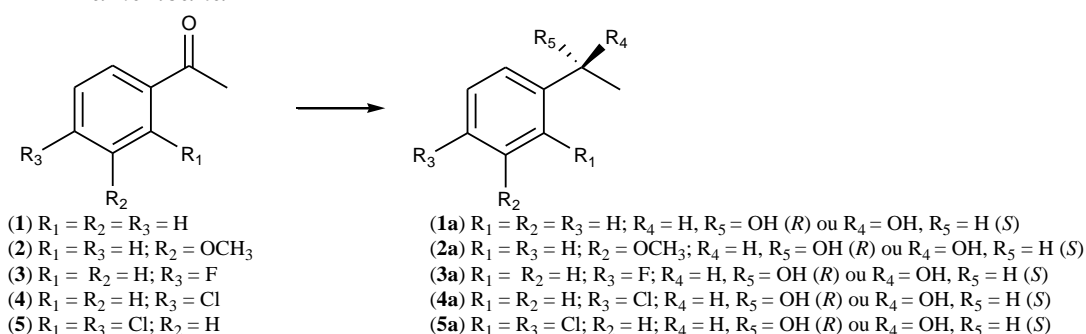
Assim, o experimento inicial foi para determinar o total de proteínas no sistema enzimático usando o método de Kjeldahl. O teor de proteína estimado nos grãos de *X. americana* foi 19,77%, sendo esta quantidade considerada alta por se tratar de grãos.

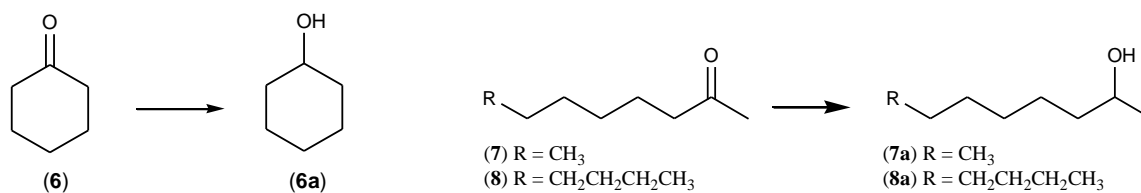
Tendo em vista avaliar o potencial biocatalisador de *X. americana*, algumas reações empregando substratos das funções orgânicas cetona, aldeído, ácido carboxílico e éster foram levadas a efeito.

### 6.1.2 Redução de cetonas

O objetivo deste ensaio foi verificar a presença de redutases nos grãos do vegetal usando acetofenona (**1**) como substrato modelo (Esquema 9) através de conhecida metodologia (YADAV *et al.*, 2002; SOUZA, 2003). A reação, visando a redução de **1**, foi efetuada em diferentes condições buscando a otimização do processo tendo em vista melhores conversão (%) e excesso enantiomérico (*ee*). Assim, foram variados os parâmetros quantidade do biocatalisador (2,0, 3,0 e 5,0 g), temperatura (30, 35 e 40 °C), pH (5 e 7), velocidade de agitação (150, 175 e 225 rpm) e tempo (24, 48 e 72 h). Após tentativas diversificando os valores dos diferentes parâmetros, a incubação de **1** (50 mg, 0,416 mmol) com grãos frescos (5,0 g) em água destilada (50 mL, pH 5,0) a temperatura ambiente (30 °C) com agitação de 175 rpm por 72 horas (item 6.2.5) mostrou o melhor resultado. A reação foi primeiramente analisada por CCD sendo observada a formação do produto de redução. A mistura reacional bruta foi então submetida à cromatografia em coluna (CC) de gel de sílica, acompanhada através de cromatografia em camada delgada (CCD) de gel de sílica e visualizada depois de borrifada com solução de vanilina/ácido perclórico em etanol como revelador. A conversão da cetona **1** no produto **1a** foi de 54%, determinada por GC/EM (Figura 30, p. 78) com o resultado apresentado na Tabela 10 (p. 78).

Esquema 9 – Reações de biorredução de cetonas catalisadas pelos grãos de *X. americana*





Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 30 – Cromatograma (CG/EM) do produto **1a** de biorredução da acetofenona (**1**) com grãos de *X. americana*

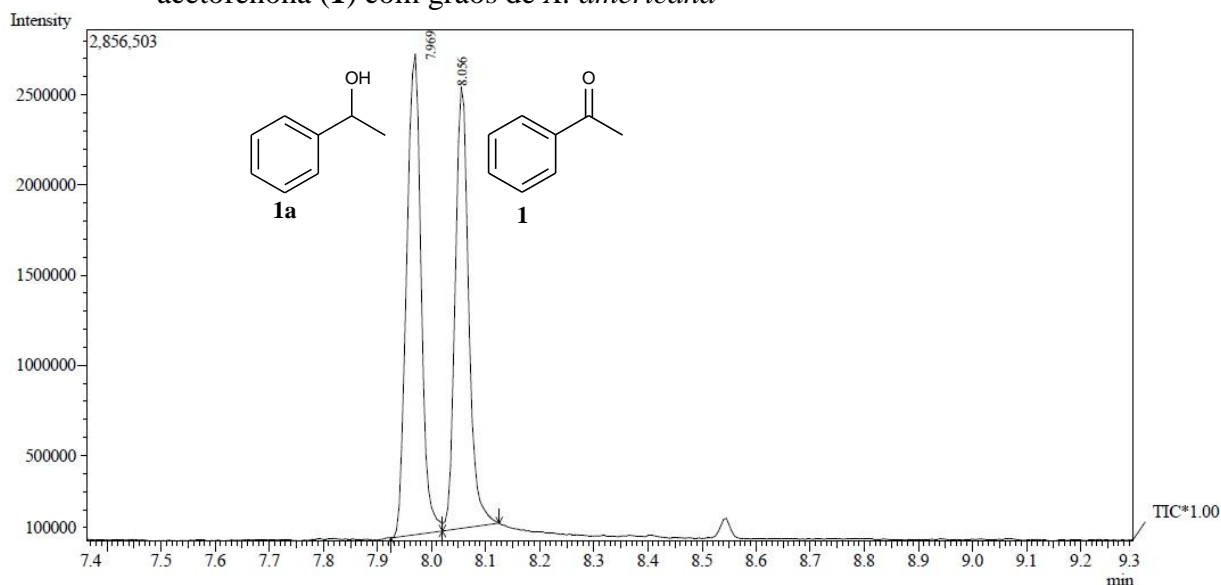


Tabela 10 – Percentagens relativas de bioconversão obtidas por CG/EM e excesso enantiomérico obtidos por CG/DIC dos produtos da biorredução de **1–8**

Produto	Bioconversão (%)	ee (%)
<b>1a</b>	54	48 ( <i>S</i> )
<b>2a</b>	60	89 ( <i>S</i> )
<b>3a</b>	6	99 ( <i>R</i> )
<b>4a</b>	48	91,4 ( <i>S</i> )
<b>5a</b>	53	> 99 ( <i>S</i> )
<b>6a</b>	14	-
<b>7a</b>	43	81,3 ( <i>R</i> )
<b>8a</b>	29	35 ( <i>S</i> )

ee = excesso enantiomérico; Fonte: elaborada pelo autor.

A obtenção de **1a** (alcoóis *R,S*) foi detectada, inicialmente, pela comparação entre os espectros de massas de **1** (Figura 31, p. 79) e de **1a** (Figura 32, p. 79) com íons moleculares em  $m/z$  120 e 122, respectivamente. Por sua vez, o espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 33, p. 79) de **1a** registrou sinais em  $\delta_H$  1,44 (d, 6,0 Hz, 3H), 4,80 (q, 6,0 Hz, 1H) e 7,28 (multipeto, 5H), devidos aos átomos de hidrogênios metílicos, carbinólico e aromáticos, respectivamente,

compatíveis com **1a**. Esta análise foi confirmada pelos seis sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 34, p. 80) [ $\delta_{\text{C}}$  25,1 ( $\text{CH}_3$ ), 70,0 ( $\text{CH-O}$ ), 125,4 (2  $\text{HC=}$ ), 127,2 ( $\text{HC=}$ ), 128,3 (2  $\text{HC=}$ ) e 146,0 ( $\text{C=}$ )].

Figura 31 – Espectro de massas de **1**,  $T_{\text{R}} = 8,056$  minutos

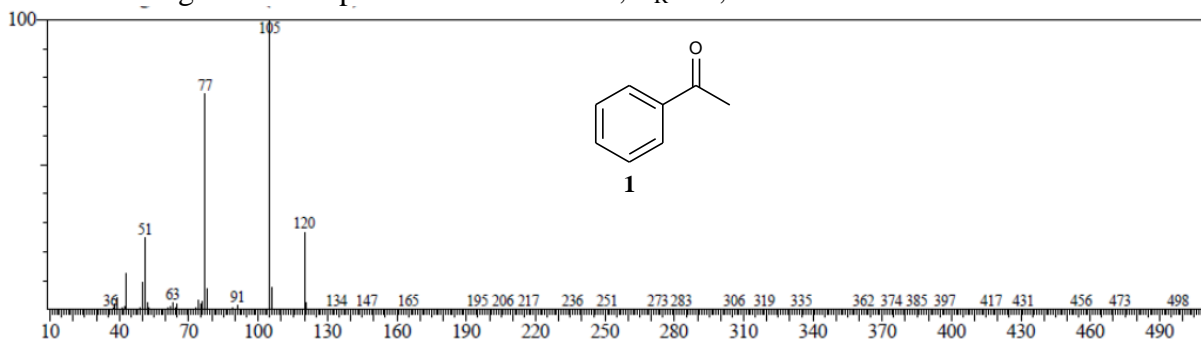


Figura 32 – Espectro de massas de **1a**,  $T_{\text{R}} = 7,969$  minutos

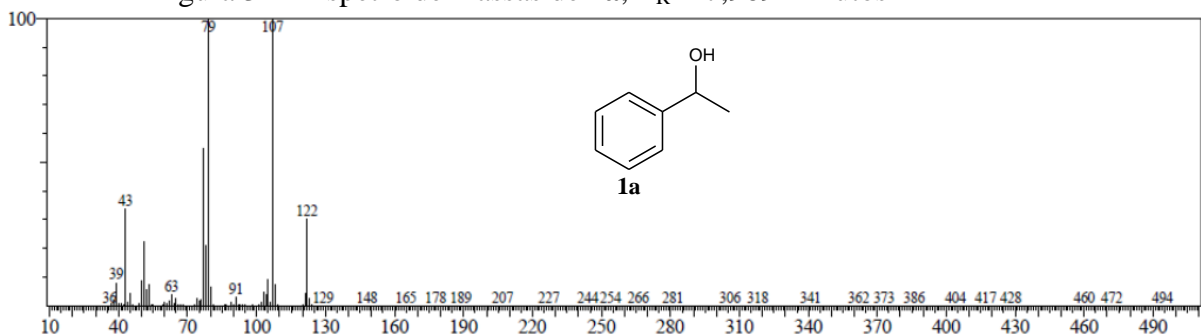


Figura 33 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **1a**

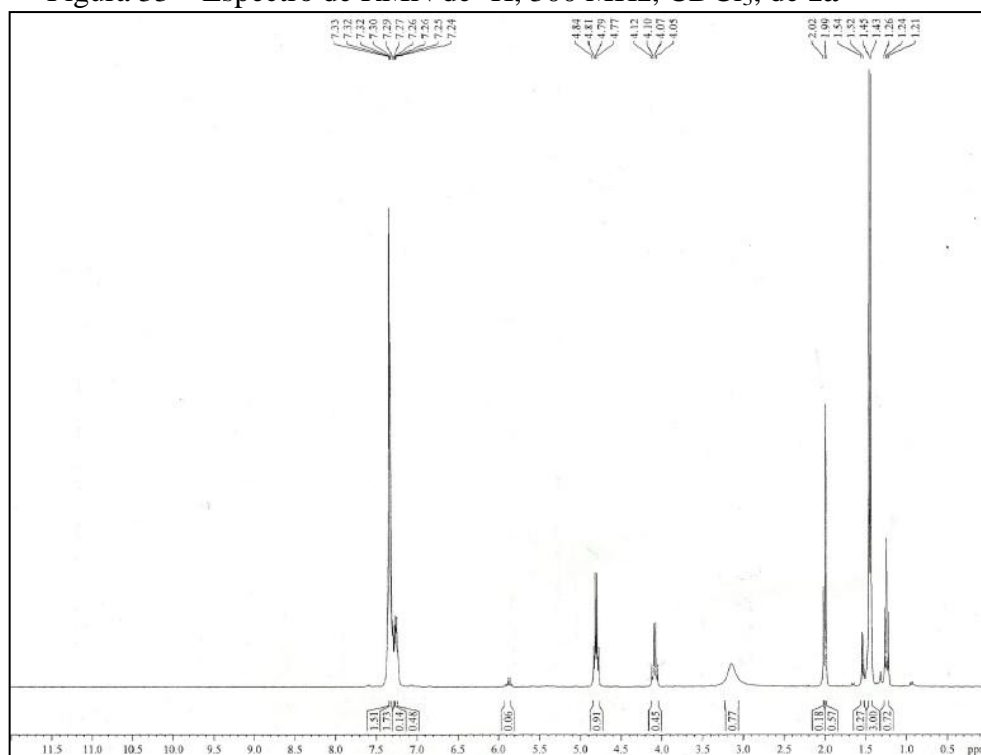
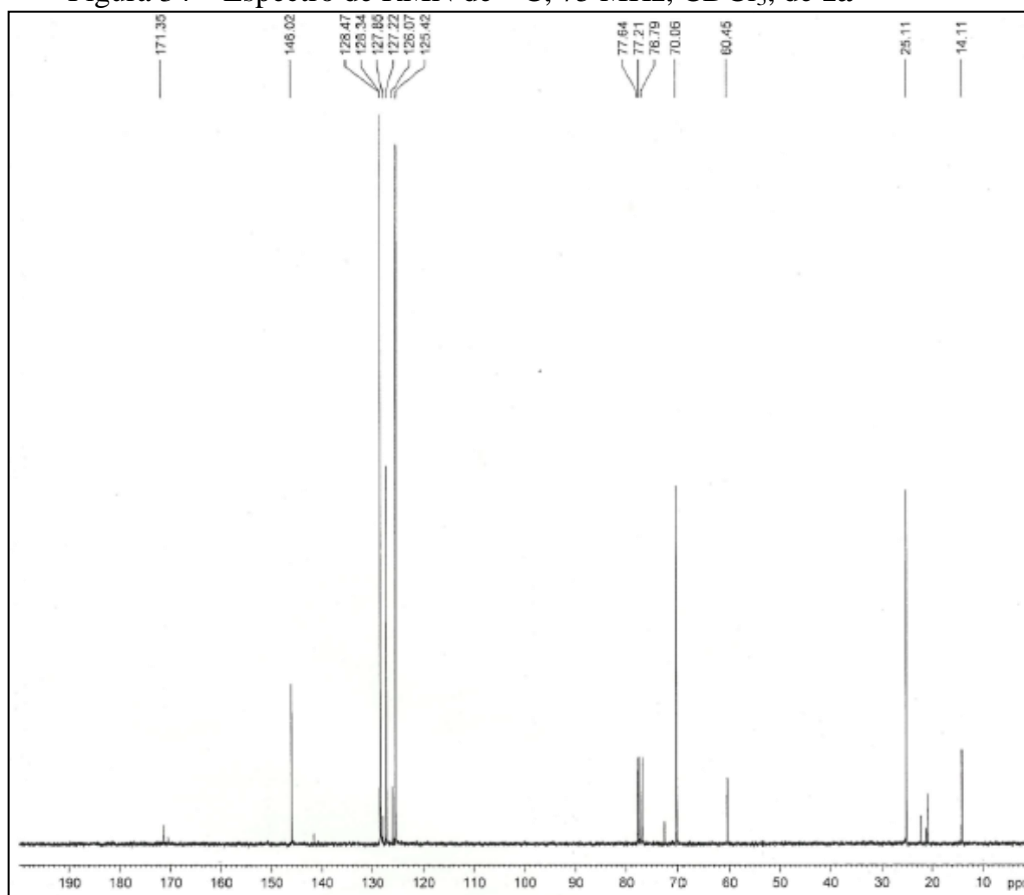
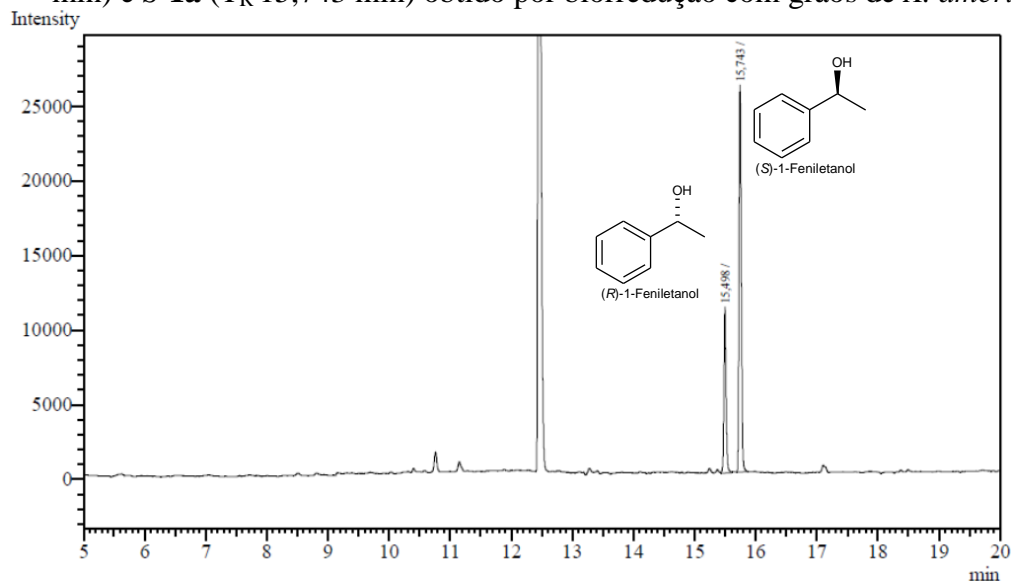




Figura 34 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **1a**

Embora a biorredução da cetona pró-quiral **1** nos alcoóis secundários **1a** (*R,S*) tenha ocorrido com rendimento médio (54%), a determinação dos excessos enantioméricos é demandada, visto que, alcoóis secundários enantiomericamente puros, constituem precursores de grande importância para as indústrias farmacêutica e de perfumaria. A identificação do isômero *S* com *ee* de 48% (Tabela 10, p. 78) foi resolvida mediante a comparação dos tempos de retenção em coluna quiral e área dos picos dos alcoóis **1a** (*R,S*) por injeção em CG/DIC (Figura 35, p. 81) e mostrou-se em acordo com o modelo de Prelog para a biorredução de cetonas pró-quirais (YADAV *et al.*, 2002).

Figura 35 – Cromatograma (CG/DIC) da mistura dos álcoois *R*-**1a** ( $T_R$  15,498 min) e *S*-**1a** ( $T_R$  15,743 min) obtido por biorredução com grãos de *X. americana*



Os mesmos procedimentos analíticos foram utilizados para a análise dos produtos resultantes da redução de outros substratos.

As demais reações de biorredução de outras cetonas (Esquema 9, p. 77) ocorreram utilizando os mesmos parâmetros de reação descritos para a biorredução de **1**. Assim, com base nos resultados acima, em experimentos separados, as cetonas 3-metóxi-acetofenona (**2**), 4-flúor-acetofenona (**3**), 4-cloro-acetofenona (**4**), 2,4-dicloro-acetofenona (**5**), ciclohexanona (**6**), octan-2-ona (**7**) e undecan-2-ona (**8**) foram incubadas com os grãos frescos de *X. americana*. As misturas reacionais brutas foram submetidas à cromatografia em coluna de gel de sílica, acompanhadas através de CCD (eluente Hexano-AcOEt 7:3) e visualizadas utilizando solução de vanilina/ácido perclórico/EtOH. Os produtos foram quantificados por CG/EM e, nos casos concernentes, os excessos enantioméricos foram calculados utilizando CG/DIC com os resultados apresentados na Tabela 10 (p. 78).

A obtenção do produto **2a** (álcoois *R,S*) representado pelo pico com tempo de retenção 10,874 minutos no cromatograma (Figura 36, p. 82) foi detectada, inicialmente, pela comparação entre os espectros de massas de **2** (Figura 37, p. 82) e de **2a** (Figura 38, p. 82) com íons moleculares em  $m/z$  148 e 150, respectivamente. Por sua vez, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 39, p. 83) de **2a** registrou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  1,49 (d, 6,0 Hz, 3H), 4,86 (q, 6,4 Hz, 1H), 6,80 (dd, 8,0 e 2,3 Hz, 1H), 6,95 (m, 2H) e 7,25 (t, 8,1 Hz, 1 H) devidos aos átomos de hidrogênios metílicos, carbinólico e aromáticos, respectivamente, compatíveis com **2a**. Esta análise foi confirmada pelos nove sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 40, p. 83) [ $\delta_{\text{C}}$

25,3 (CH<sub>3</sub>), 55,4 (CH<sub>3</sub>-O), 70,5 (CH-O), 111,3 (=CH), 113,1 (=CH), 117,9 (=CH), 129,7 (=CH), 147,8 (C=) e 160,0 (=C-O)].

Figura 36 – Cromatograma (CG/EM) do produto **2a** de biorredução da 3'-metoxiacetofenona (**2**) com grãos de *X. americana*

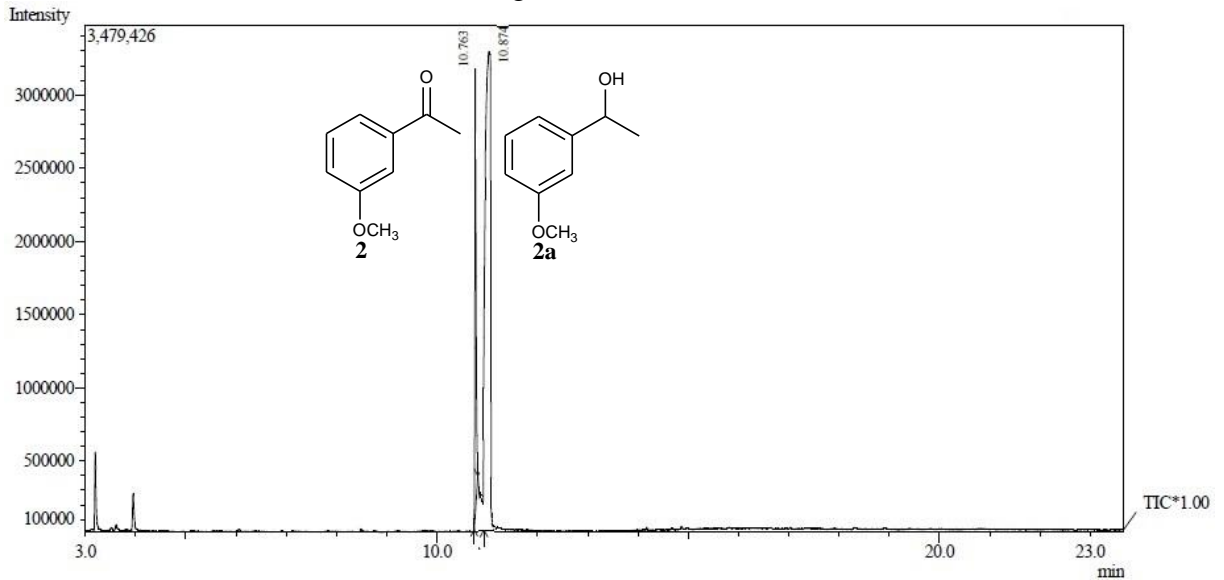


Figura 37 – Espectro de massas de **2**, T<sub>R</sub> = 10,763 minutos

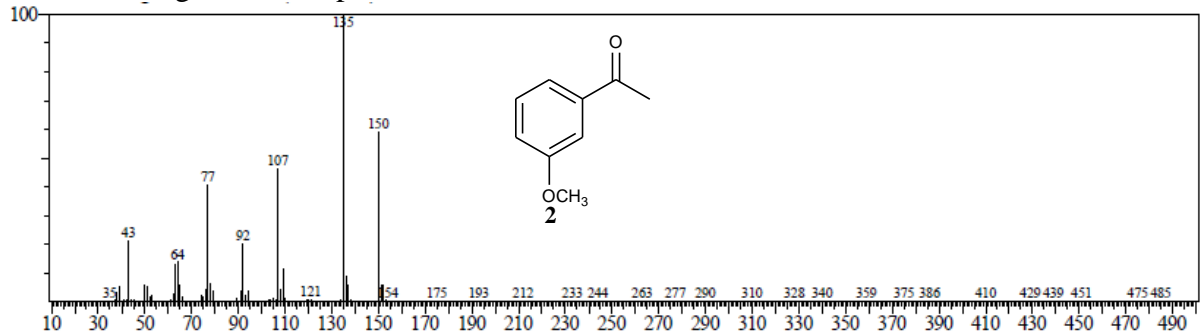


Figura 38 – Espectro de massas de **2a**, T<sub>R</sub> = 10,874 minutos

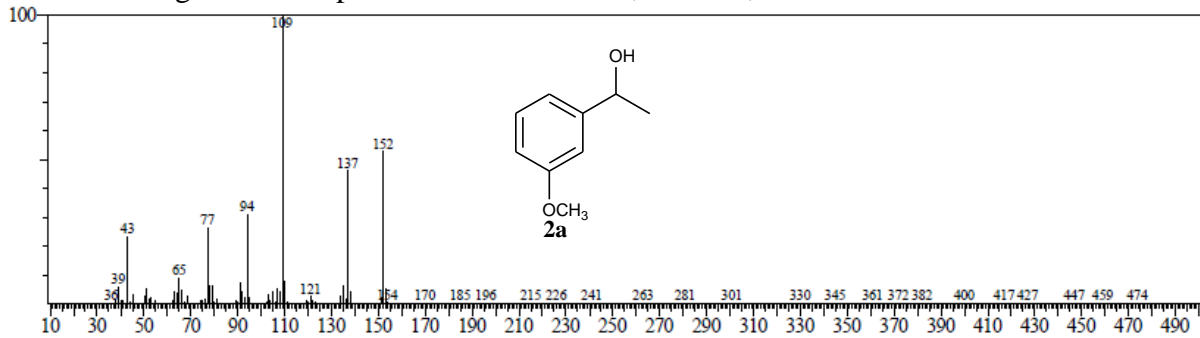


Figura 39 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **2a**

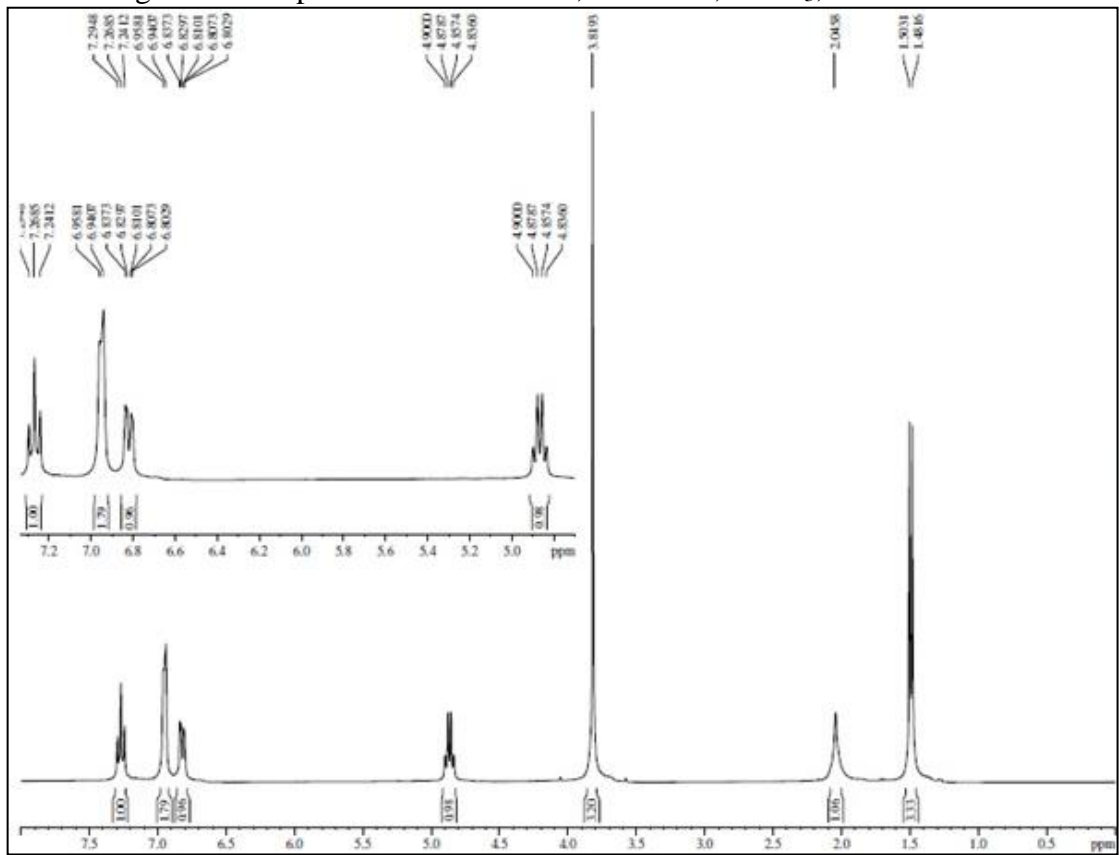
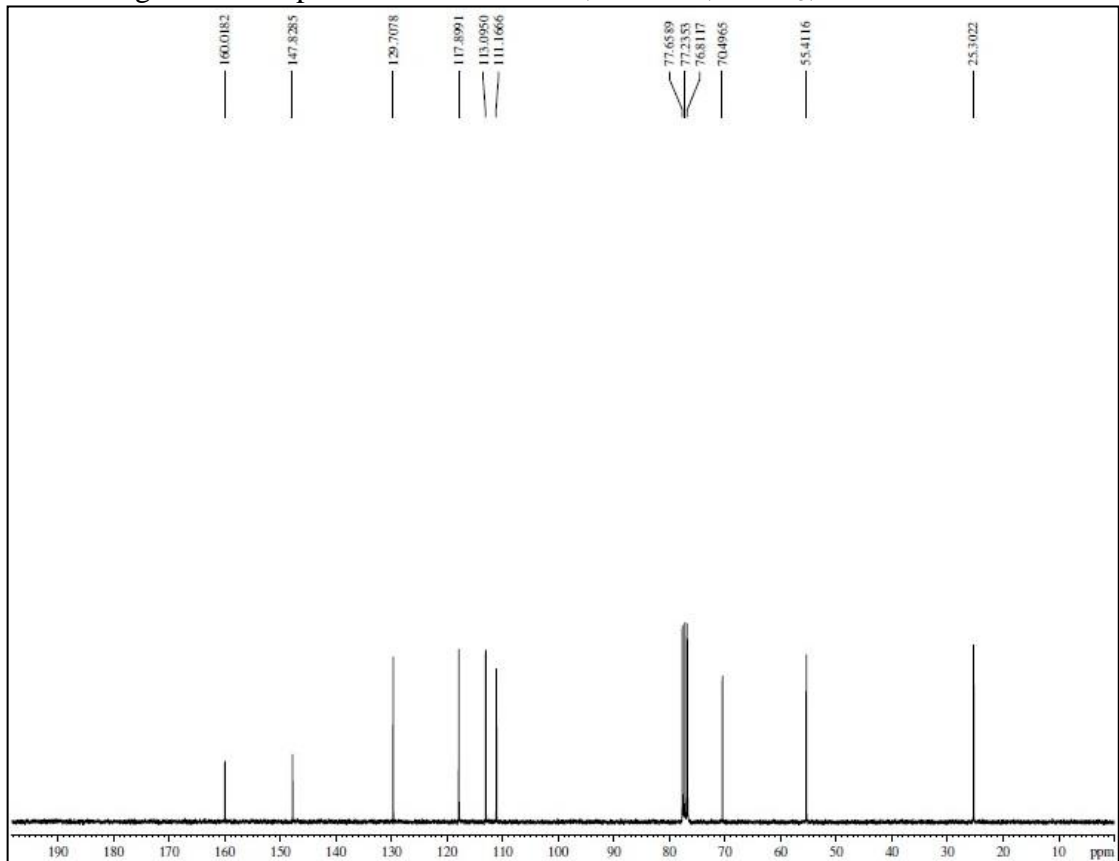
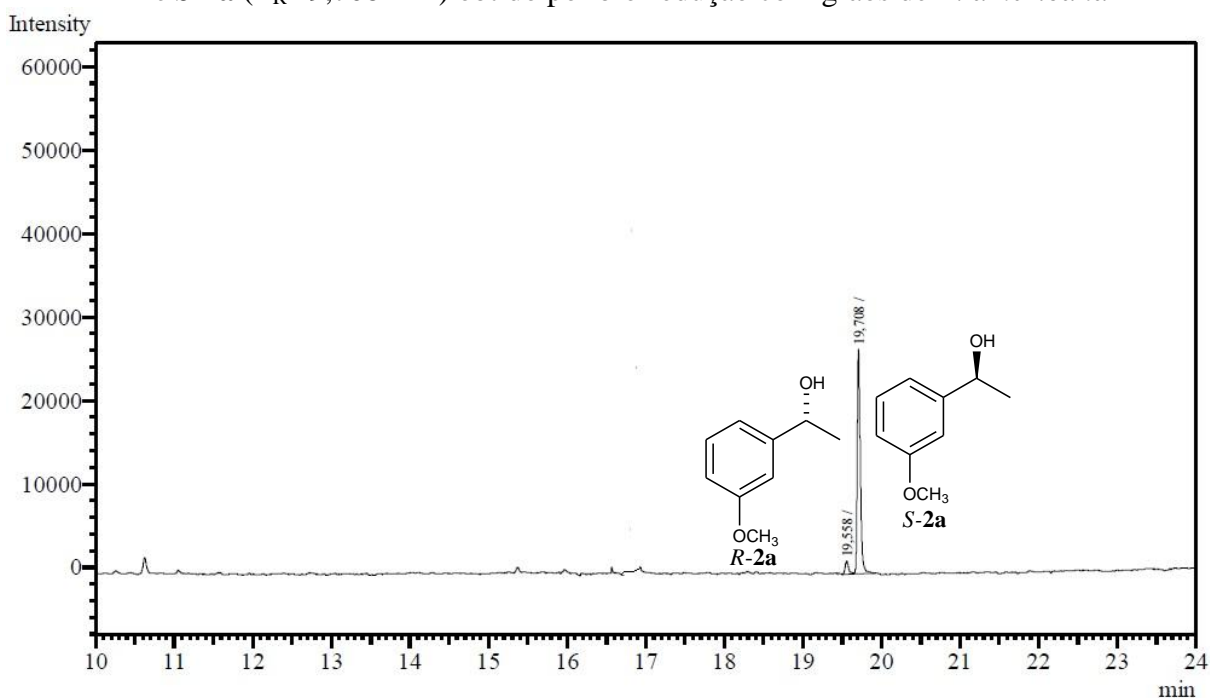


Figura 40 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **2a**



A identificação do isômero *S* com *ee* 88% (Tabela 10, p. 78) foi resolvida mediante a comparação dos tempos de retenção em coluna quiral e área dos picos dos alcoóis **2a** (*R,S*) por injeção em CG/DIC (Figura 41) e mostrou-se em acordo com o modelo de Prelog para a biorredução de cetonas pró-quirais (YADAV *et al.*, 2002).

Figura 42 – Cromatograma CG/DIC da mistura dos alcoóis *R-2a* ( $T_R$  19,558 min) e *S-2a* ( $T_R$  19,708 min) obtido por biorredução com grãos de *X. americana*



A obtenção do produto **3a** (alcoóis *R,S*) representado pelo pico com tempo de retenção 8,157 minutos no cromatograma (Figura 42, p. 85) foi detectada, inicialmente, pela comparação entre os espectros de massas de **3** (Figura 43, p. 85) e de **3a** (Figura 44, p. 85) com íons moleculares em  $m/z$  138 e 140, respectivamente. Por sua vez, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 45, p. 86) **3a** registrou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  1,42 (d, 6,4 Hz, 3H), 4,80 (q, 6,4 Hz, 1H), 6,99 (t, 8,7 Hz, 2H) e 7,30 (dd, 8,4 e 5,5 Hz, 2H), devidos aos átomos de hidrogênios metílicos, carbinólico e aromáticos, respectivamente, compatíveis com **3a**. Esta análise foi confirmada pelos seis sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 46, p. 86) [ $\delta_{\text{C}}$  25,3 (CH<sub>3</sub>), 69,7 (CH-O), 115,1/115,4 (2 HC=), 127,1/127,2 (2 HC=), 141,6/141,7 (C=) e 160,5/163,8 (C=)].

Figura 42 – Cromatograma (CG/EM) do produto **3a** de biorredução da 4'-flúoracetofenona (**3**) com grãos de *X. americana*

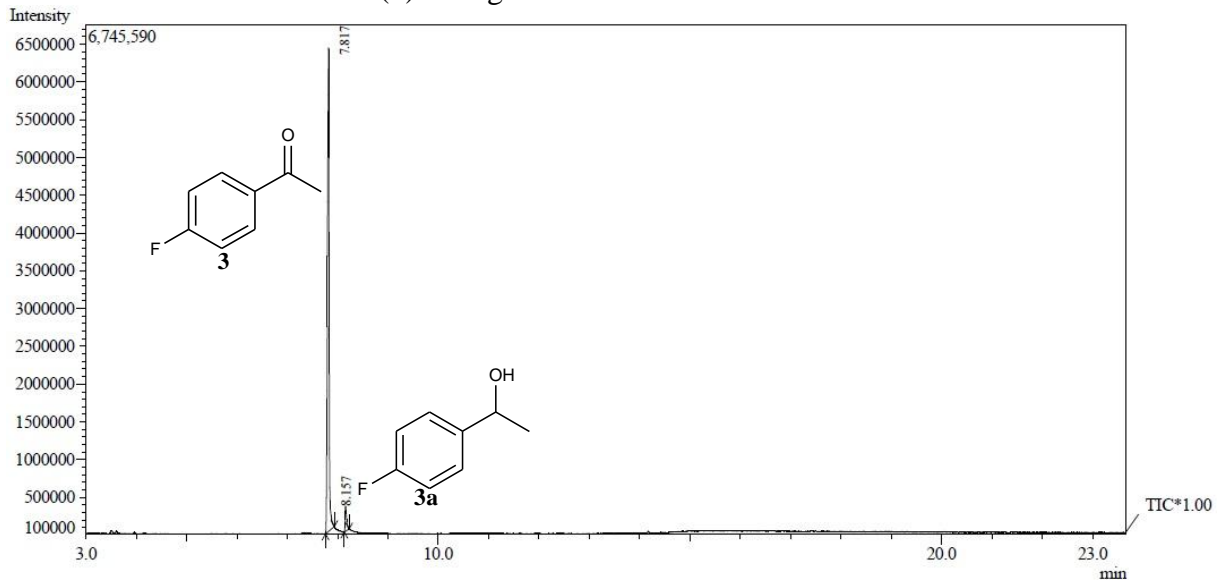


Figura 43 – Espectro de massas de **3**,  $T_R = 7,817$  minutos

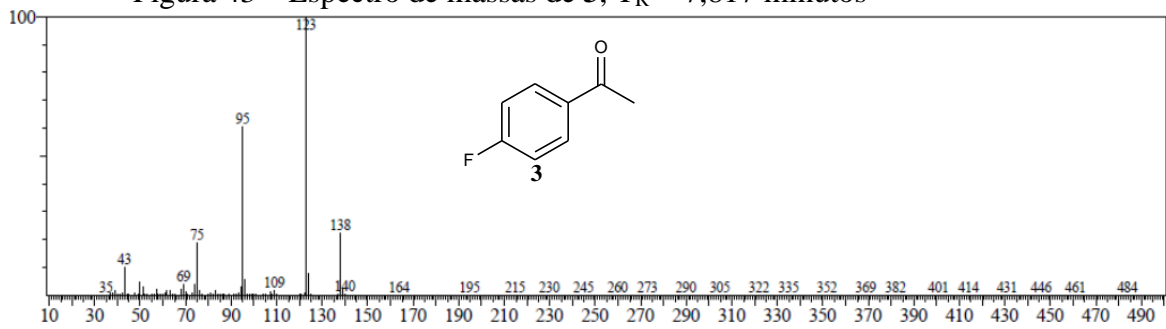


Figura 44 – Espectro de massas de **3a**,  $T_R = 8,157$  minutos

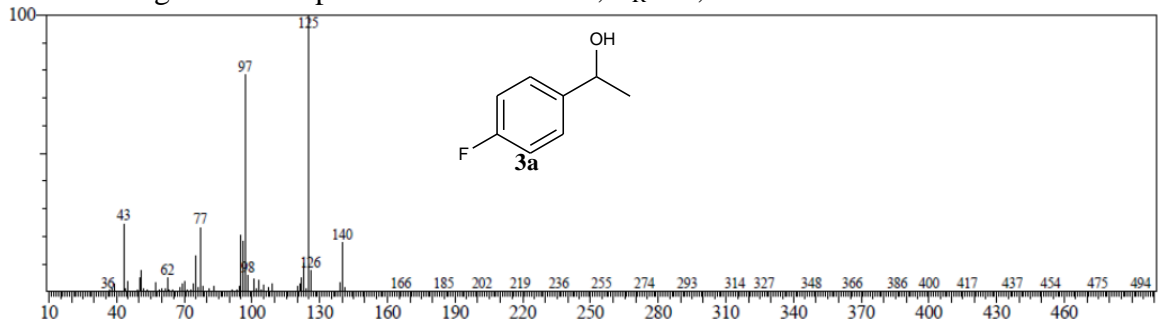


Figura 45 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **3a**

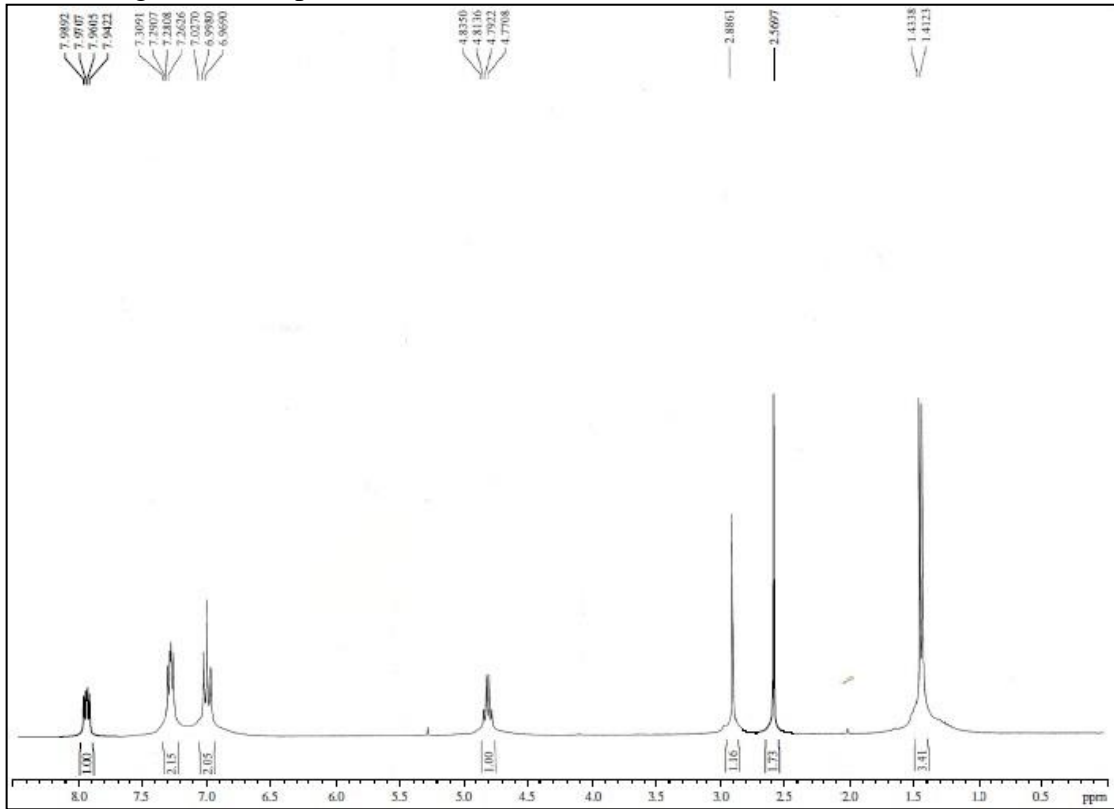
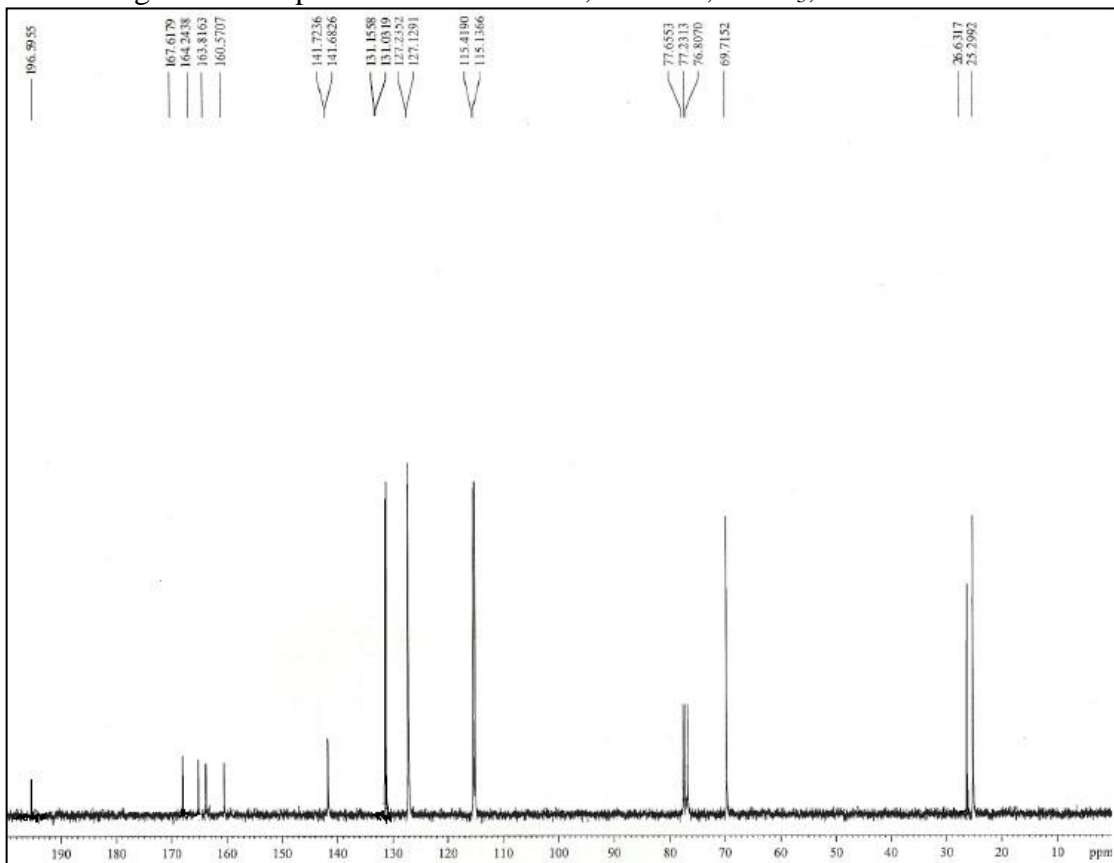
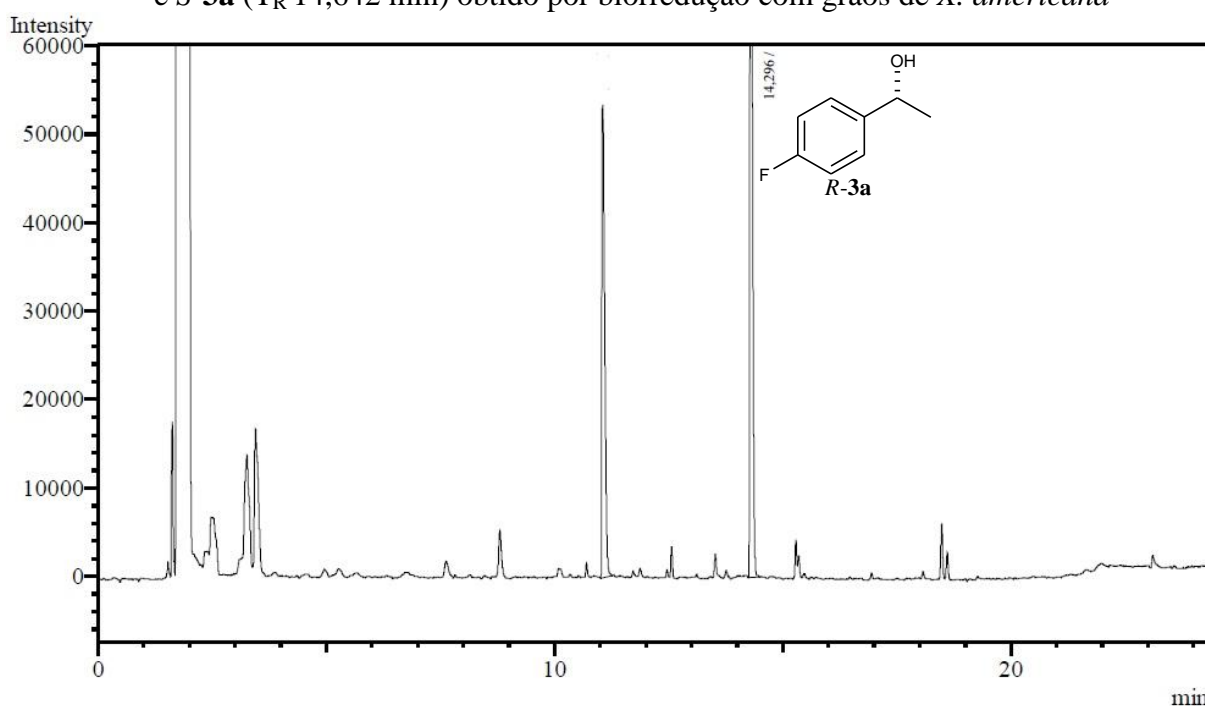


Figura 46 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **3a**



A identificação do isômero *R* com *ee* de 99% (Tabela 10, p. 78) foi resolvida mediante a comparação dos tempos de retenção em coluna quiral com a mistura de alcoóis *R,S* obtida por redução de **3** com NaBH<sub>4</sub> e área dos picos dos alcoóis **3a** (*R,S*) por injeção em CG/DIC (Figura 47). A biorredução de **3** ocorreu via modelo anti-Prelog (YADAV *et al.*, 2002).

Figura 47 – Cromatograma CG/DIC da mistura dos alcoóis *R-3a* (T<sub>R</sub> 14,296 min) e *S-3a* (T<sub>R</sub> 14,642 min) obtido por biorredução com grãos de *X. americana*



O tempo de retenção (T<sub>R</sub> = 14,642) do álcool-*S* foi obtido a partir da análise da mistura dos alcoóis obtido por via química clássica.

A obtenção do produto **4a** (alcoóis *R,S*) representado pelo pico com tempo de retenção 10,417 minutos no cromatograma (Figura 48, p. 88) foi detectada, inicialmente, pela comparação entre os espectros de massas de **4** (Figura 49, p. 88) e de **4a** (Figura 50, p. 88) com íons moleculares em *m/z* 154/156 e 156/158, respectivamente. Por sua vez, o espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 51, p. 89) **4a** registrou sinais em δ<sub>H</sub> 1,41 (d, 6,4 Hz, 3H), 4,79 (q, 6,4 Hz, 1H) e 7,23 (d, 8,6 Hz, 2H e d, 8,6, 2H), devidos aos átomos de hidrogênios metílicos, carbinólico e aromáticos, respectivamente, compatíveis com **4a**. Esta análise foi confirmada pelos seis sinais no espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 52, p. 89) [δ<sub>C</sub> 25,3 (CH<sub>3</sub>), 69,6 (CH-O), 126,9 (2 HC=), 128,6 (2 HC=), 133,0 (C=) e 144,5 (C=)].



Figura 48 – Cromatograma (CG/EM) do produto **4a** de biorredução da 4'-cloroacetofenona (**4**) com grãos de *X. americana*

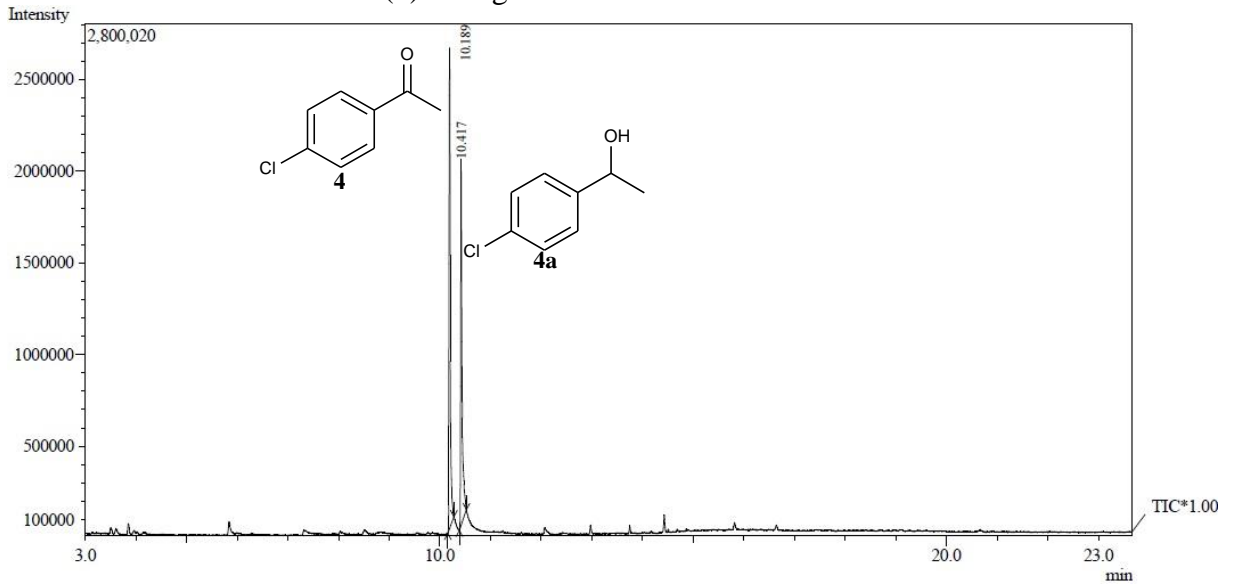


Figura 49 – Espectro de massas de **4**,  $T_R = 10,189$  minutos

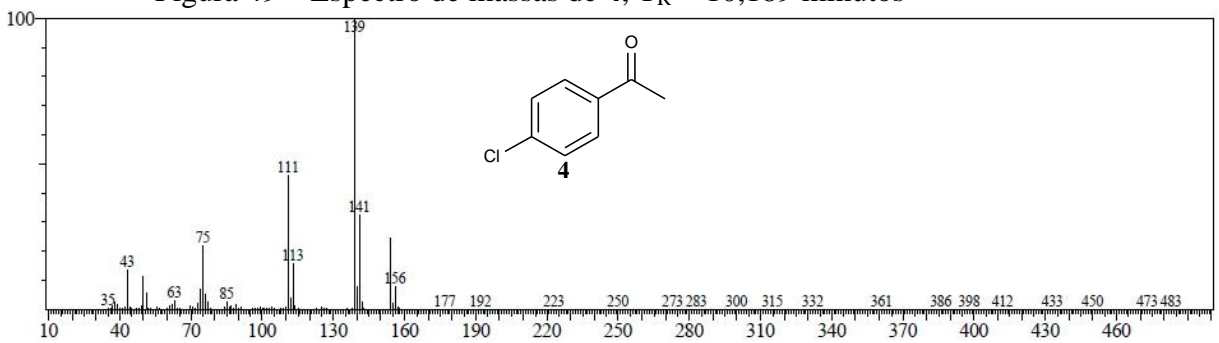


Figura 50 – Espectro de massas de **4a**,  $T_R = 10,417$  minutos

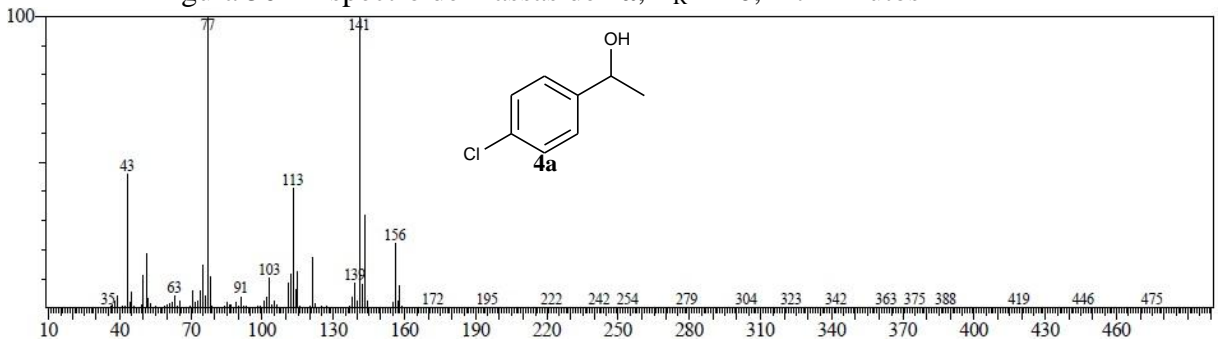
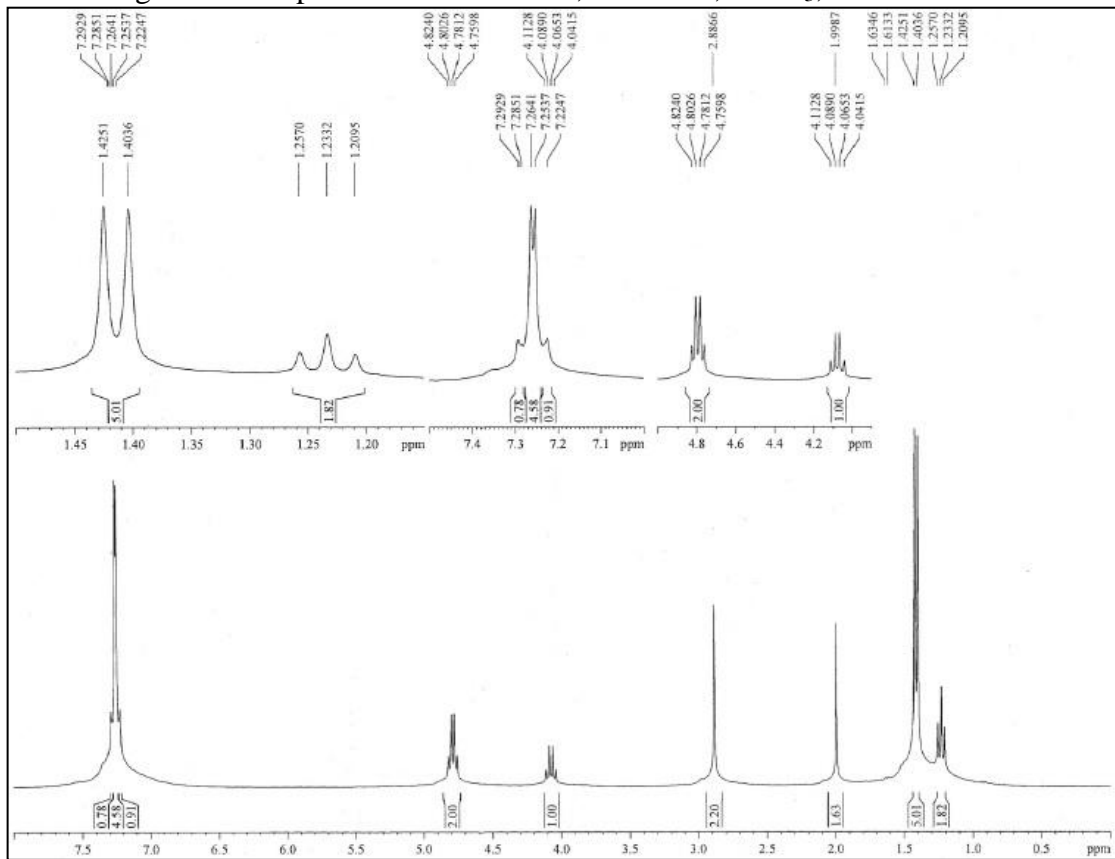
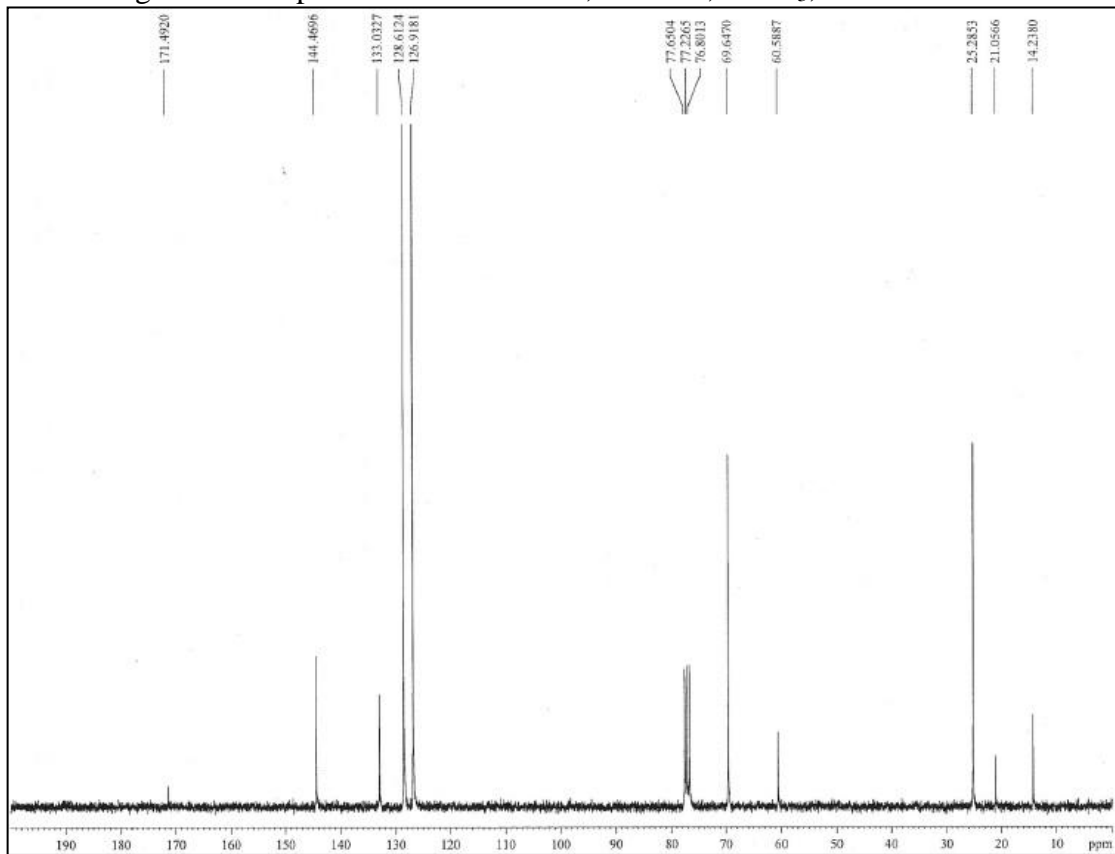
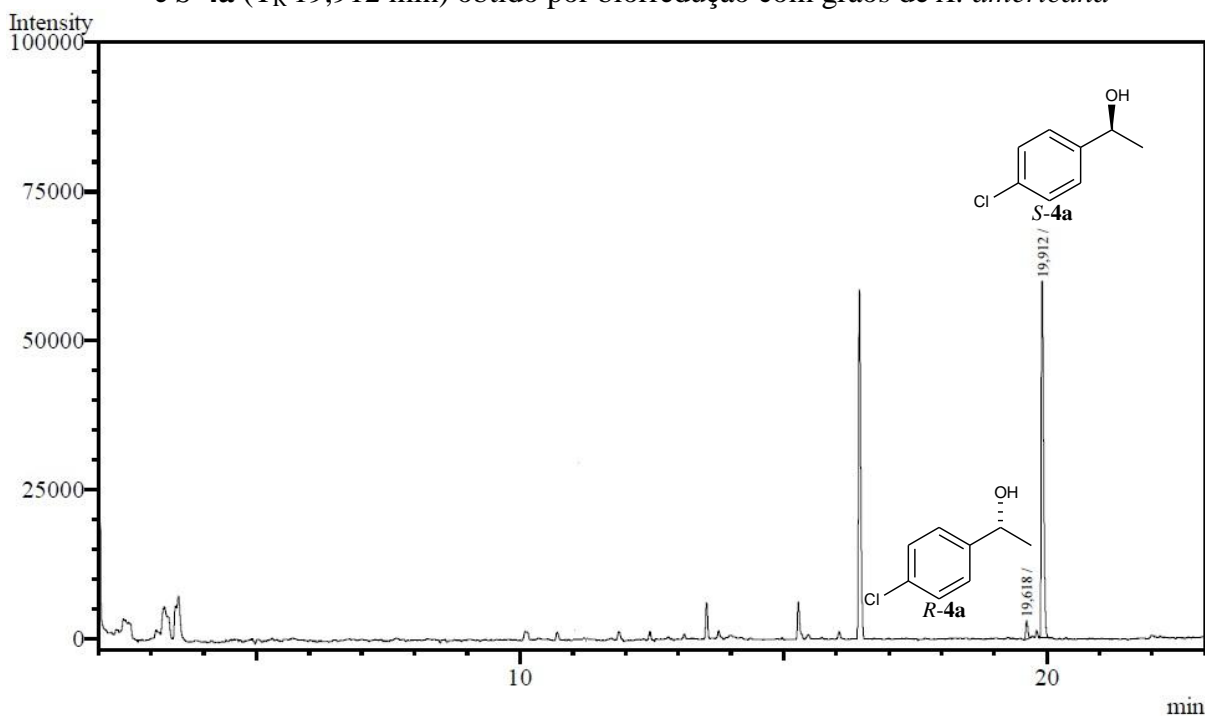


Figura 51 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **4a**Figura 52 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **4a**

A identificação do isômero *S* com *ee* de 91,4% (Tabela 10, p. 78) foi resolvida mediante a comparação dos tempos de retenção em coluna quiral e área dos picos dos alcoóis **4a** (*R,S*) por injeção em CG/DIC (Figura 53) e mostrou-se em acordo com o modelo de Prelog para a biorredução de cetonas pró-quirais (YADAV *et al.*, 2002).

Figura 53 – Cromatograma CG/DIC da mistura dos alcoóis *R-4a* ( $T_R$  19,618 min) e *S-4a* ( $T_R$  19,912 min) obtido por biorredução com grãos de *X. americana*



A obtenção do produto **5a** (alcoóis *R,S*) representado pelo pico com tempo de retenção 11,481 minutos no cromatograma (Figura 54, p. 91) foi detectada, inicialmente, pela comparação entre os espectros de massas de **5** (Figura 55, p. 91) e de **5a** (Figura 56, p. 91) com íons moleculares em  $m/z$  188/190 e 190/192, respectivamente. Por sua vez, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 57, p. 92) **5a** registrou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  1,40 (d, 6,4 Hz, 3H), 5,17 (q, 6,4 Hz, 1H), 7,22 (dd, 8,4 e 2,0 Hz, 1H), 7,29 (d, 2,0 Hz, 1H) e 7,47 (d, 8,4 Hz, 1H), devidos aos átomos de hidrogênios metílicos, carbinólico e aromáticos, respectivamente, compatíveis com **5a**. Esta análise foi confirmada pelos seis sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 58, p. 92) [ $\delta_{\text{C}}$  23,7 (CH<sub>3</sub>), 66,5 (CH-O), 127,6 (2 HC=), 129,1 (HC=), 132,2 (C=), 133,4 (C=) e 142,0 (C=)].

Figura 54 – Cromatograma (CG/EM) do produto **5a** da biorredução de 2',4'-dicloroacetofenona (**5**) com grãos de *X. americana*

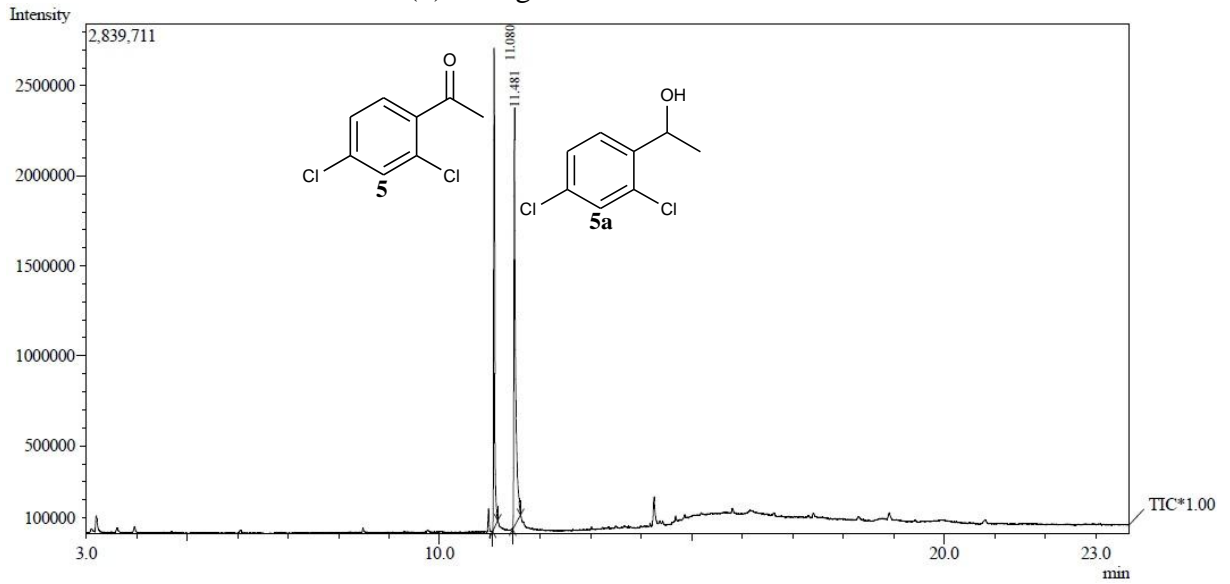


Figura 55 – Espectro de massas de **5**,  $T_R = 11,080$  minutos

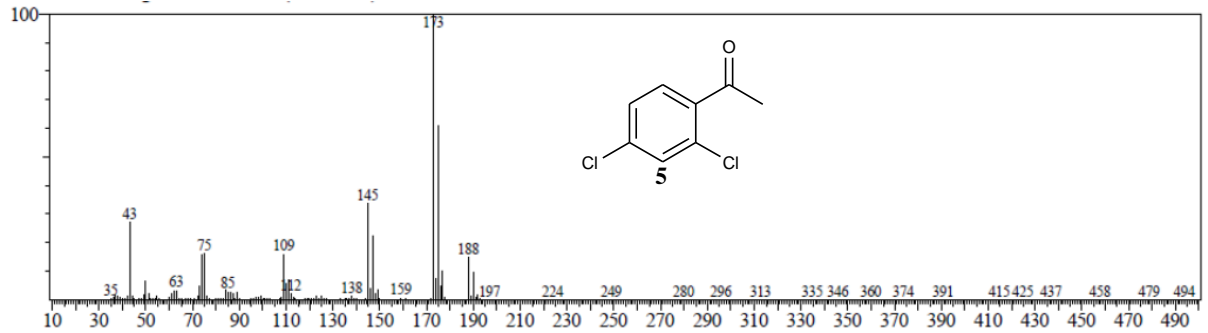


Figura 56 – Espectro de massas de **5a**,  $T_R = 11,481$  minutos

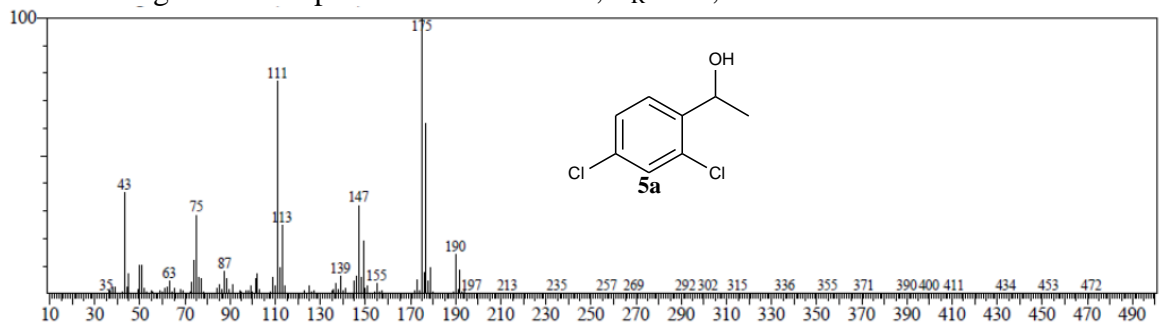


Figura 57 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **5a**

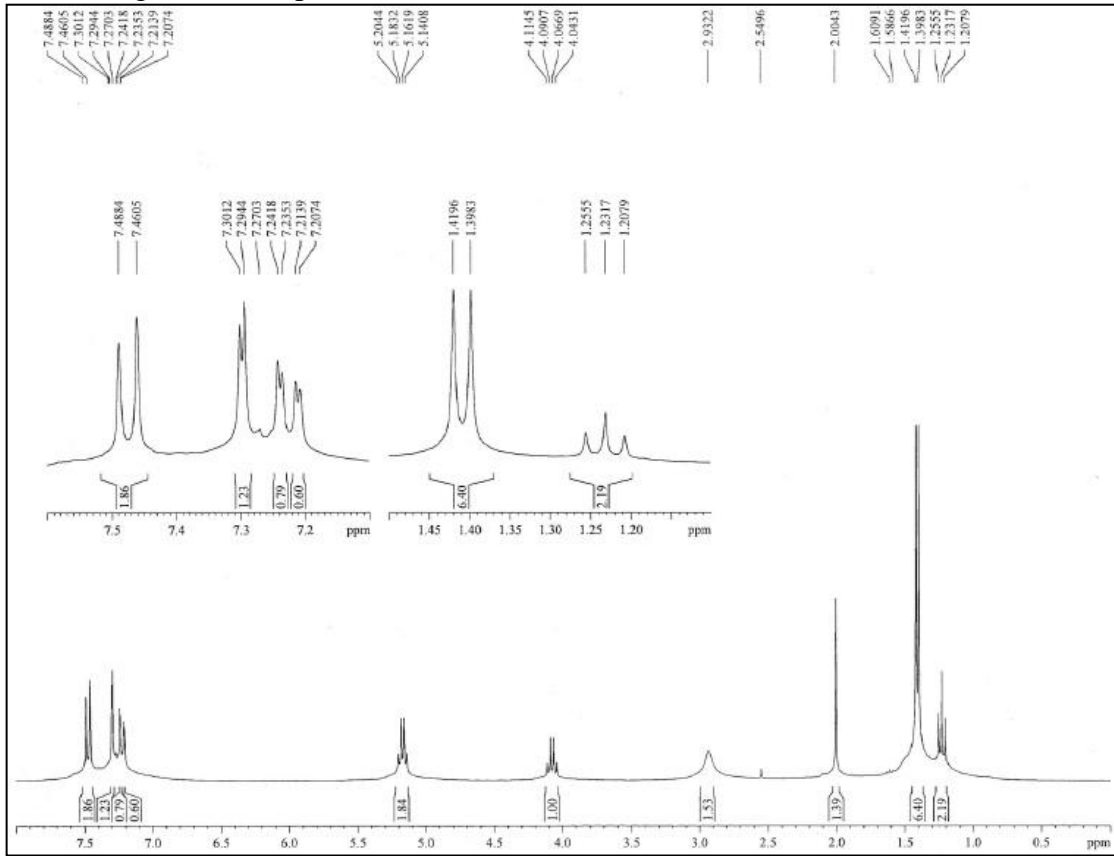
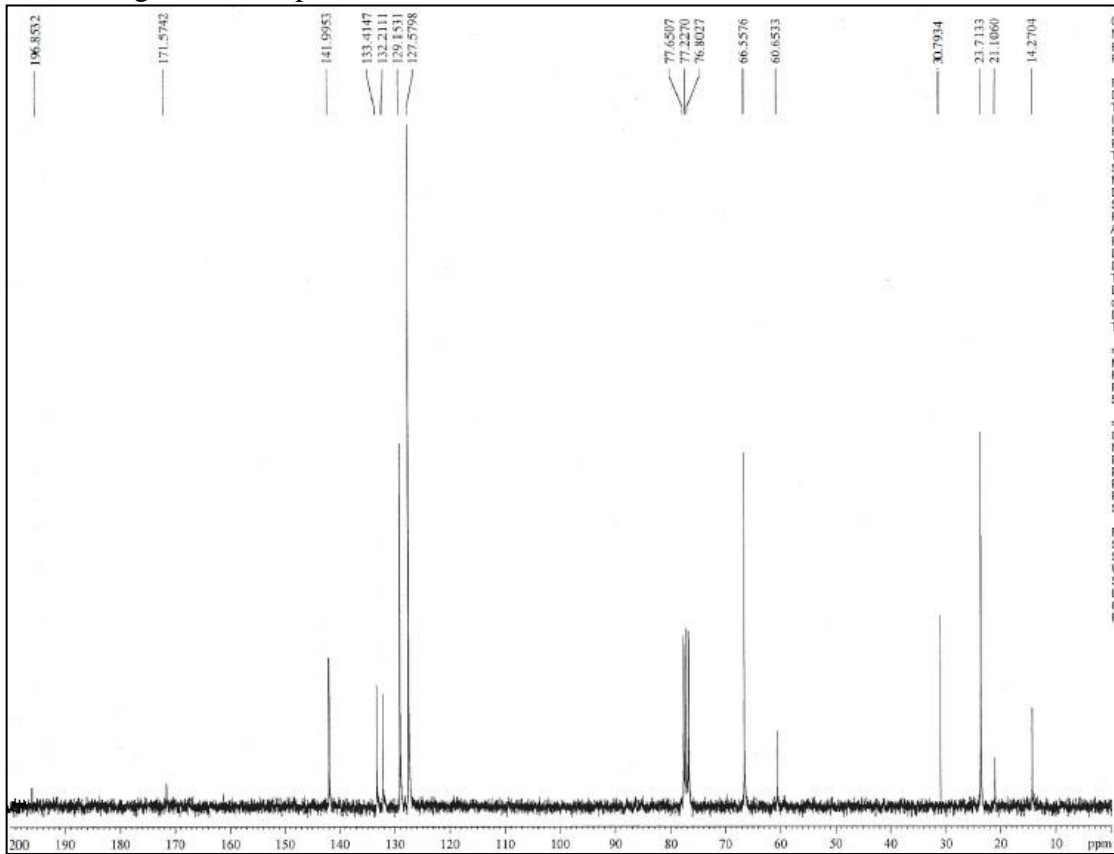
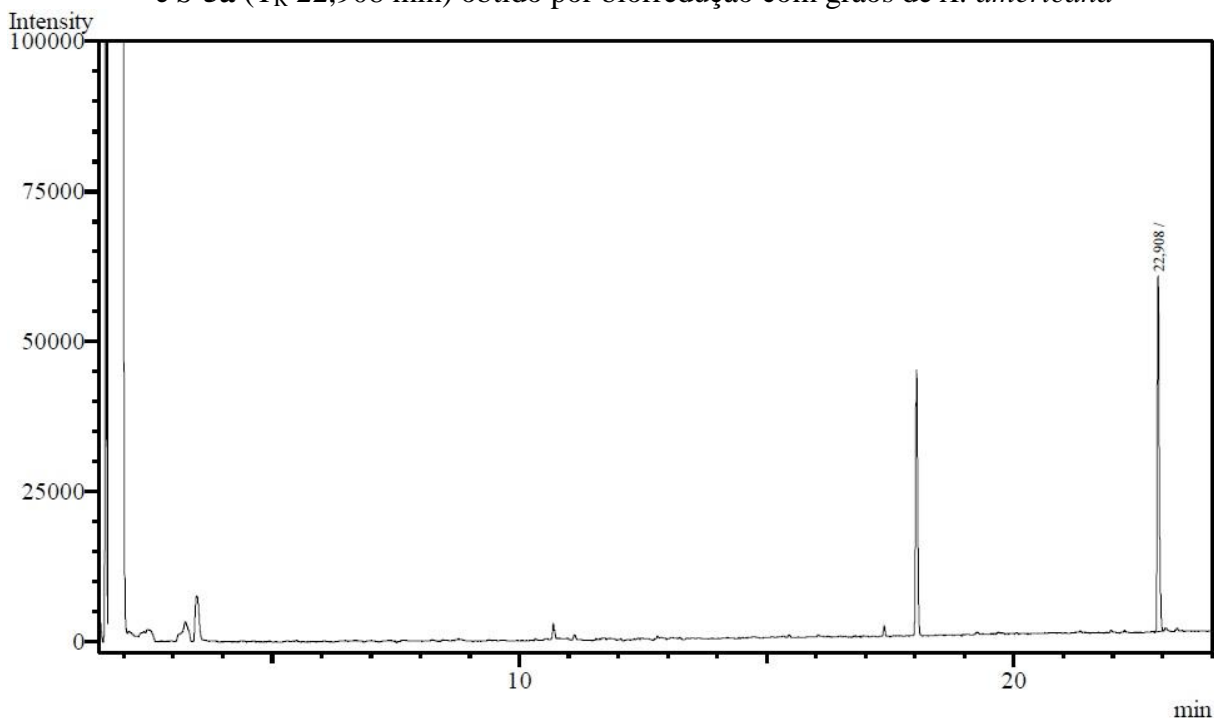


Figura 58 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **5a**



A identificação do isômero *S* com *ee* maior 99% (Tabela 10, p. 78) foi resolvida mediante a comparação dos tempos de retenção em coluna quiral e área dos picos dos alcoóis **5a** (*R,S*) por injeção em CG/DIC (Figura 59) e mostrou-se em acordo com o modelo de Prelog para a biorredução de cetonas pro-quirais (YADAV *et al.*, 2002).

Figura 59 – Cromatograma CG/DIC da mistura dos alcoóis *R*-**5a** ( $T_R$  21,978 min) e *S*-**5a** ( $T_R$  22,908 min) obtido por biorredução com grãos de *X. americana*



Outros derivados da acetofenona (4-bromo-, 3,5-dimetil-, 2-bromo-, 2-hidroxi-, 2,4-dibromo- e 2-amino-acetofenona) não sofreram biorredução nas mesmas condições.

A reação foi estendida as cetonas alifáticas cicloexanona (**6**), octan-2-ona (**7**) e undecan-2-ona (**8**) (Esquema 9, p. 77). No caso de **6**, ocorreu redução com conversão de apenas 14% determinada por CG/EM (Figura 60, p. 94). A formação do álcool **6a** foi detectada inicialmente, pela comparação entre os espectros de massas de **6** (Figura 61, p. 94) e de **6a** (Figura 62, p. 94) com íons moleculares em  $m/z$  98 e 100, respectivamente.. Os sinais nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 63, p. 95) e de  $^{13}\text{C}$  (Figura 64, p. 95) confirmaram a obtenção de **6a**, com destaques para os sinais característicos em  $\delta_{\text{H}}$  3,60 ( $\text{CH-O}$ ) e  $\delta_{\text{C}}$  70,5 ( $\text{HC-O}$ ), nos respectivos espectros.

Figura 60 – Cromatograma (CG/EM) do produto **6a** de biorredução da ciclohexanona (**6**) com grãos de *X. americana*

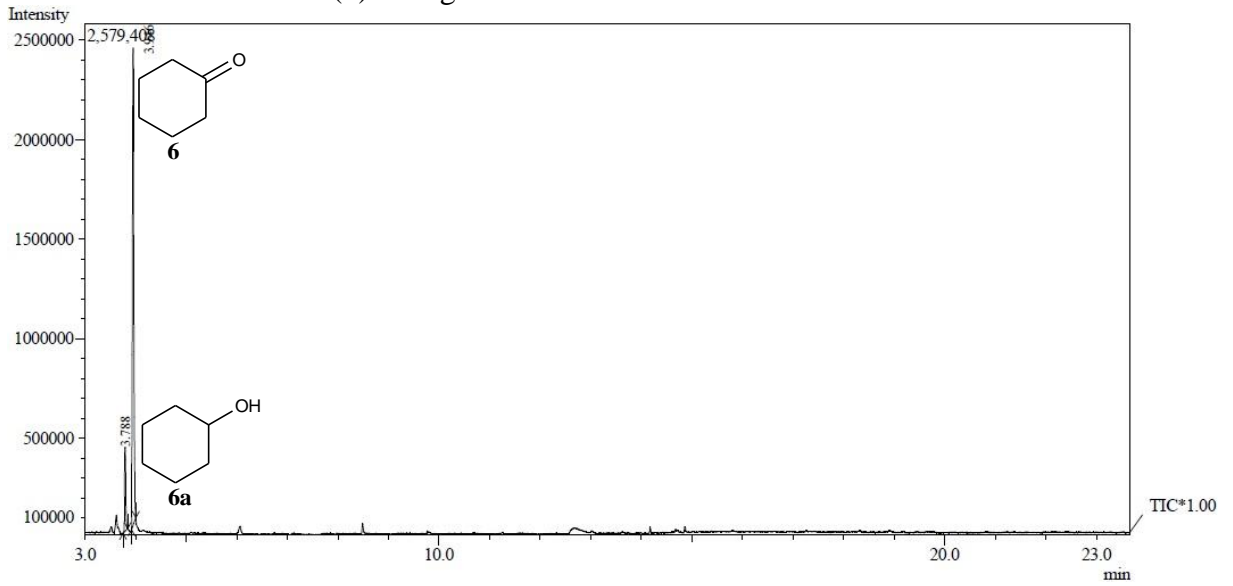


Figura 61 – Espectro de massas de **6**,  $T_R = 3,946$  minutos

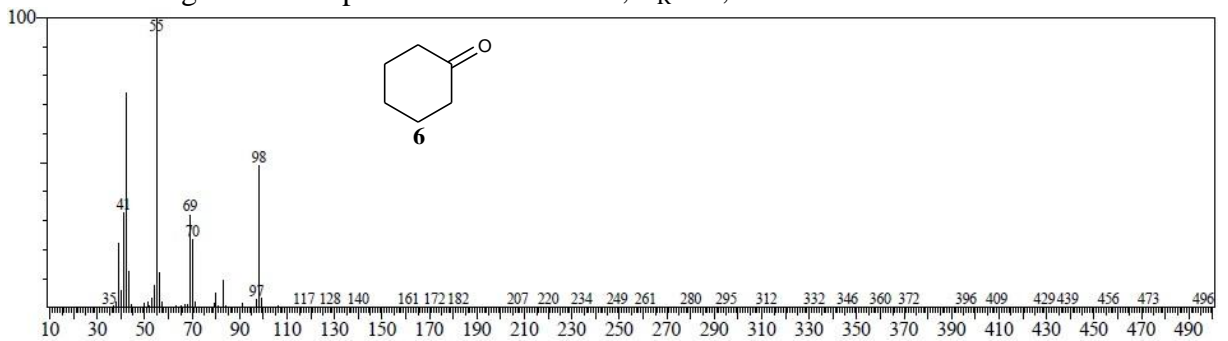


Figura 62 – Espectro de massas de **6a**,  $T_R = 3,788$  minutos

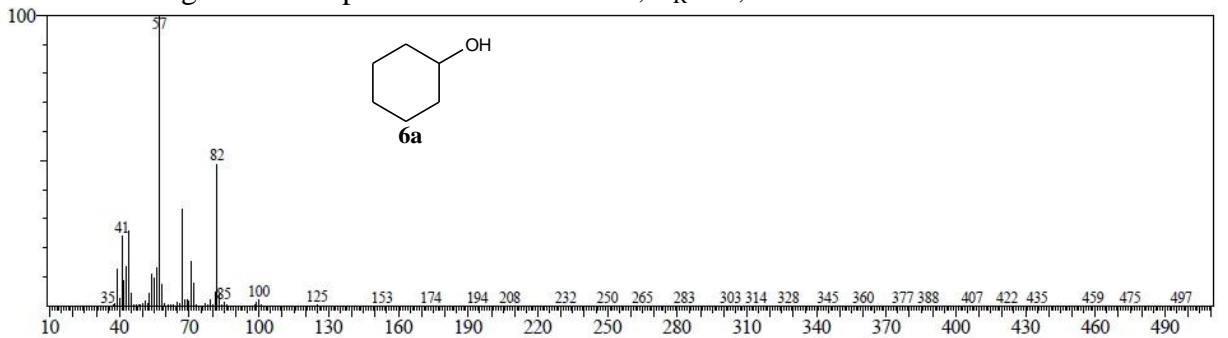


Figura 63 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **6a**

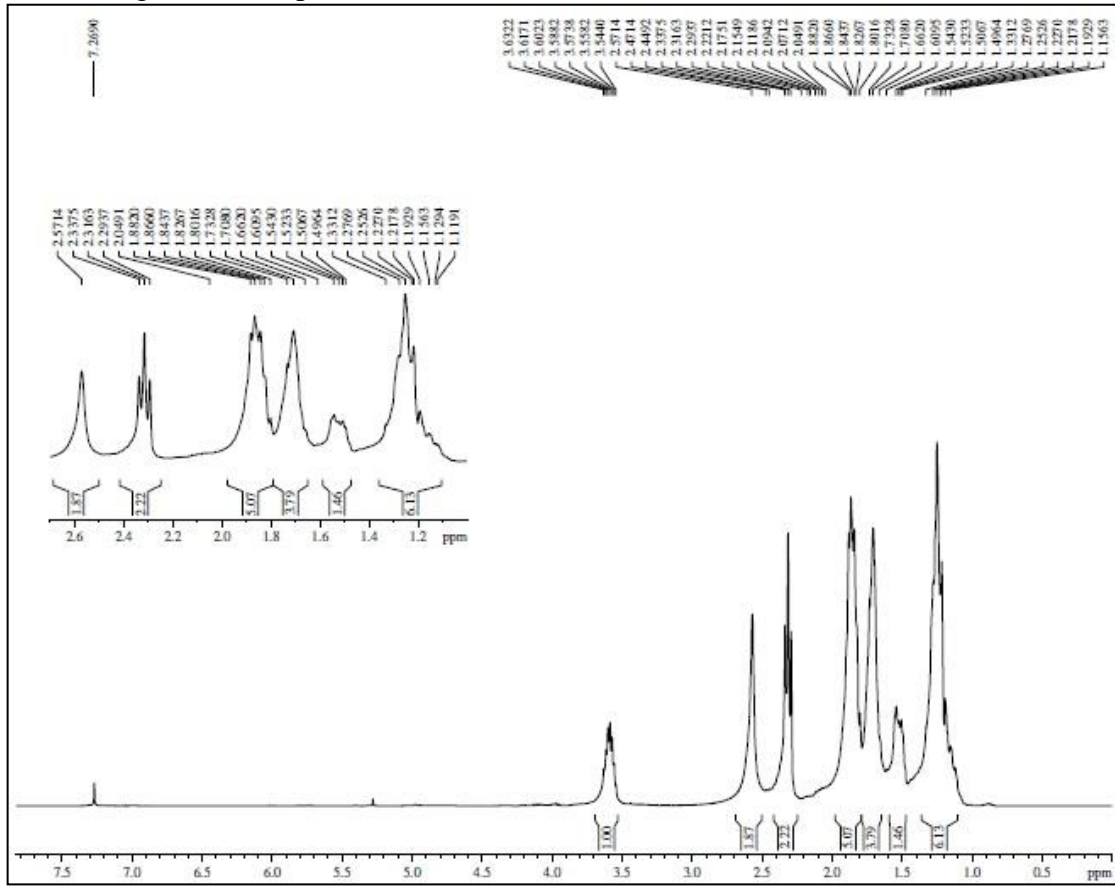
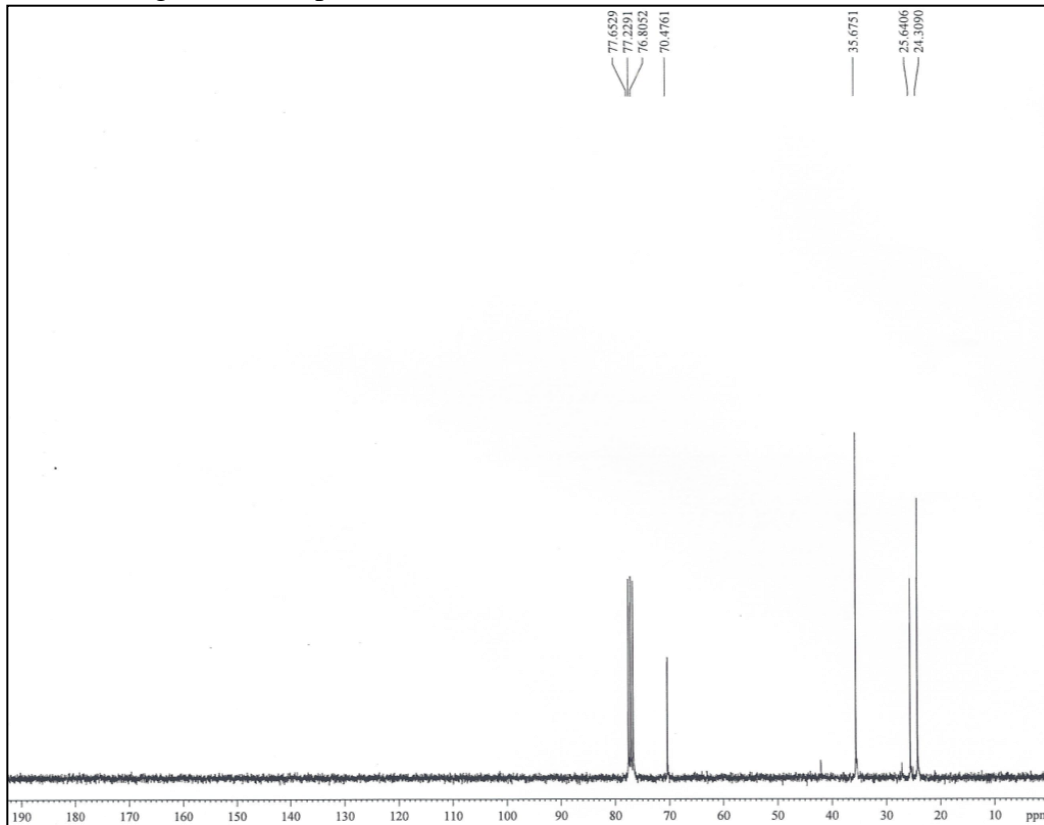


Figura 64 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **6a**





No caso de **7**, ocorreu redução com conversão de 43% determinada por CG/EM (Figura 65). A formação do álcool **7a** foi indicada por seu espectro de massa (Figura 67, p. 97) com íon molecular em  $m/z$  130, enquanto o espectro de massa de **7** (Figura 66) registrou íon molecular em  $m/z$  128. Os sinais nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 68, p. 97) e de  $^{13}\text{C}$  (Figura 69, p. 98) confirmaram a obtenção de **7a**, com destaques para os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  0,87 (t), 3,61 [m, ( $\text{CH-O}$ )] e  $\delta_{\text{C}}$  63,0 ( $\text{CH-O}$ ) devidos aos hidrogênios metílicos e carbinólico e ao carbono  $\text{sp}^3$  oxigenado, respectivamente.

Figura 65 – Cromatograma (CG/EM) do produto **7a** de biorredução da octan-2-ona (**7**) com grãos de *X. americana*

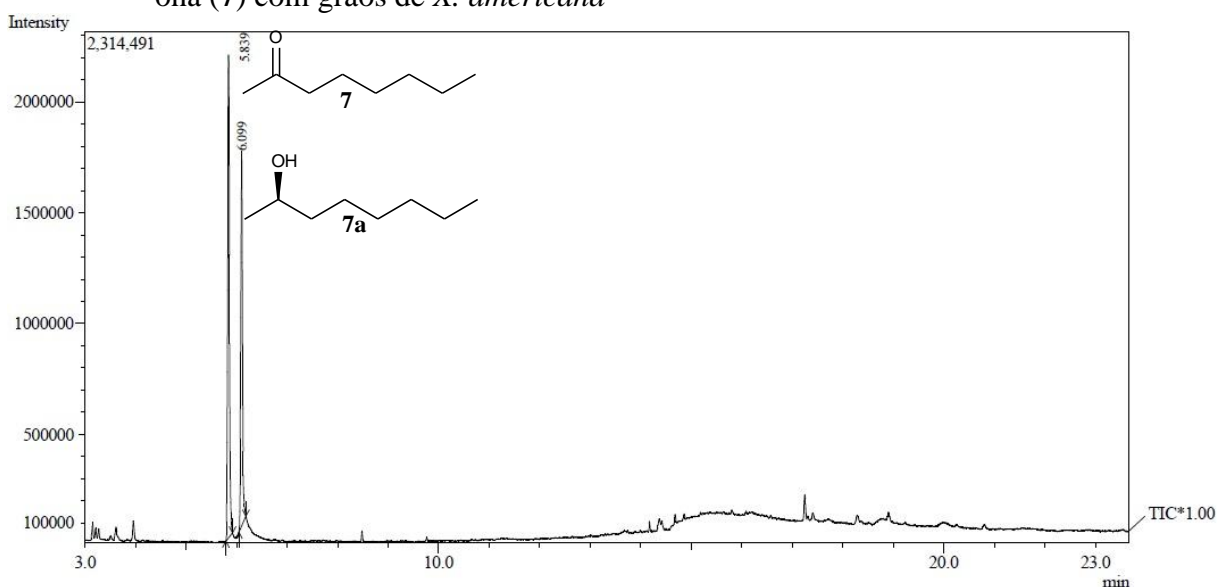


Figura 66 – Espectro de massas de **7**,  $T_{\text{R}} = 5,839$  minutos

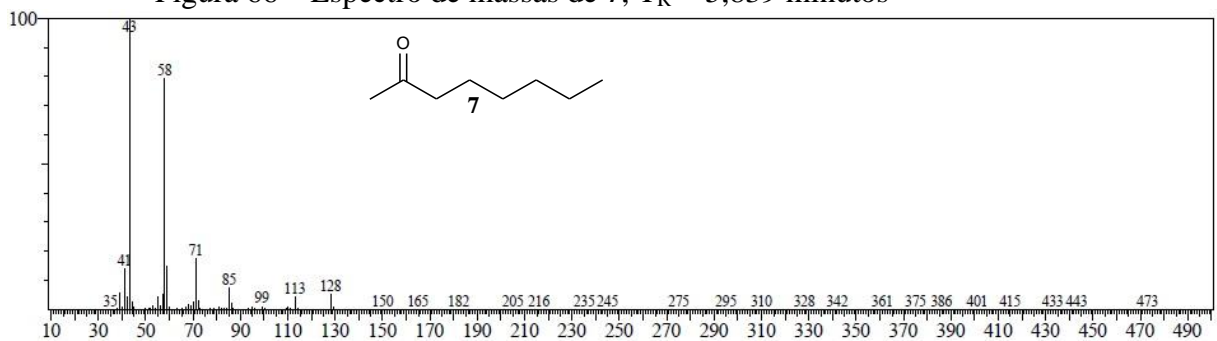


Figura 67 – Espectro de massas de **7a**,  $T_R = 6,099$  minutos

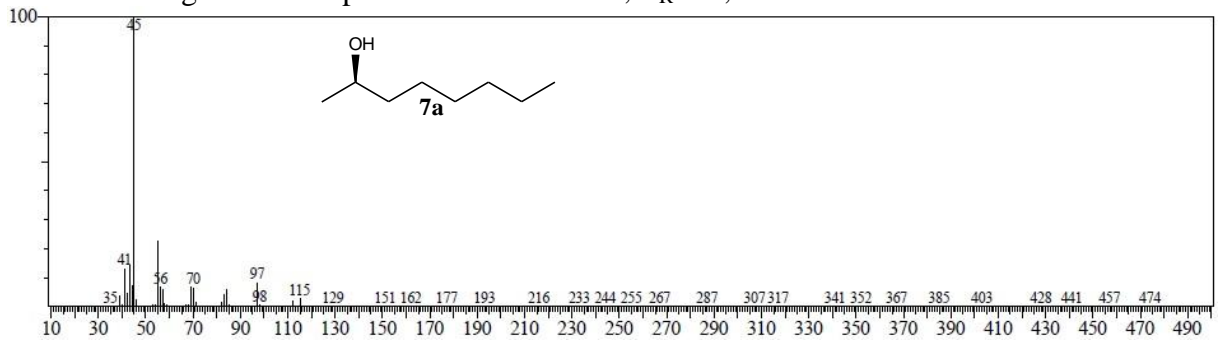


Figura 68 – Espectro de RMN de  $^1H$ , 300 MHz,  $CDCl_3$ , de **7a**

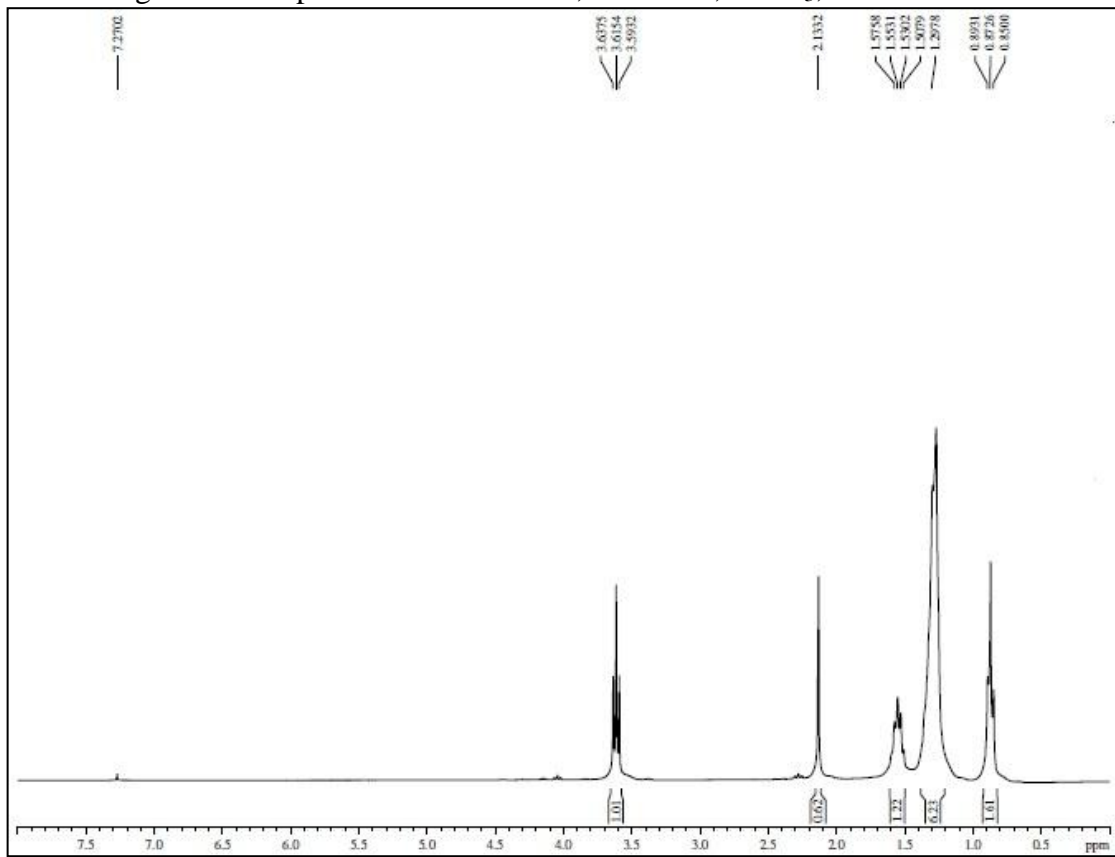
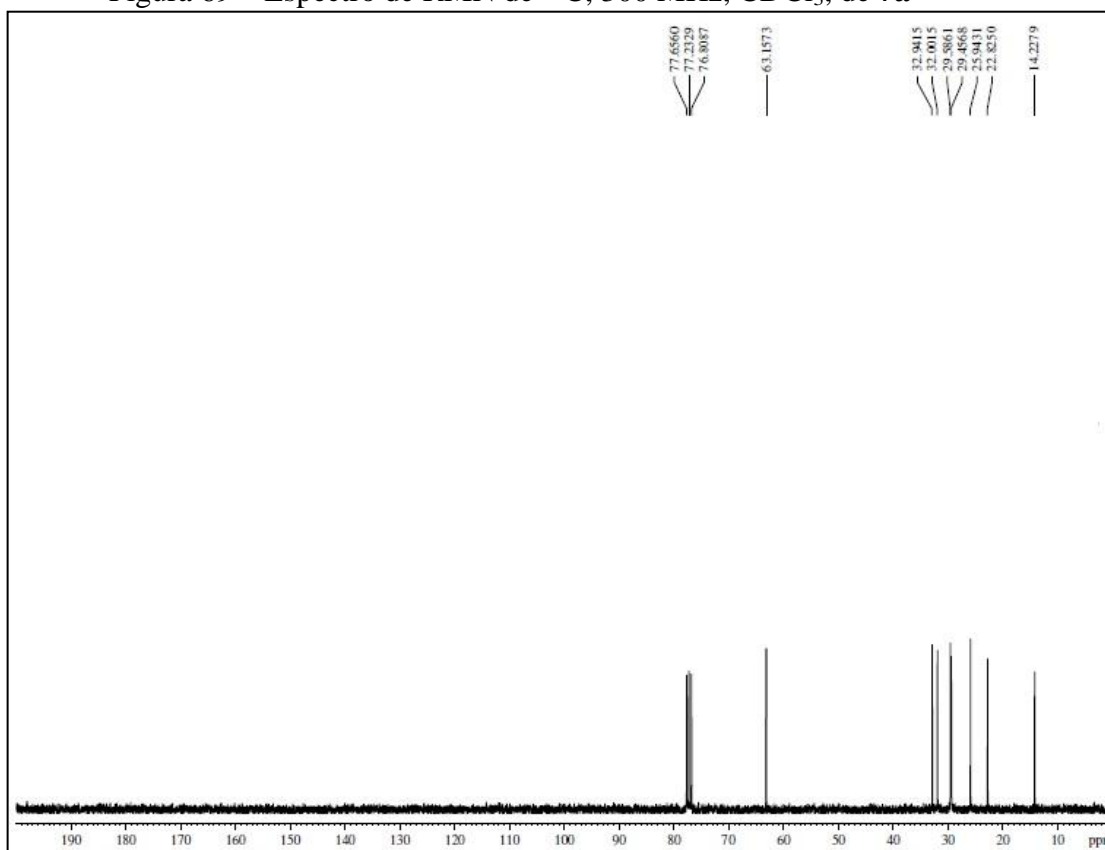
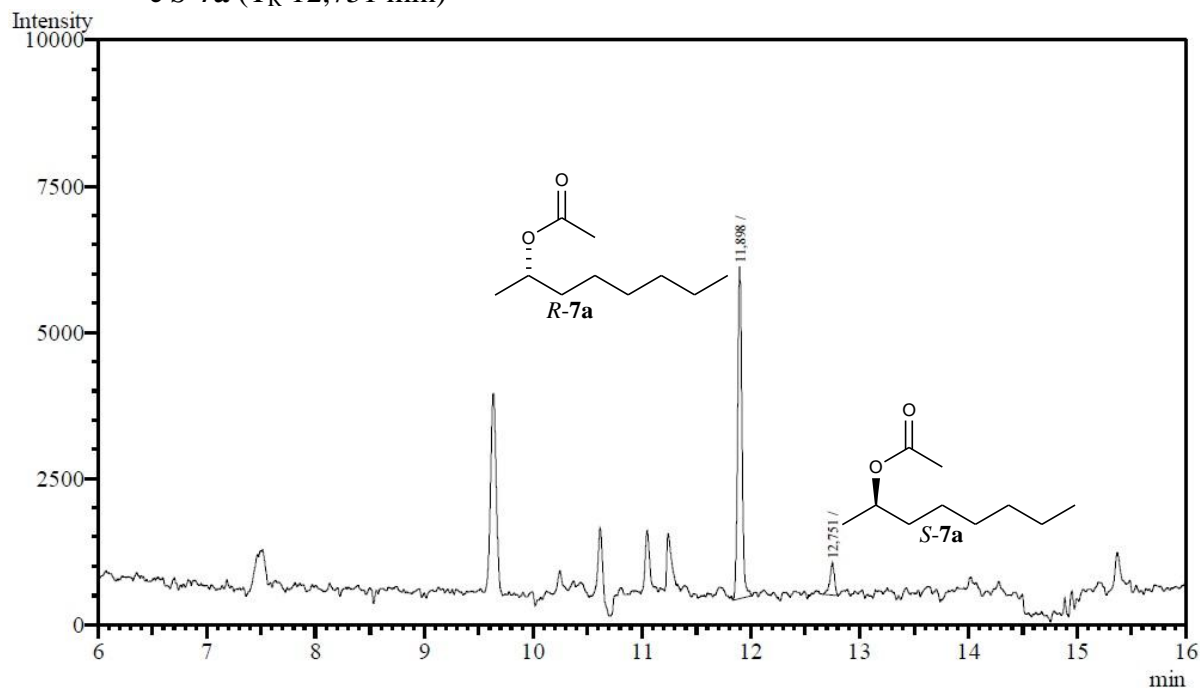


Figura 69 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **7a**



A resolução dos isômeros *R,S* foi obtida mediante a acetilação do produto (**7a**) empregando a mistura anidrido acético/trietilamina/4-dimetilaminopiridina em diclorometano. A identificação do isômero *R* ( $T_R$  11,898 min) com *ee* 81,3% foi efetuada através da comparação dos tempos de retenção em coluna quiral e área dos picos dos acetatos por injeção em CG/DIC (Figura 70, p. 99) e mostrou-se em acordo com o modelo de Prelog para a biorredução de cetonas pro-quirais (YADAV *et al.*, 2002).

Figura 70 – Cromatograma CG/DIC da mistura dos acetatos *R*-7a ( $T_R$  11,898 min) e *S*-7a ( $T_R$  12,751 min)



Para **8**, ocorreu redução com conversão de 29% determinada por CG/EM (Figura 71). A formação do álcool **8a** foi indicada por seu espectro de massa (Figura 73, p. 100) com íon molecular em  $m/z$  172, enquanto o espectro de massa (Figura 72, p. 100) de **8** registrou íon molecular em  $m/z$  170. Os sinais nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 74, p. 100) e de  $^{13}\text{C}$  (Figura 75, p. 101) confirmaram a obtenção de **8a**, com destaques para os sinais característicos em  $\delta_{\text{H}}$  0,82 (t, 3H), 1,11 (d, 3H) e 3,71 [m, 1H, ( $\text{CH-O}$ )] e  $\delta_{\text{C}}$  68,0 ( $\text{HC-O}$ ), nos respectivos espectros.

Figura 71 – Cromatograma (CG/EM) do produto **8a** de biorredução da undecan-2-ona (**8**) com grãos de *X. americana*

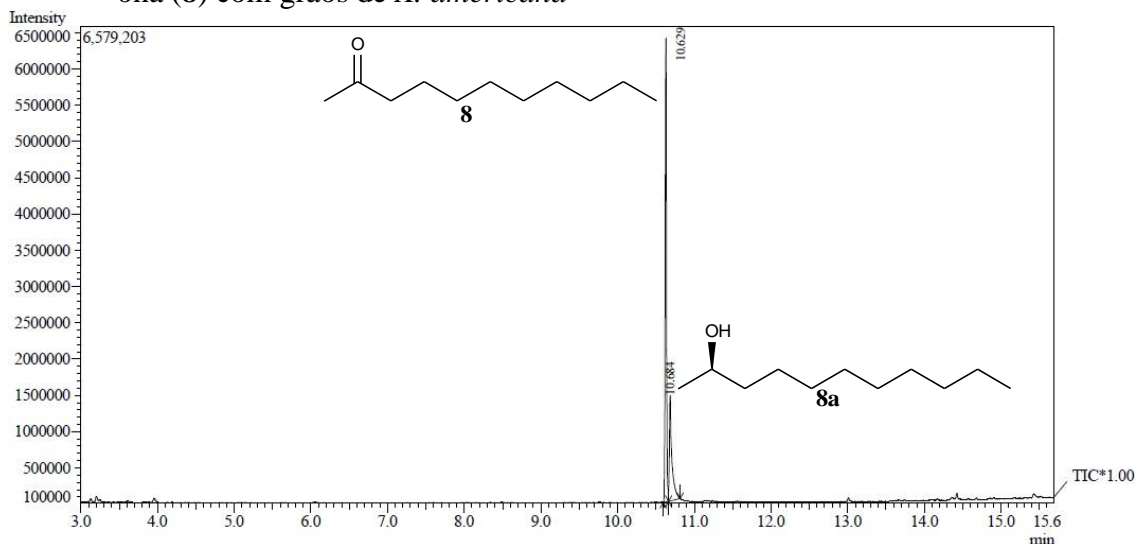


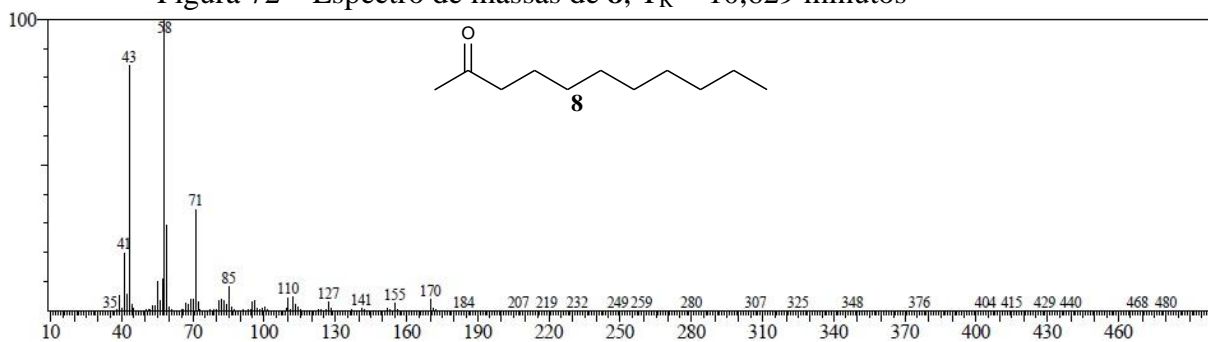
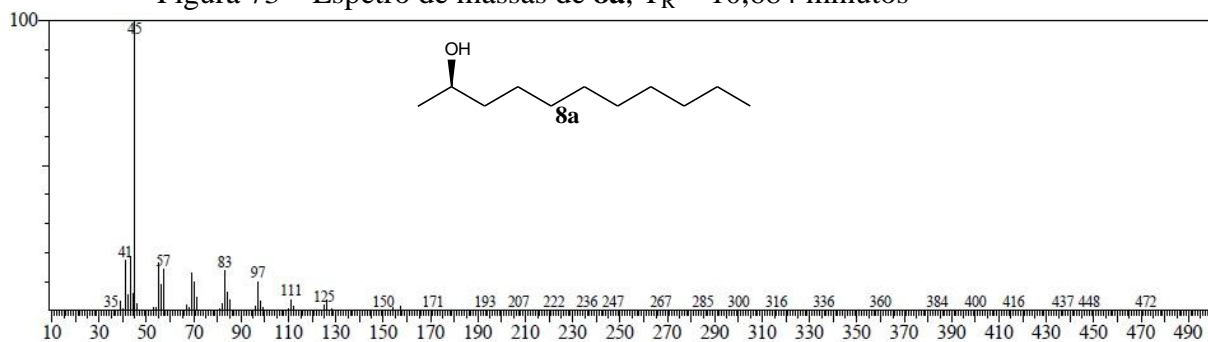
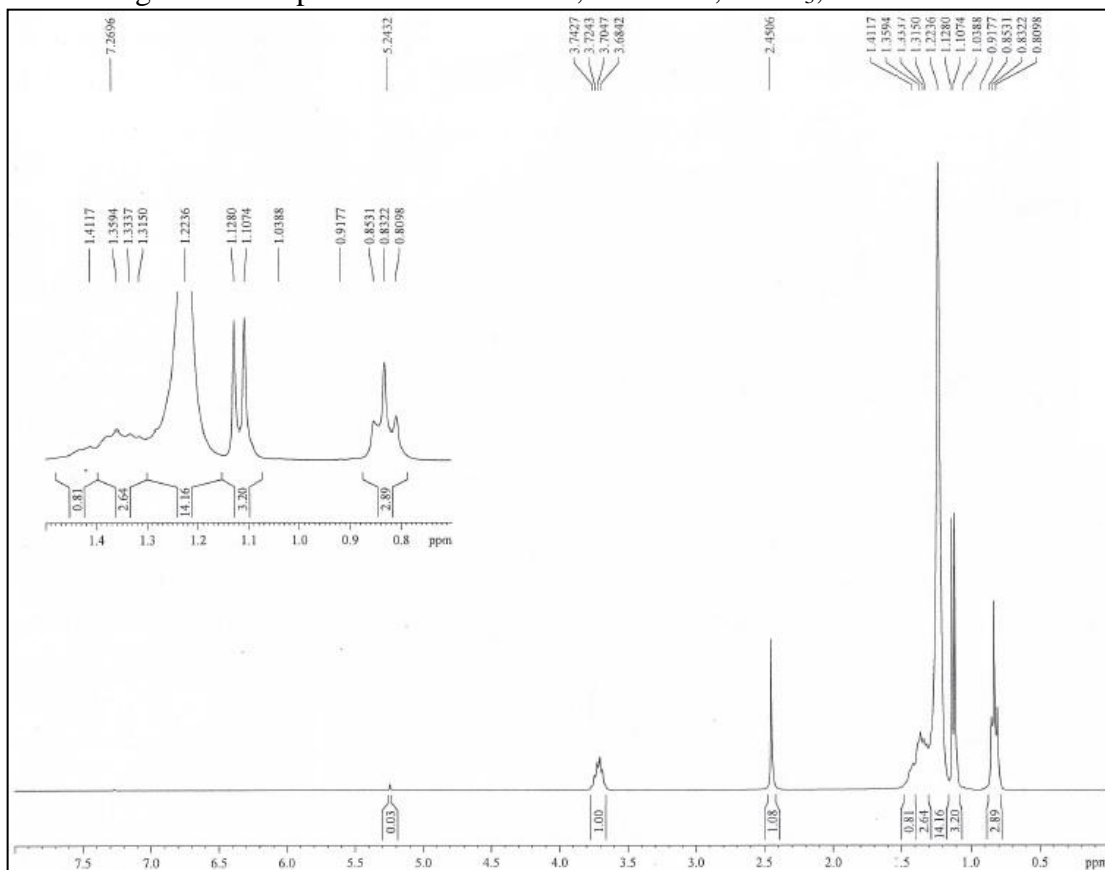
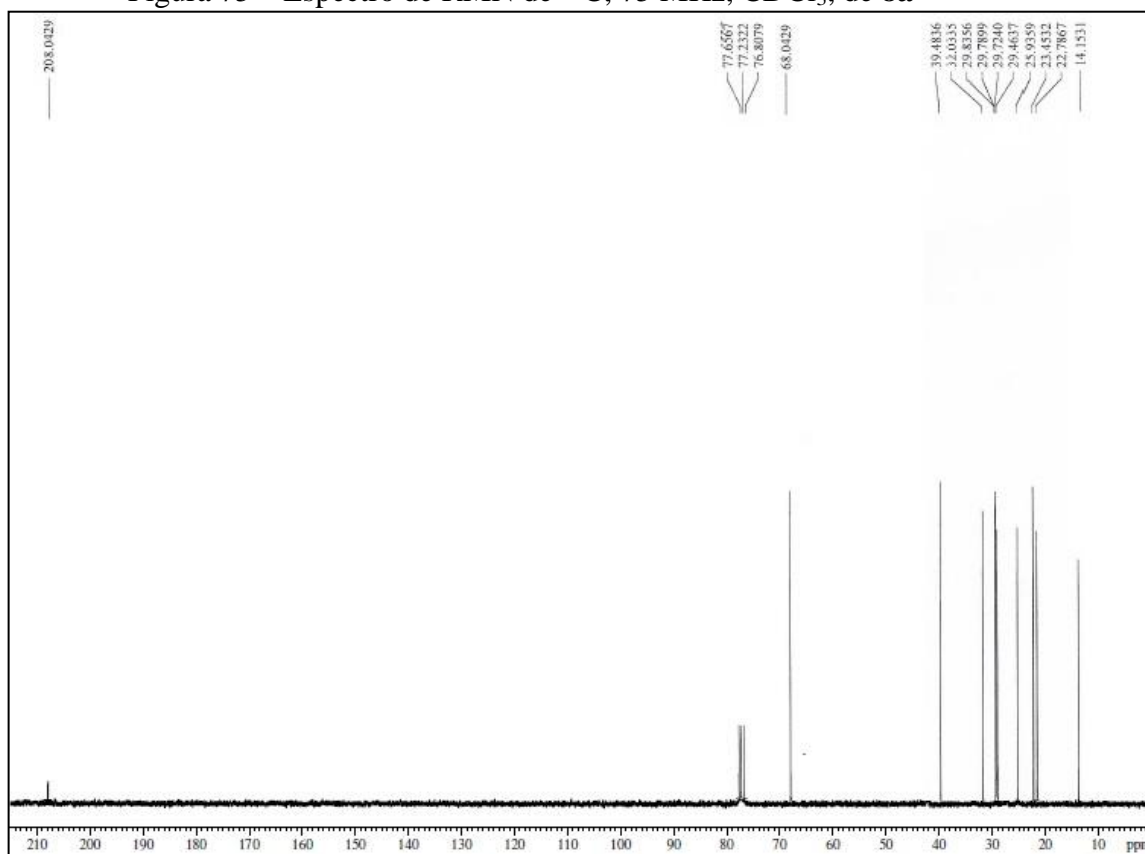
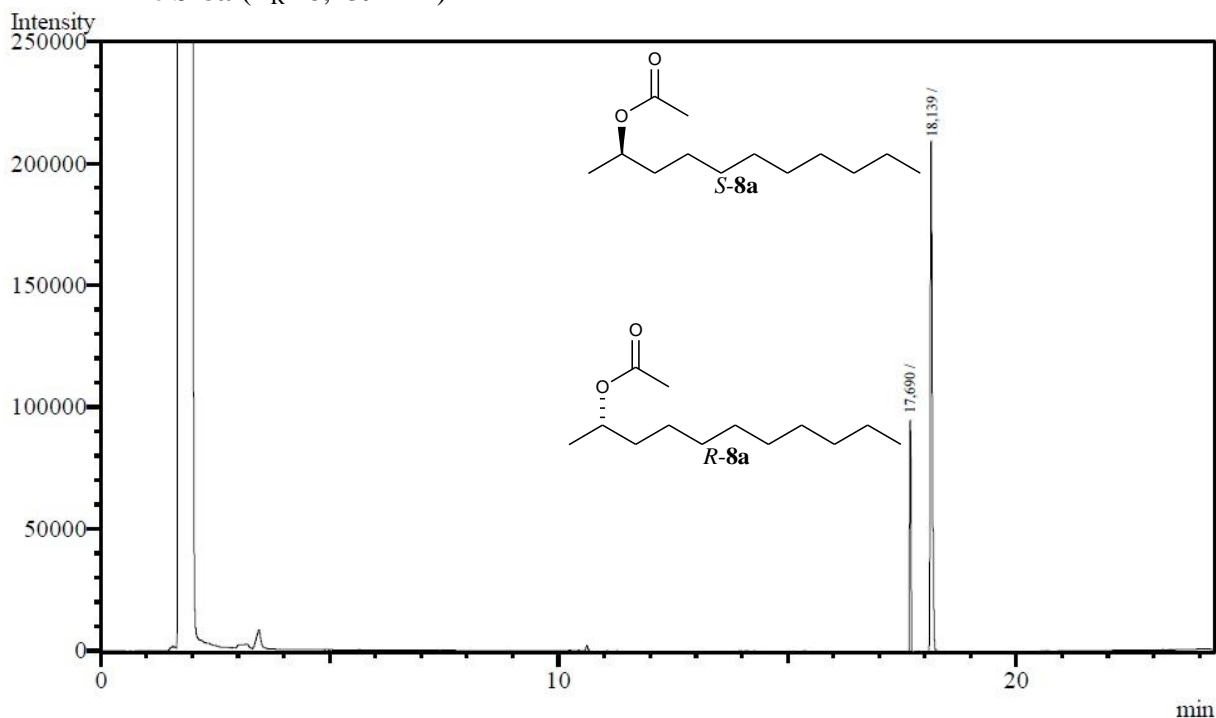
Figura 72 – Espectro de massas de **8**,  $T_R = 10,629$  minutosFigura 73 – Espectro de massas de **8a**,  $T_R = 10,684$  minutosFigura 74 – Espectro de RMN de  $^1H$ , 300 MHz,  $CDCl_3$ , de **8a**

Figura 75 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **8a**

A resolução dos isômeros *R,S* foi obtida mediante a acetilação do produto (**8a**) empregando a mistura anidrido acético/trietilamina/4-dimetilaminopiridina em diclorometano. A identificação do isômero *S* ( $T_R$  18,139 min) com *ee* 35% foi efetuada através da comparação dos tempos de retenção em coluna quiral e área dos picos dos acetatos por injeção em CG/DIC (Figura 76, p. 102) e mostrou-se em acordo com o modelo de Prelog para a biorredução de cetonas pro-quirais (YADAV *et al.*, 2002).

Figura 76 – Cromatograma CG/DIC da mistura dos acetatos *R*-**8a** ( $T_R$  17,690 min) e *S*-**8a** ( $T_R$  18,139 min)



Em resumo, a bioconversão das cetonas ocorreu na faixa de baixo (6%) a bom rendimento (60%). No caso das cetonas de natureza aromática, os excessos enantioméricos foram de médio (48%) a excelente (>99%).

### 6.1.3 Redução de aldeídos

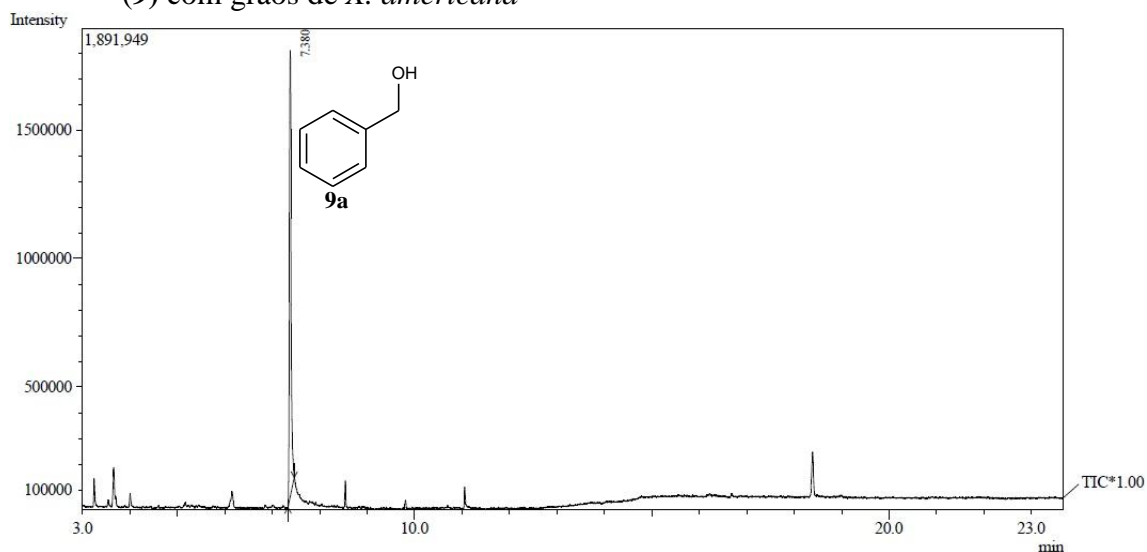
A seguir, foi investigada a possibilidade de utilização dos grãos do vegetal frente a substratos com função aldeído, tendo em conta que, em geral, esses compostos são mais reativos que cetonas. Como nos casos das cetonas, foram testados parâmetros de reação visando obter melhores rendimentos utilizando como substrato padrão o benzaldeído (**9**). A incubação de **9** (50 mg, 0,471 mmol) com grãos frescos de *X. americana* (item 6.2.5) mostrou o melhor resultado com os mesmos valores de parâmetros experimentais utilizados para as cetonas (biocatalisador: 5,0 g; temperatura: 30 °C; velocidade de agitação: 175 rpm; tempo: 72 h), com exceção do meio reacional que foi em pH 7,0, mantido através de uma solução tampão constituída de fosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e fosfato de sódio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). A conversão do aldeído **9** no produto **9a** foi >99% (Tabela 11, p. 103), determinada por GC/EM (Figura 77, p. 103).

Tabela 11 – Percentagens relativas obtidas por CG/EM dos produtos da biorredução de **9–13**

Produtos	<b>9a</b>	<b>10a</b>	<b>11a</b>	<b>12a</b>	<b>13a</b>
Conversão (%)	>99	75	98	51	61

Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 77 – Cromatograma (GC/EM) do produto **9a** de redução do benzaldeído (**9**) com grãos de *X. americana*



A obtenção de **9a** foi detectada, inicialmente, pela comparação entre os espectros de massas de **9** (Figura 78) e de **9a** (Figura 79, p. 104) com íons moleculares em  $m/z$  106 e 108, respectivamente. Por sua vez, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 80, p. 104) de **9a** registrou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  4,66 (s, 2H) e 7,3 (s, 5H), devidos aos átomos de hidrogênios hidroximetilênicos e aromáticos, respectivamente, compatíveis com **9a**. Esta análise foi confirmada pelos sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 81, p. 105) [ $\delta_{\text{C}}$  65,4 ( $\text{H}_2\text{C-OH}$ ), 127,1 (2  $\text{HC=}$ ), 127,5 ( $\text{HC=}$ ), 128,7 (2  $\text{HC=}$ ) e 141,0 ( $\text{C=}$ )], inclusive, com registro do sinal em  $\delta_{\text{C}}$  65,4, negativo no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT 135° (Figura 82, p. 105).

Figura 78 – Espectro de massas de **9**,  $T_{\text{R}} = 5,356$  minutos

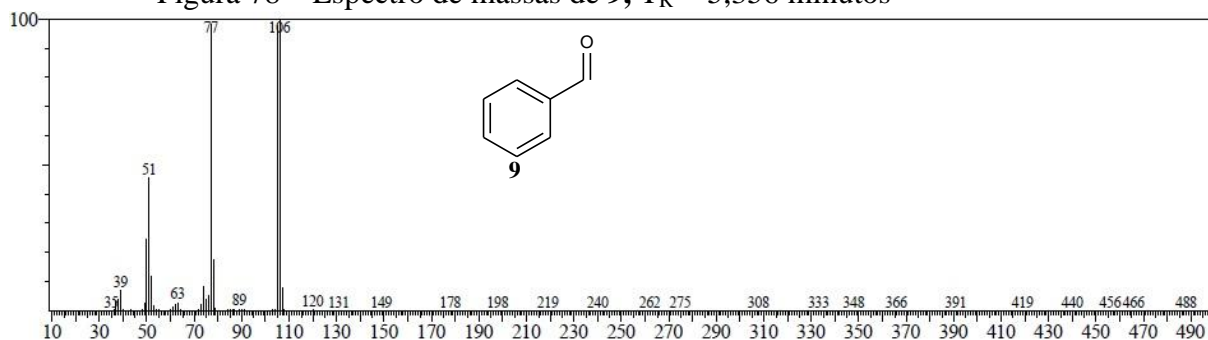




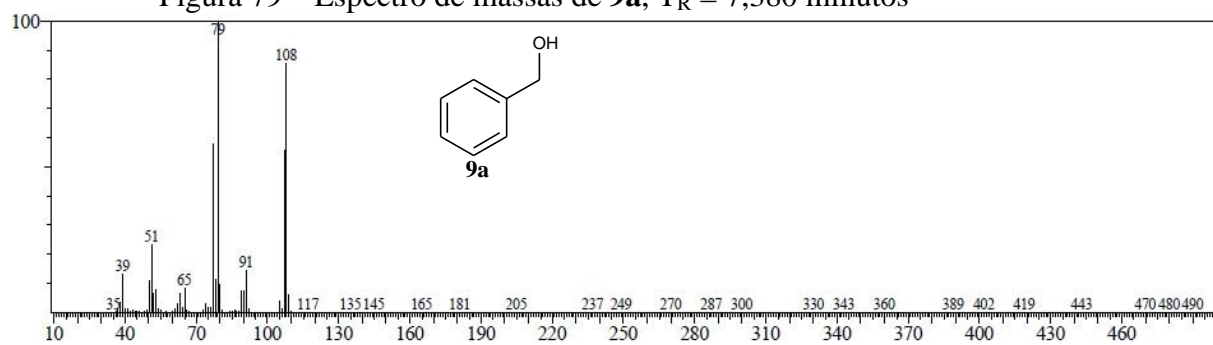
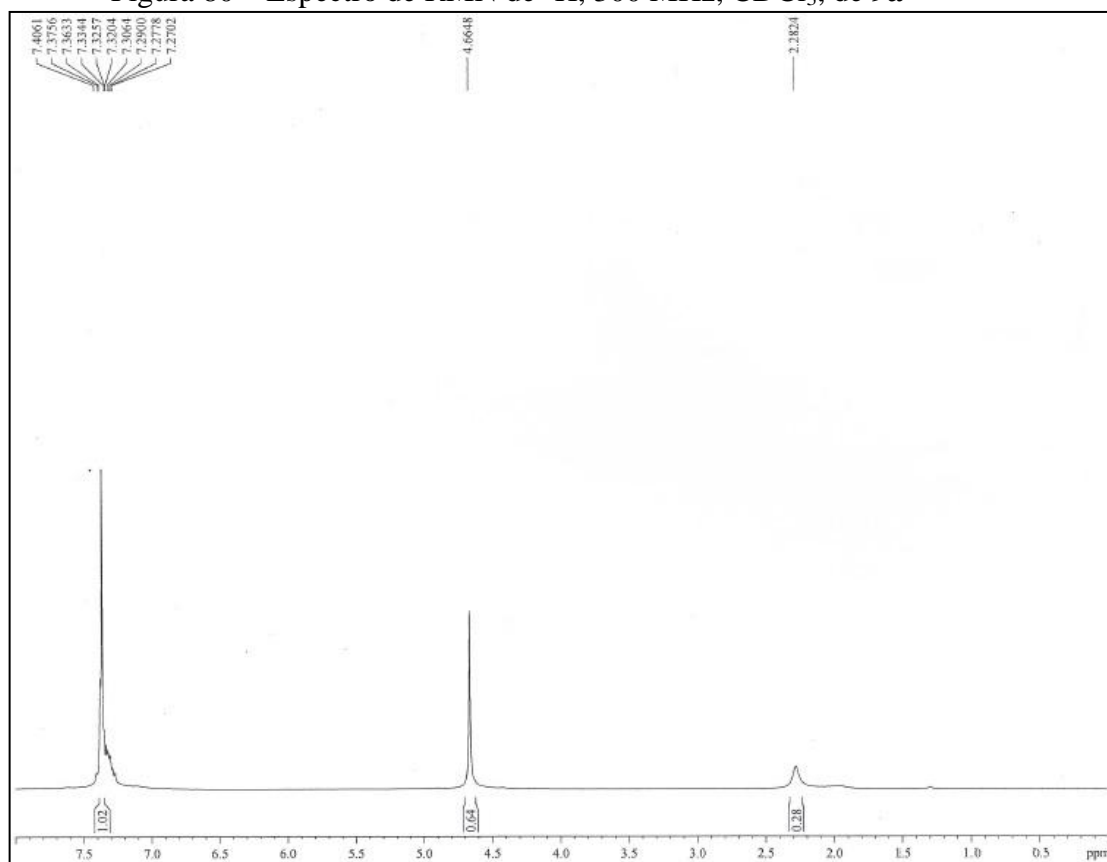
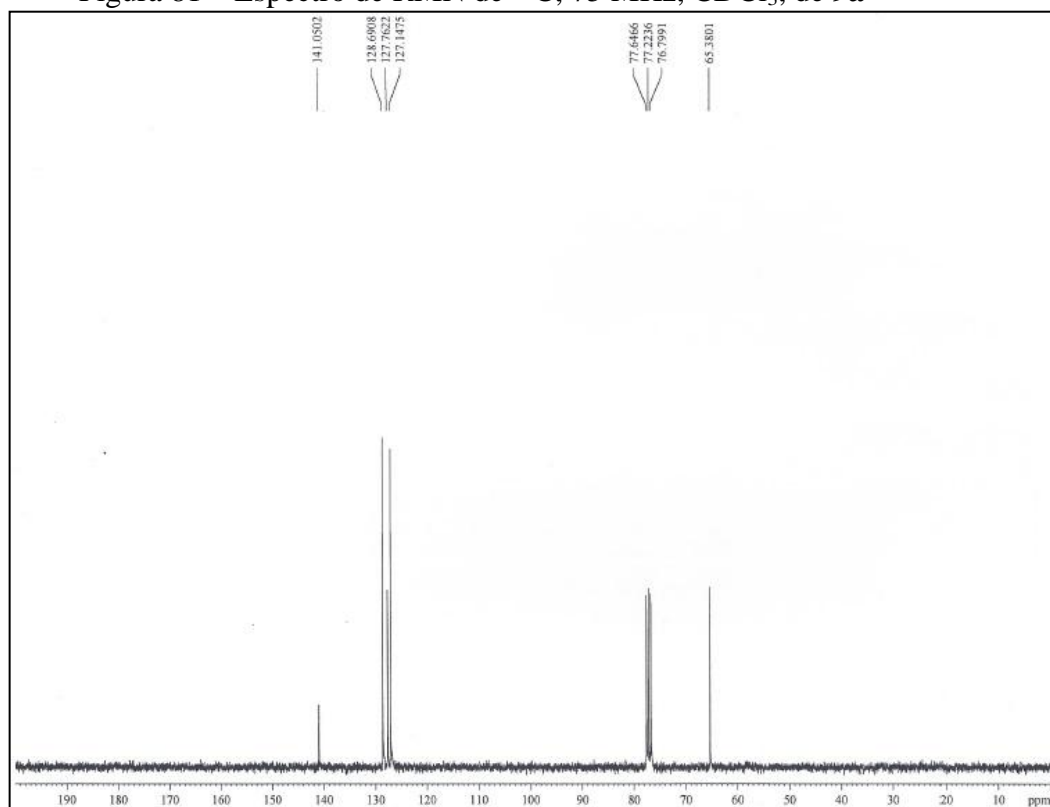
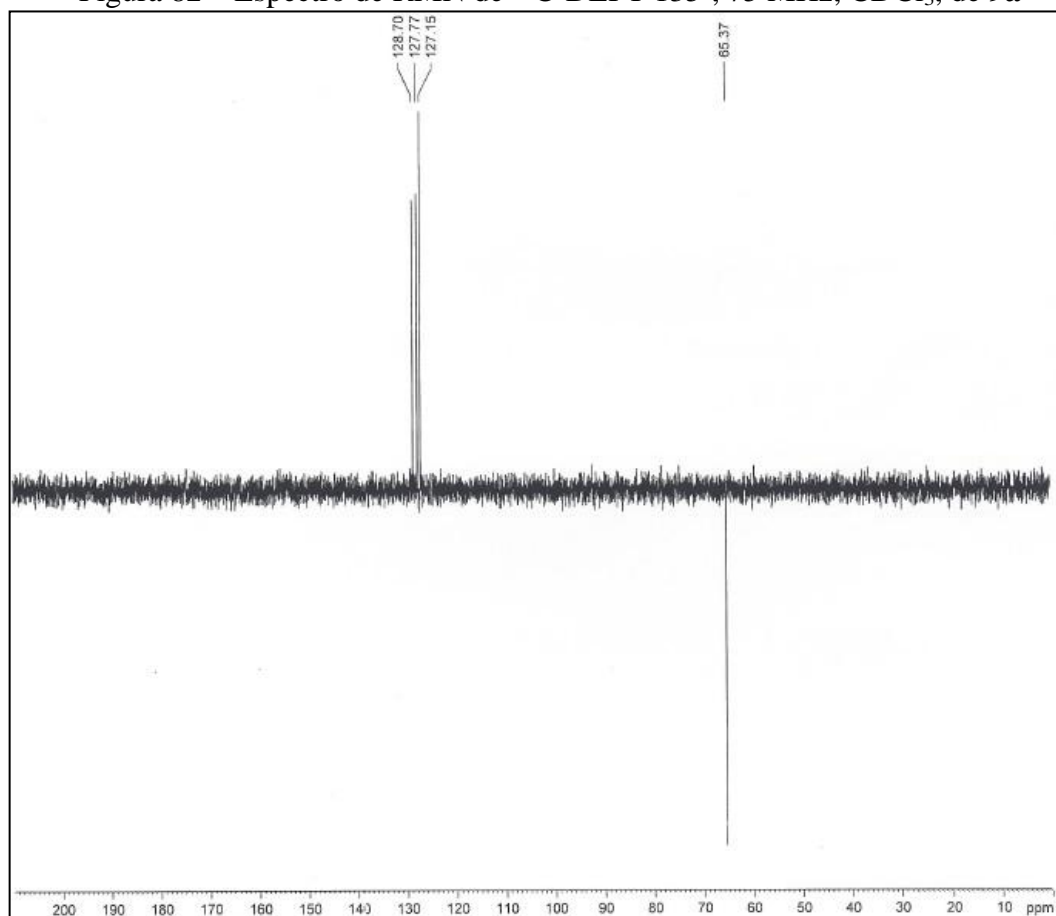
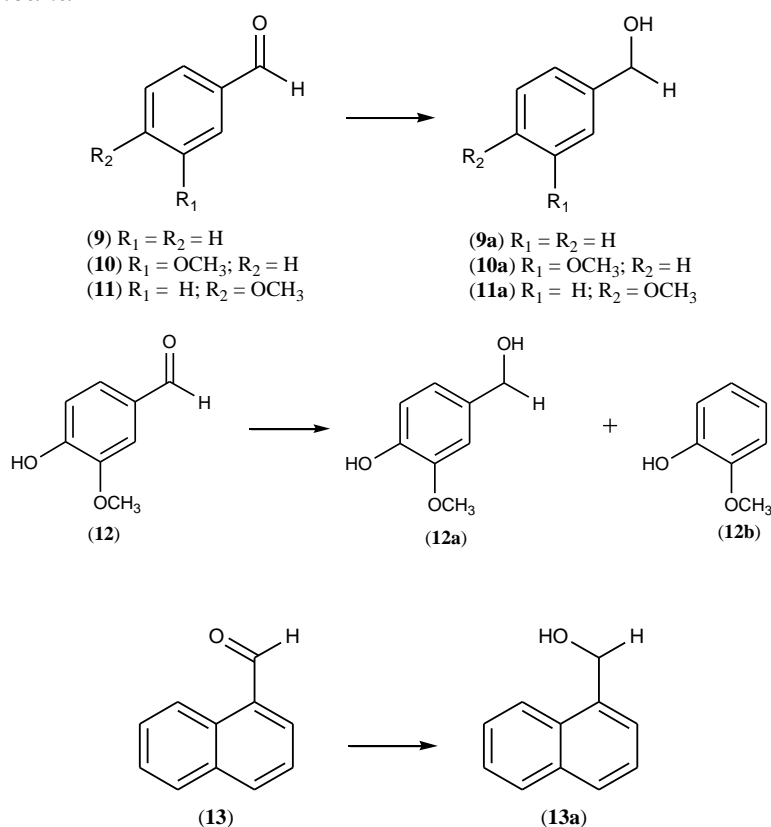
Figura 79 – Espectro de massas de **9a**,  $T_R = 7,380$  minutosFigura 80 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **9a**

Figura 81 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **9a**Figura 82 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135°, 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **9a**

Os mesmos procedimentos analíticos foram utilizados para a análise dos produtos resultantes da redução de outros aldeídos. As demais reações de biorredução (Esquema 10) ocorreram utilizando os mesmos parâmetros de reação descritos para a biorredução de **9**. Assim, com base nos resultados acima, em experimentos separados, os aldeídos aromáticos 3-metoxibenzaldeído (**10**), 4-metoxibenzaldeído (**11**), 3-hidróxi-4-metoxibenzaldeído (vanilina) (**12**) e 1-naftaldeído (**13**) foram incubados com os grãos frescos de *X. americana*. As misturas reacionais brutas foram submetidas a cromatografia em coluna de gel de sílica, acompanhadas através de CCD (eluente Hexano-AcOEt 7:3) e visualizadas utilizando solução de vanilina/ácido perclórico/EtOH. Os produtos foram quantificados por CG/EM e analisados também através de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ .

Esquema 10 – Reações de biorredução de aldeídos catalisadas pelos grãos de *X. americana*



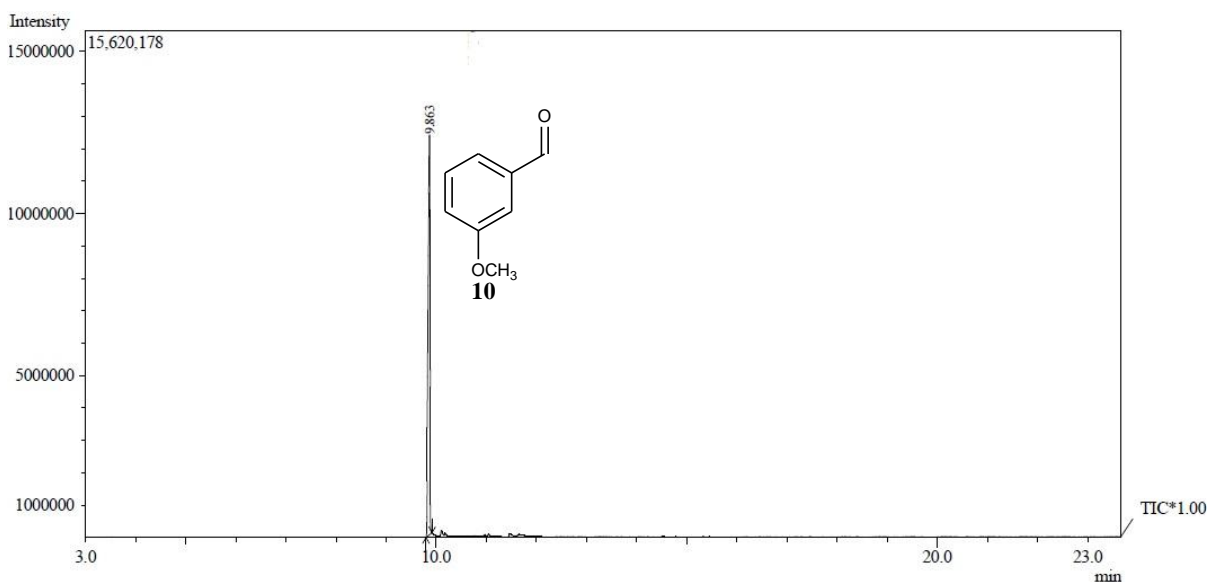
Fonte: elaborada pelo autor.

Conforme esperado, os aldeídos foram mais reativos que as cetonas, entretanto, a presença de grupos metoxila nas posições *meta* (composto **10**) e *para* (composto **11**) causou influencia no processo de redução relativamente ao substrato **1**. Em ambos os casos, além dos respectivos alcoóis **10a** (75%) e **11a** (98%), inesperadamente, foram detectados os ácidos

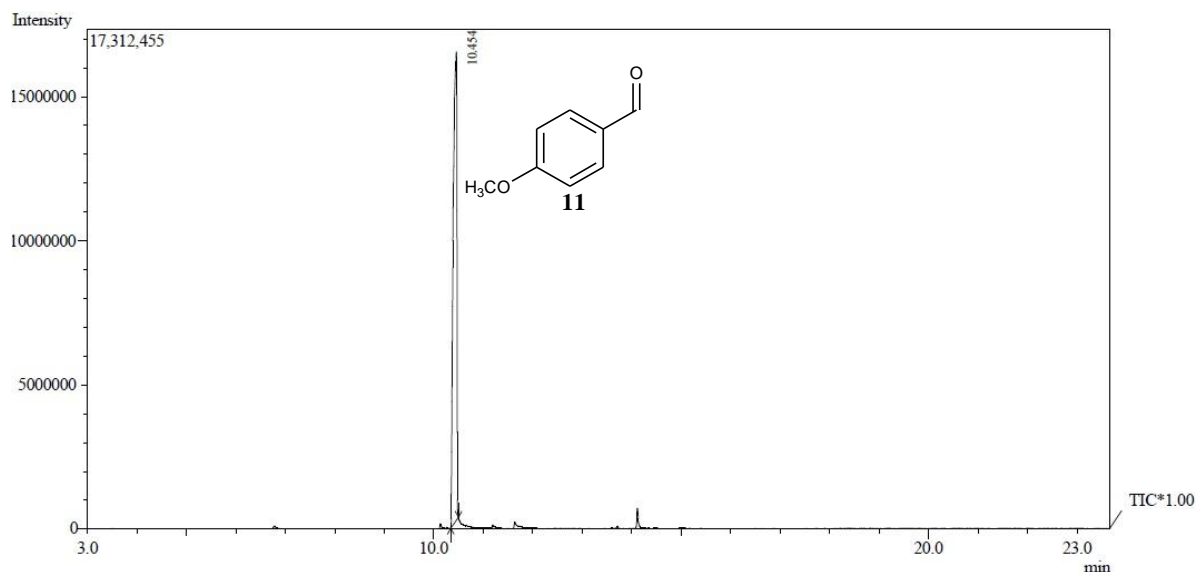
carboxílicos **10b** (25%) e **11b** (1%). Comportamento semelhante foi observado na reação do aldeído cinâmico por ação de *S. officinarum* (ASSUNÇÃO, 2008). Já, no caso do composto **12**, com o grupo metoxila e um grupo hidroxila nas posições *meta* e *para*, respectivamente, o rendimento na produção do álcool **12a** foi de apenas 51%. Neste último caso, foi revelada a presença do composto **12b** (49%). Possivelmente, **12b** foi originado pela descarboxilação do ácido 3-MeO-4-OH-benzoico formado, por sua vez, via oxidação como nos casos mencionados acima. A relativa baixa percentagem (51%) de **12a** poderia ser explicada, em parte, pela influência de um grupo doador de elétrons no anel benzeno diminuindo a eletrofilicidade (reatividade) da carbonila do aldeído (**12**).

É importante ressaltar que, os substratos **10**, **11** e **12**, conforme os respectivos cromatogramas (Figura 83) não revelaram a presença de ácidos carboxílicos resultantes de possível auto-oxidação dos correspondentes aldeídos. Finalmente, embora o 1-naftaldeído (**13**) tenha sido reduzido ao álcool **13a** em 61%, nenhum outro produto foi detectado por espectrometria de massa.

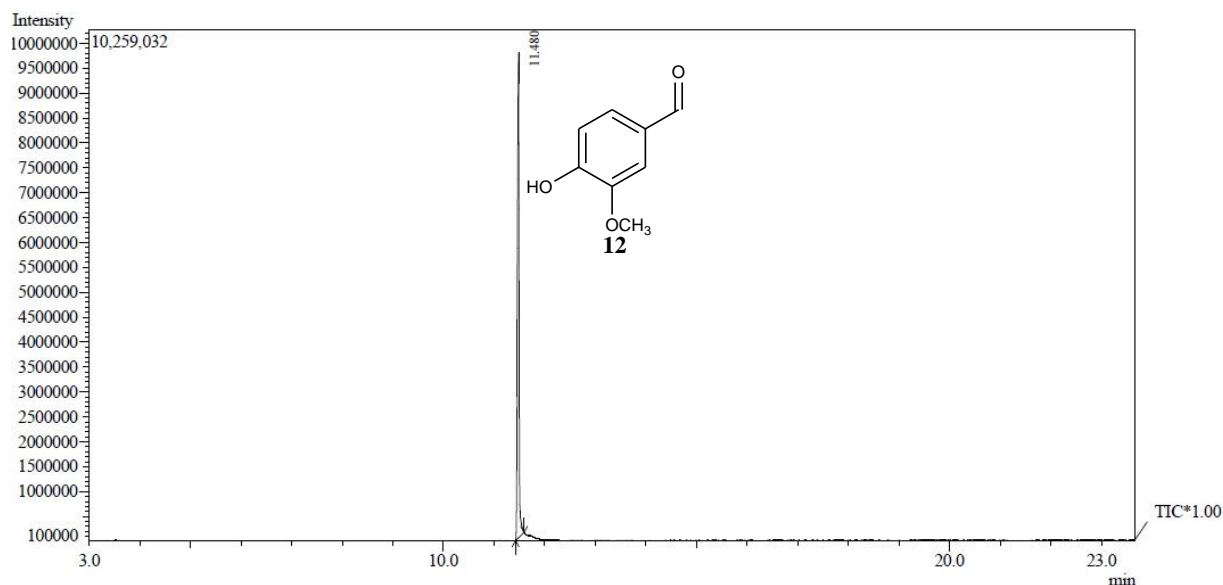
Figura 83 – Cromatograma (GC/EM) dos aldeídos **10** (a), **11** (b) e **12** (c)  
(a) 3-metoxibenzaldeído



## (b) 4-metoxibenzaldeído



## (c) 4-hidróxi-3-metoxibenzaldeído



A obtenção de **10a** foi detectada pelo pico com tempo de retenção 10,621 minutos no cromatograma (Figura 84, p. 109) e pela comparação entre os espectros de massas de **10** (Figura 85, p. 109), de **10a** (Figura 86, p. 109) e de **10b** (Figura 87, p. 110) com íons moleculares em  $m/z$  136, 138 e 152, respectivamente. Por sua vez, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 88, p. 110) de **10a** registrou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  3,81 [(s, 3H (CH<sub>3</sub>O)], 4,65 [s, 2H (CH<sub>2</sub>O)] e 6,82–7,30 (m, 5H aromáticos)], compatíveis com **10a**. Esta análise foi confirmada pelos oito sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 89, p. 111) [ $\delta_{\text{C}}$  55,4 (H<sub>3</sub>CO), 65,4 (CH<sub>2</sub>O), 112,4 (=CH), 113,4 (=CH), 119,3 (=CH) e 129,8 (=CH), 142,7 (=C) e 160,0 (=C-O), inclusive, com

o registro do sinal em  $\delta_C$  65,4 negativo no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT 135° (Figura 90, p. 111).

Figura 84 – Cromatograma (GC/EM) do produto **10a** de redução do 3-metoxibenzaldeído (**10**) com grãos de *X. americana*

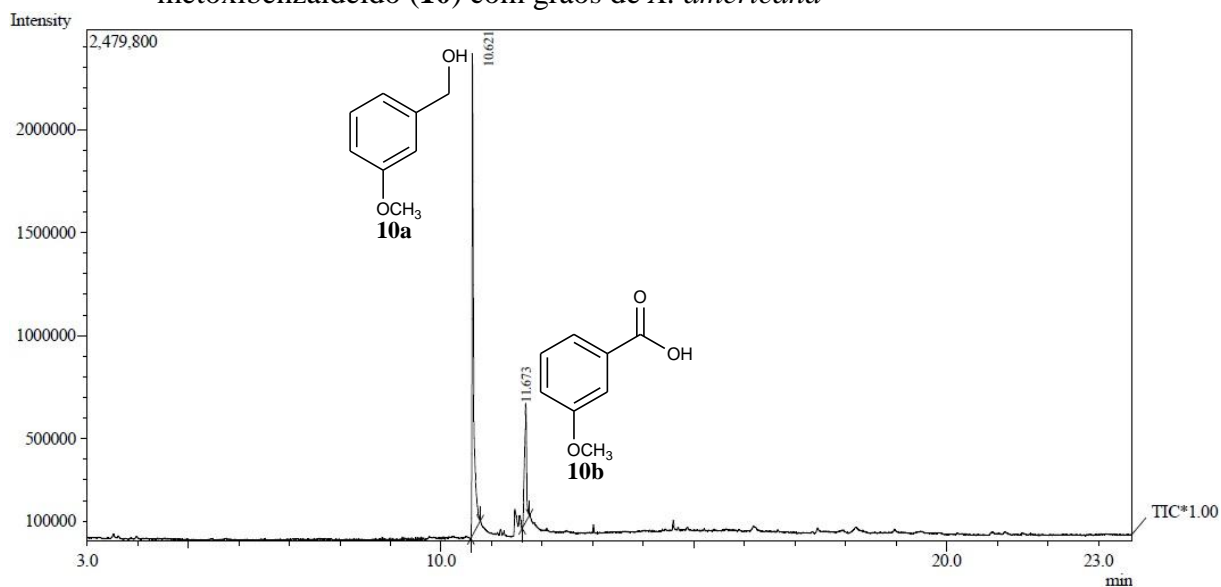


Figura 85 – Espectro de massas de **10**,  $T_R = 9,863$  minutos

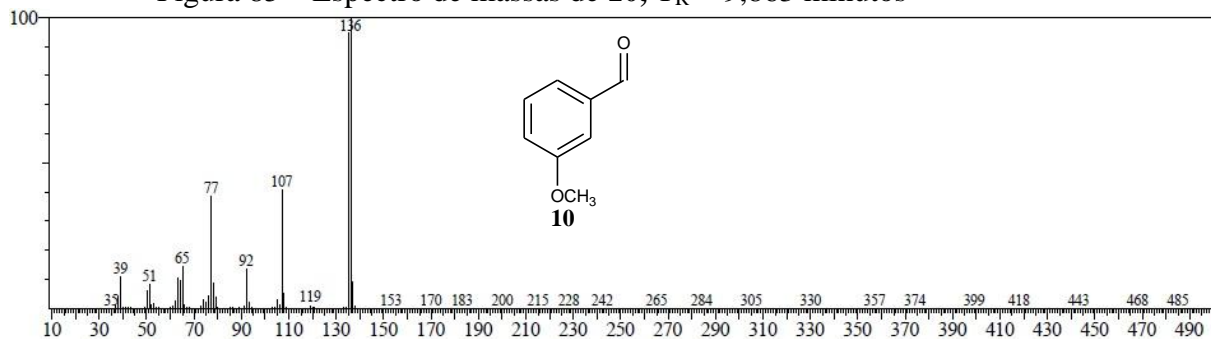


Figura 86 – Espectro de massas de **10a**,  $T_R = 10,621$  minutos

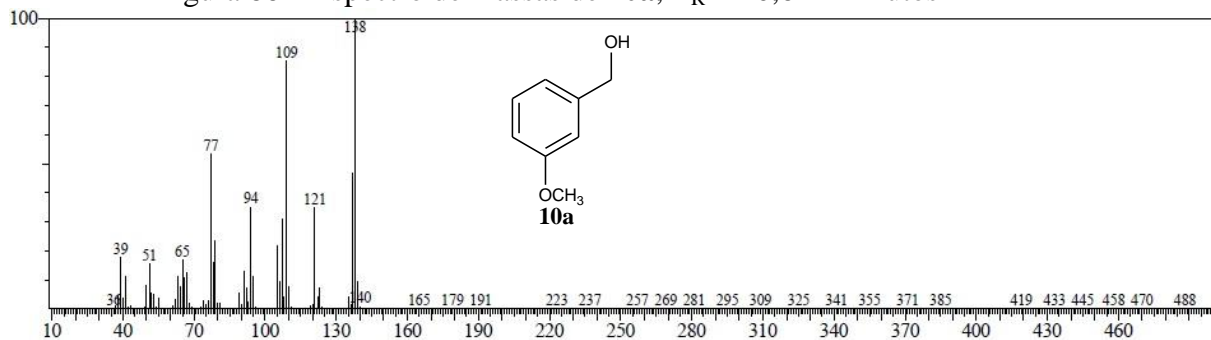


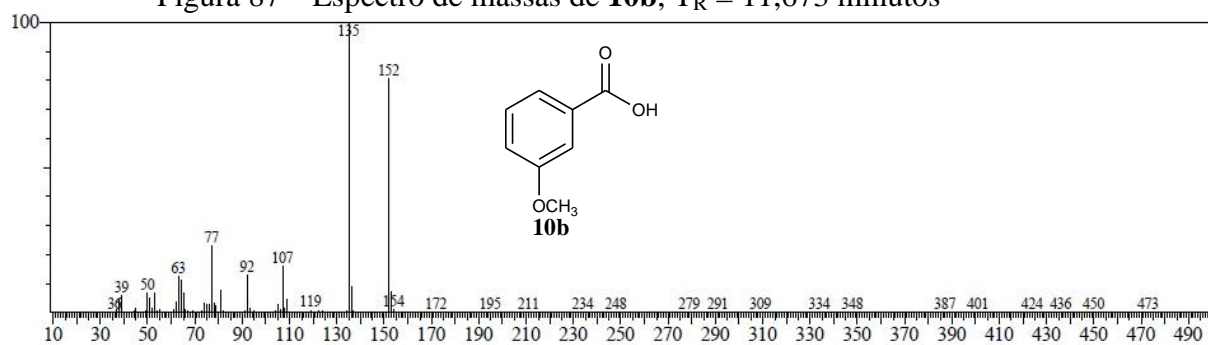
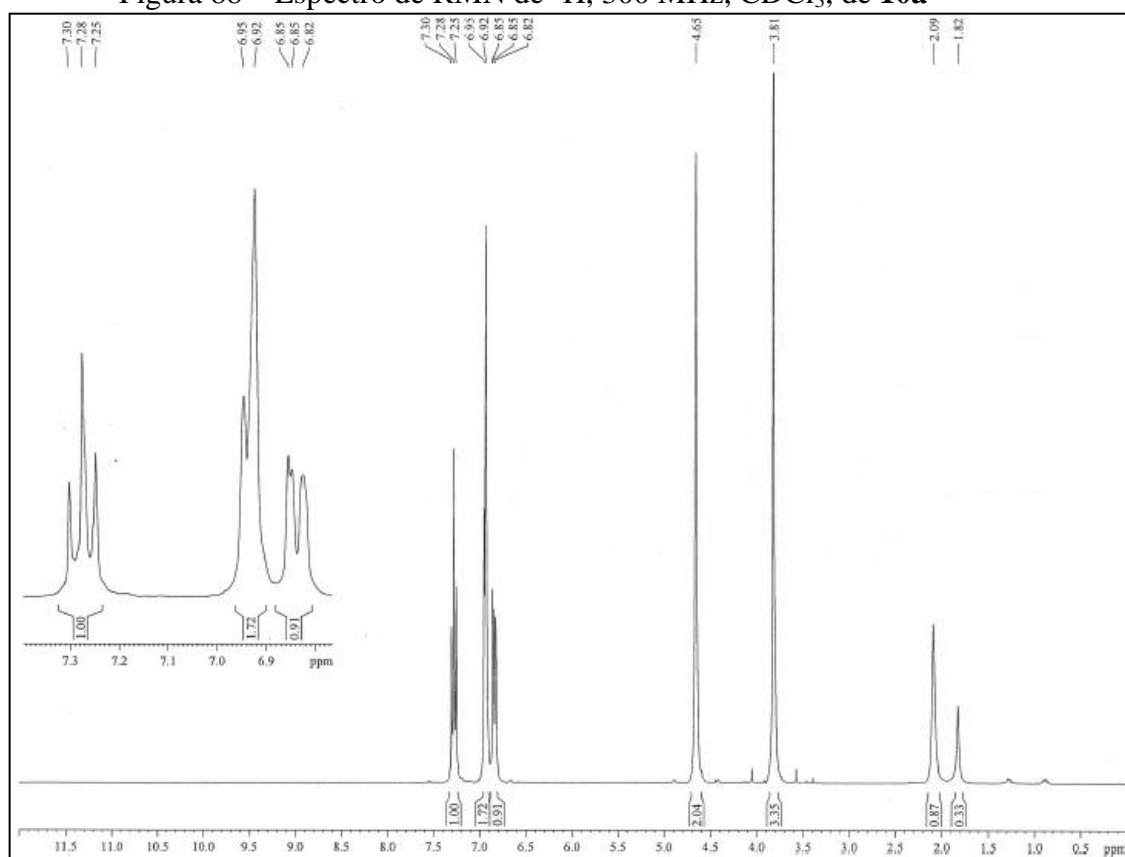
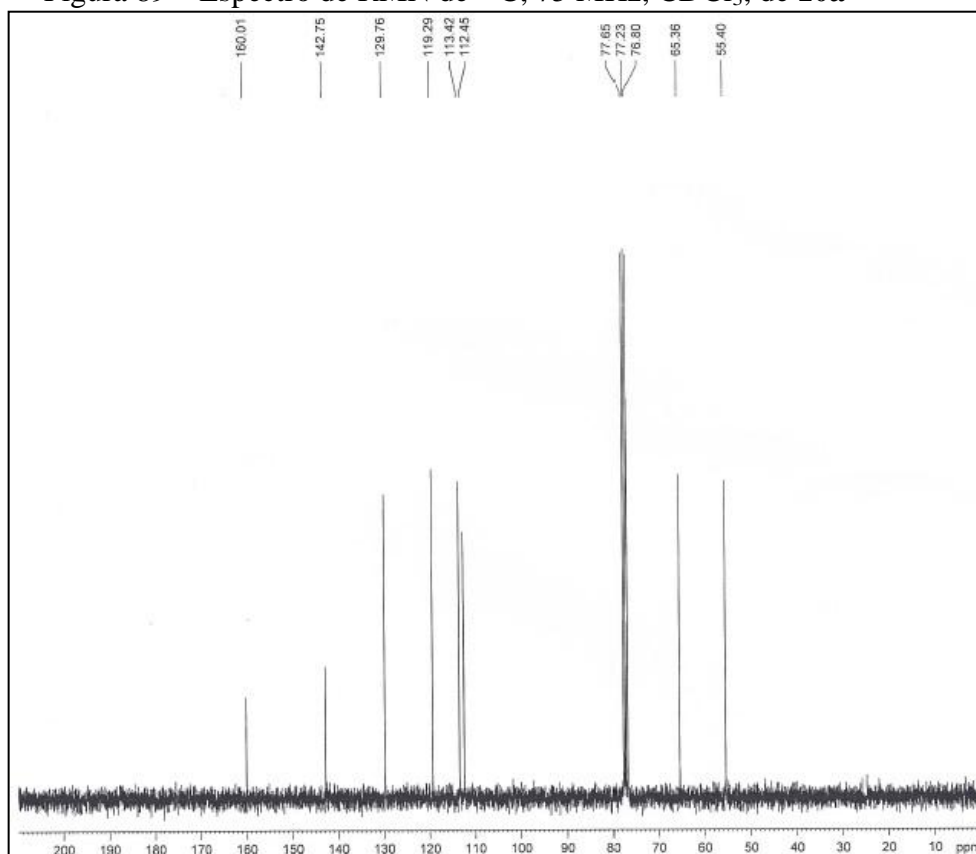
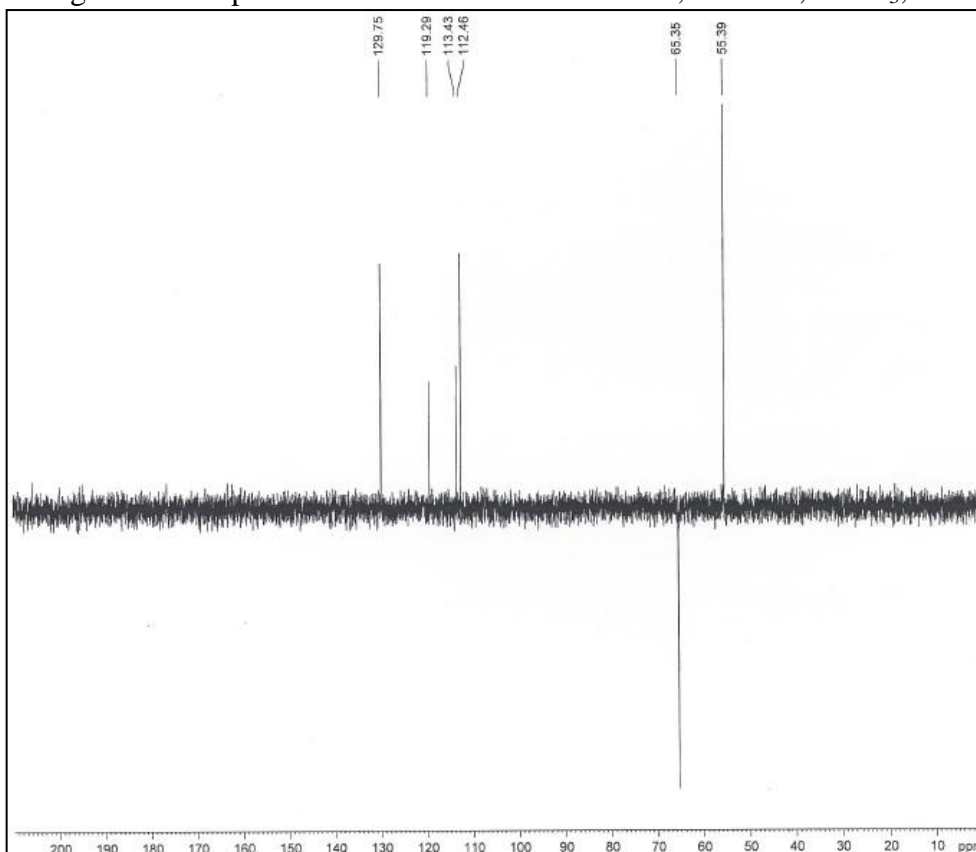
Figura 87 – Espectro de massas de **10b**,  $T_R = 11,673$  minutosFigura 88 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **10a**

Figura 89 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **10a**Figura 90 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135°, 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **10a**



A obtenção de **11a** representado pelo pico com tempo de retenção 10,629 minutos, com conversão de 98%, determinada por CG/EM (Figura 91) foi detectada, inicialmente, pela comparação entre os espectros de massas de **11** (Figura 92), de **11a** (Figura 93, p. 113) e de **11b** (Figura 94, p. 113) com íons moleculares em  $m/z$  136, 138 e 152, respectivamente. Por sua vez, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 95, p. 113) de **11a** registrou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  3,81 [(s, 3H (CH<sub>3</sub>O)], 4,59 [s, 2H (CH<sub>2</sub>O)], 6,88 (d, 9,0 Hz, 2H) e 7,28 (d, 9 Hz, 2H), estes dois últimos sinais, devidos aos hidrogênios do sistema aromático *para* substituído. Esta análise foi confirmada pelos sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 96, p. 114) [ $\delta_{\text{C}}$  55,4 (H<sub>3</sub>CO), 65,1 (CH<sub>2</sub>O), 113,9 (2 =CH), 129,0 (2 =CH), 133,3 (=CH) e 159,3 (=CH-O), inclusive, com o registro do sinal em  $\delta_{\text{C}}$  65,1 negativo no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT 135 (Figura 97, p. 114).

Figura 91 – Cromatograma (GC/EM) do produto **11a** de redução do 4-metoxibenzaldeído (**11**) com grãos de *X. americana*

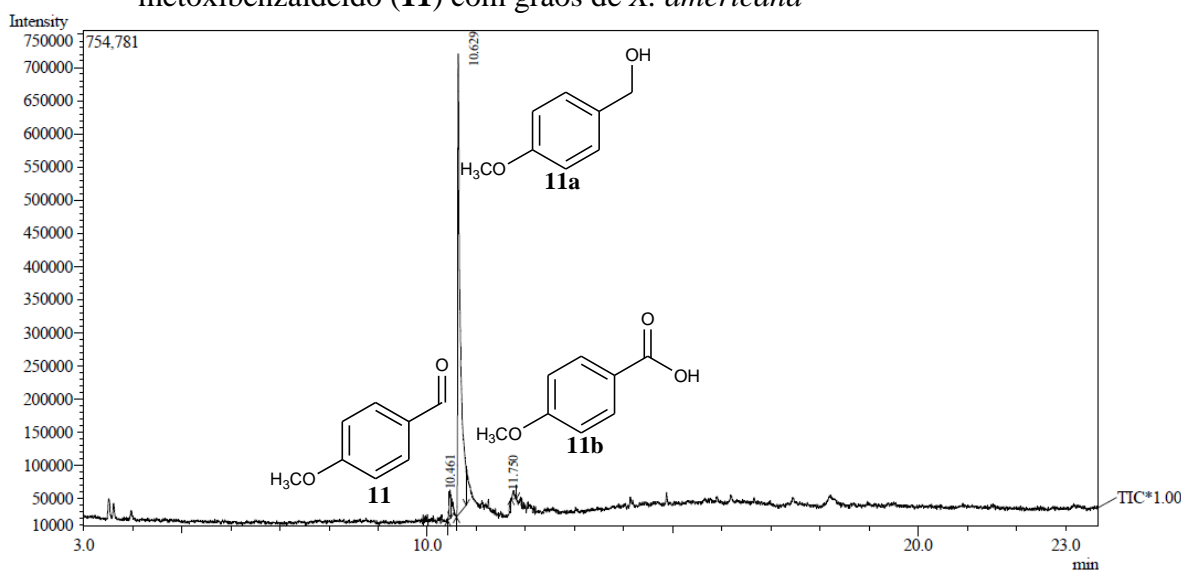


Figura 92 – Espectro de massas de **11**,  $T_{\text{R}} = 10,461$  minutos

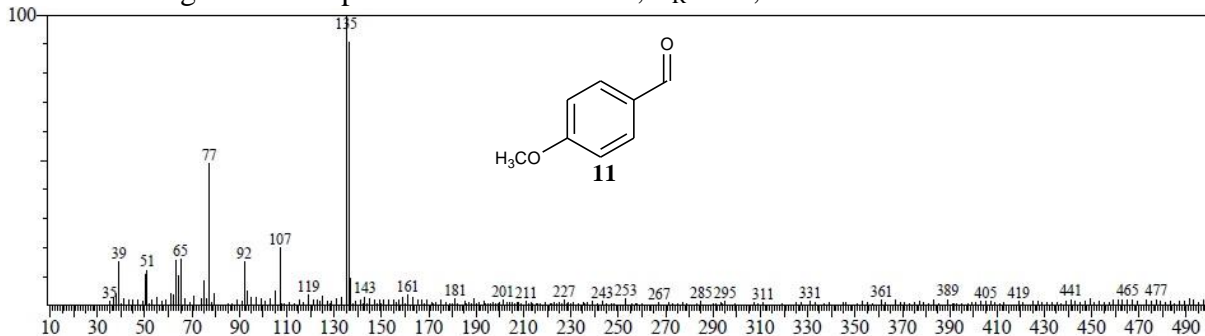


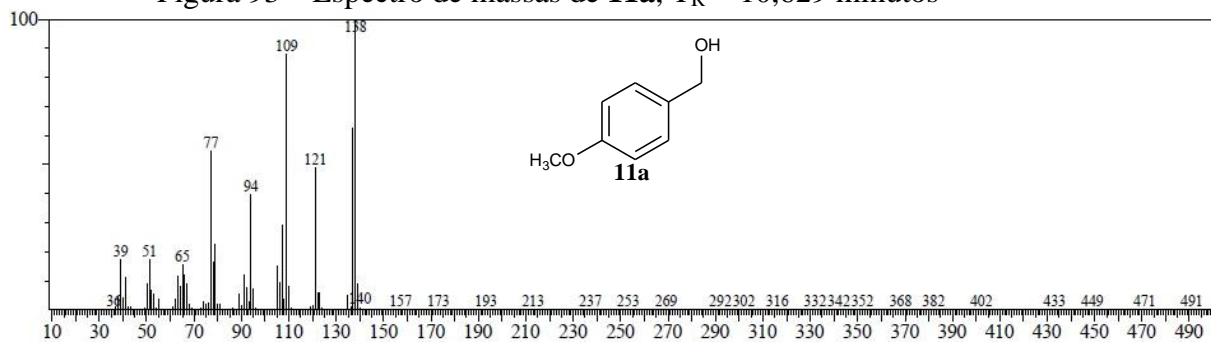
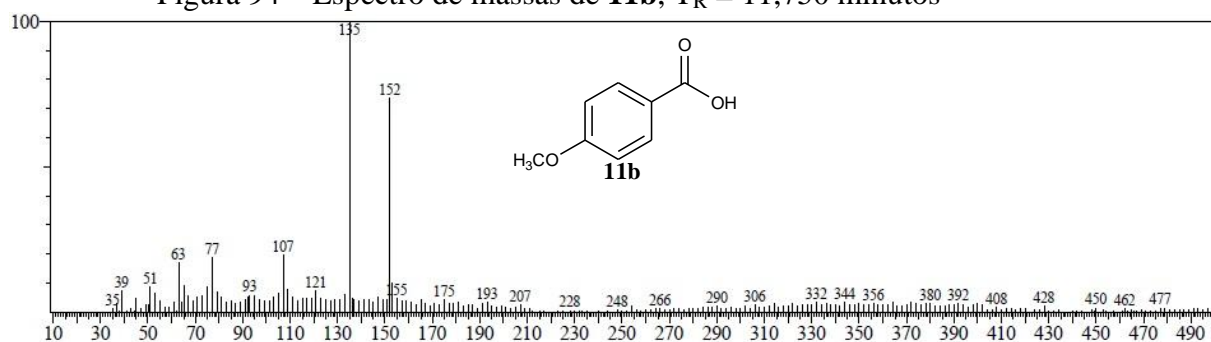
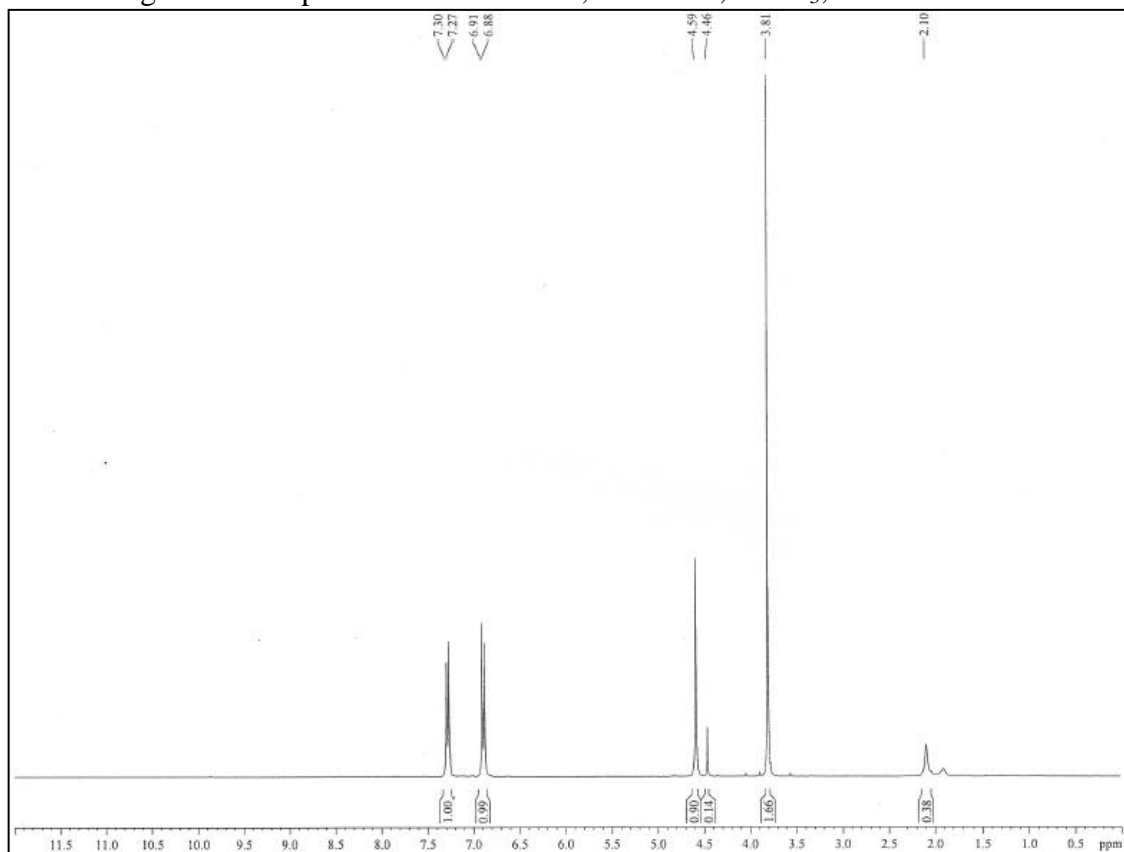
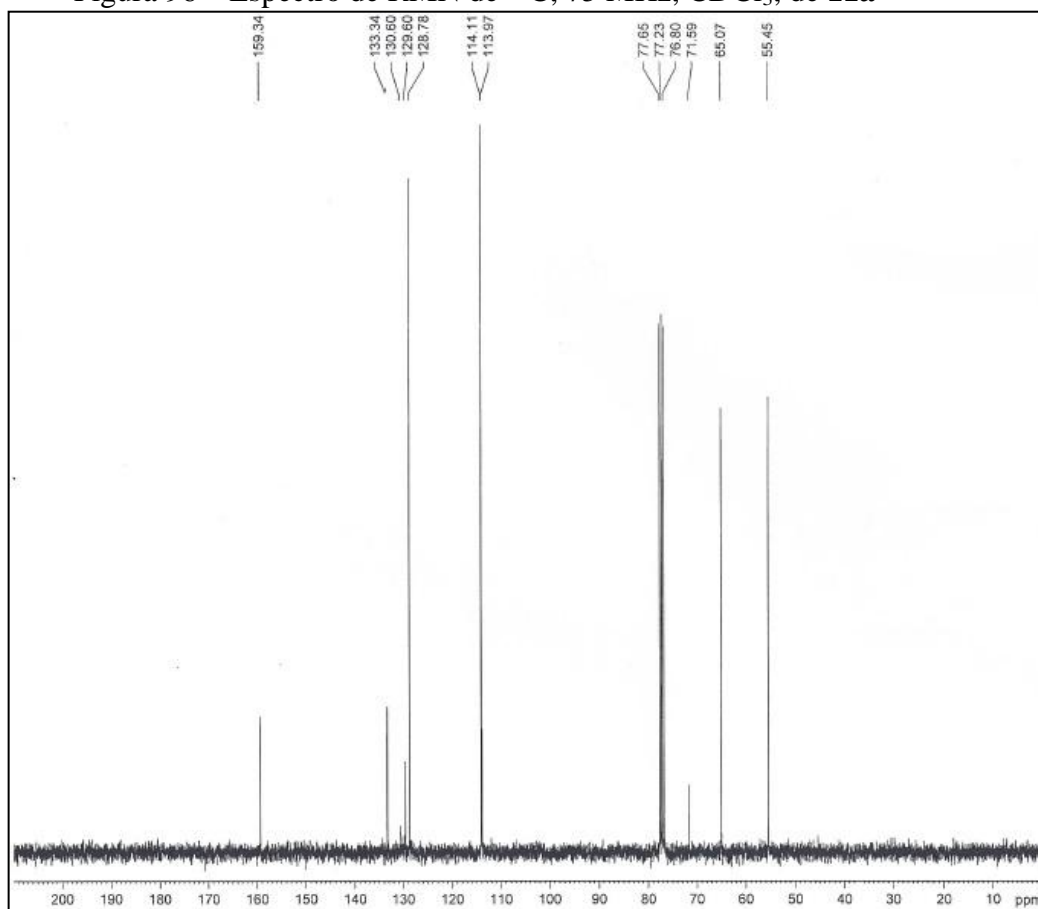
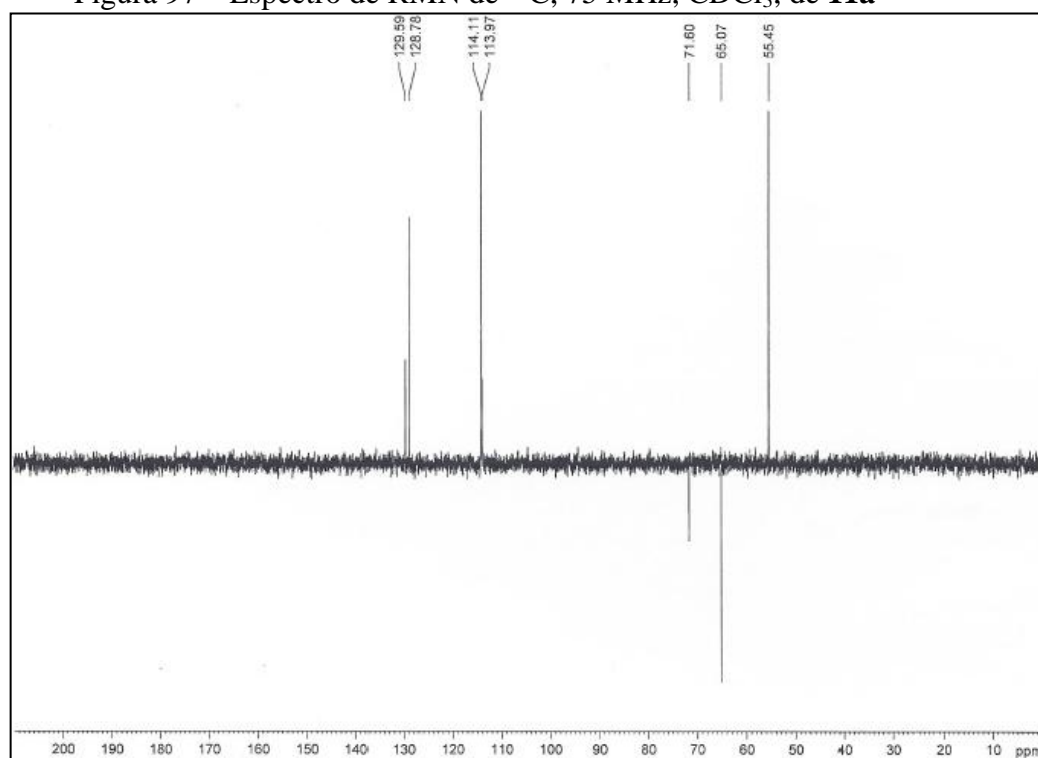
Figura 93 – Espectro de massas de **11a**,  $T_R = 10,629$  minutosFigura 94 – Espectro de massas de **11b**,  $T_R = 11,750$  minutosFigura 95 – Espectro de RMN de  $^1H$ , 300 MHz,  $CDCl_3$ , de **11a**

Figura 96 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **11a**Figura 97 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **11a**

A obtenção de **12a** (Figura 98) foi detectada, inicialmente, pela comparação entre os espectros de massas de **12** (Figura 99), de **12a** (Figura 100, p. 116) e de **12b** (Figura 101, p. 116) com íons moleculares em  $m/z$  152 e 154, respectivamente. Por sua vez, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 102, p. 116) de **12a** registrou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  3,90 [(s, 3H (CH<sub>3</sub>O)], 4,56 [s, 2H (CH<sub>2</sub>O)] e 6,84 (m, 2H)/6,89 (d, 9,0 Hz, 1H), estes dois últimos sinais devidos aos hidrogênios aromáticos. Esta análise foi confirmada pelos sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 103, p. 117) [ $\delta_{\text{C}}$  56,5 (H<sub>3</sub>CO), 65,4 (CH<sub>2</sub>O), 112,3 (=CH), 116,1 (=CH), 121,2 (=CH), 134,3 (=CH), 147,0 (=CH-O) e 149,0 (=CH-O), inclusive, com o registro do sinal em  $\delta_{\text{C}}$  65,4 negativo no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT 135° (Figura 104, 117).

Figura 98 – Cromatograma (GC/EM) do produto **12a** de redução da vanilina (**12**) com grãos de *X. americana*

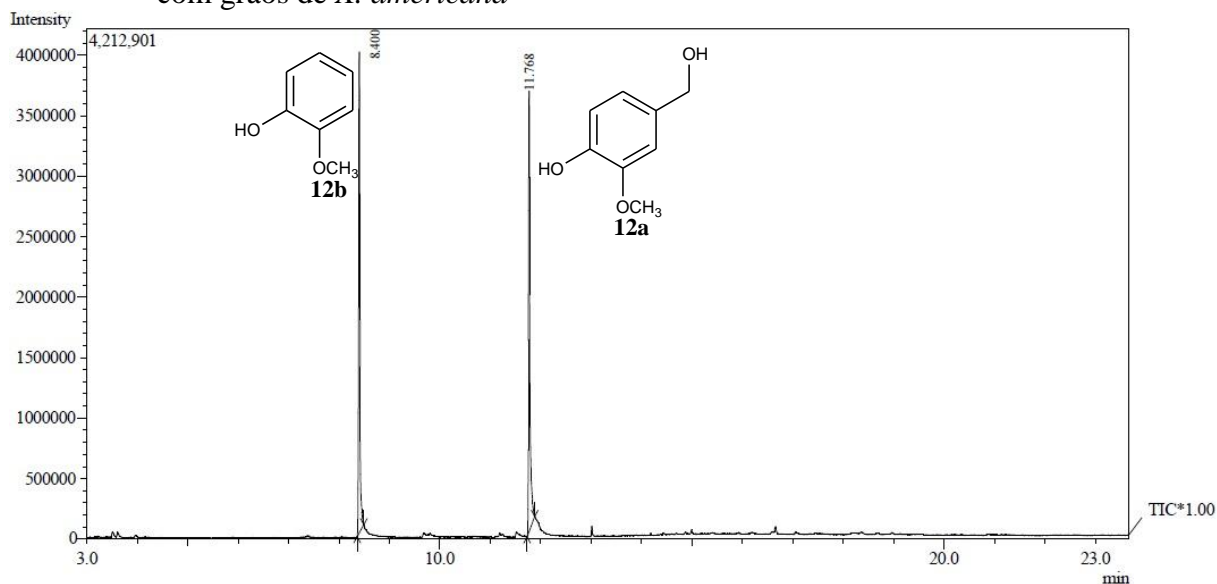


Figura 99 – Espectro de massas de **12**,  $T_{\text{R}} = 11,480$  minutos

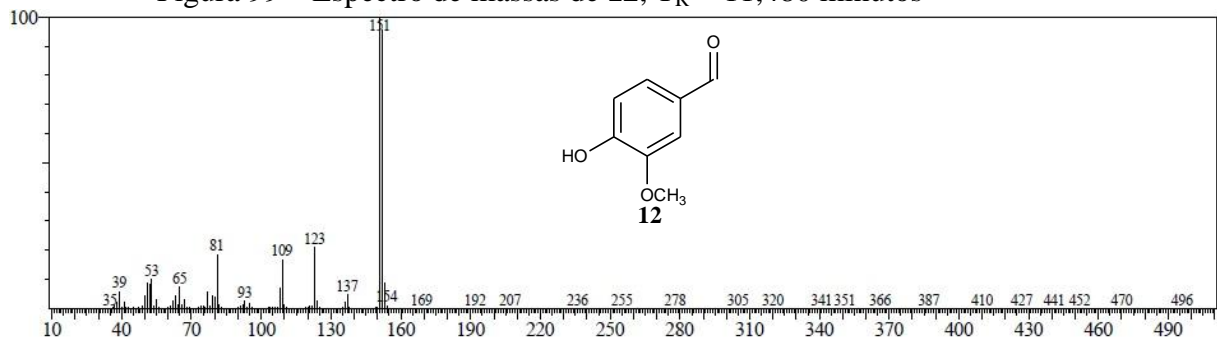


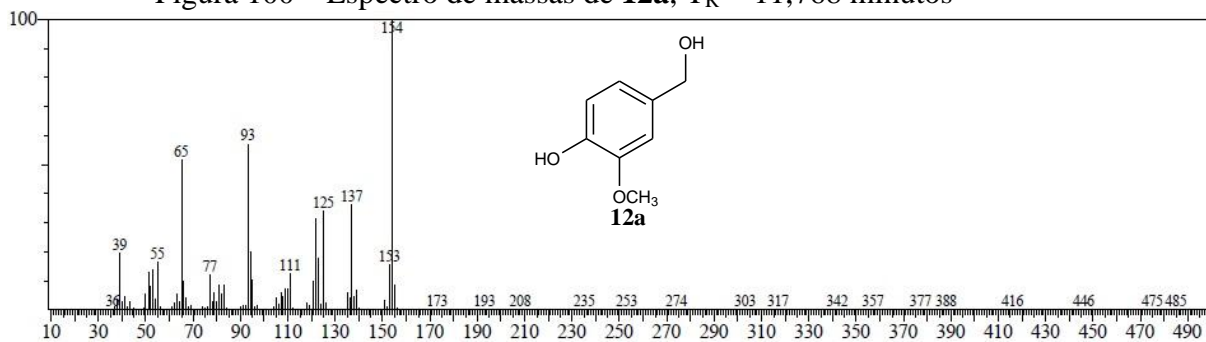
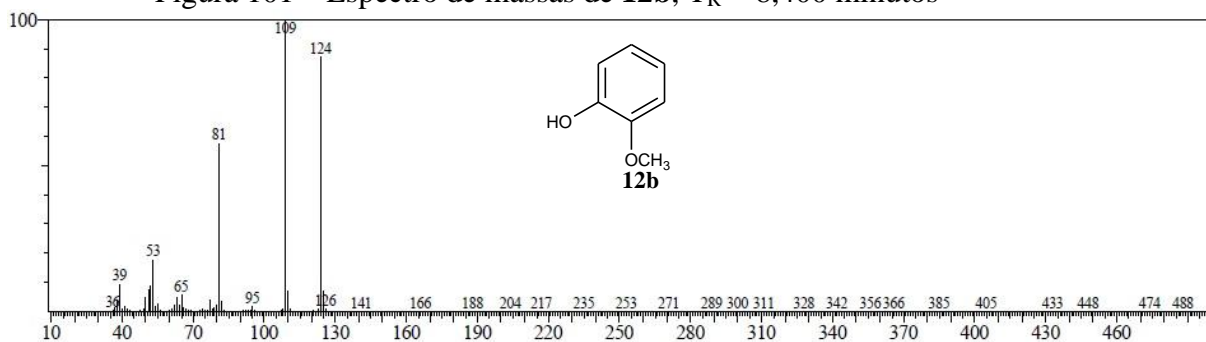
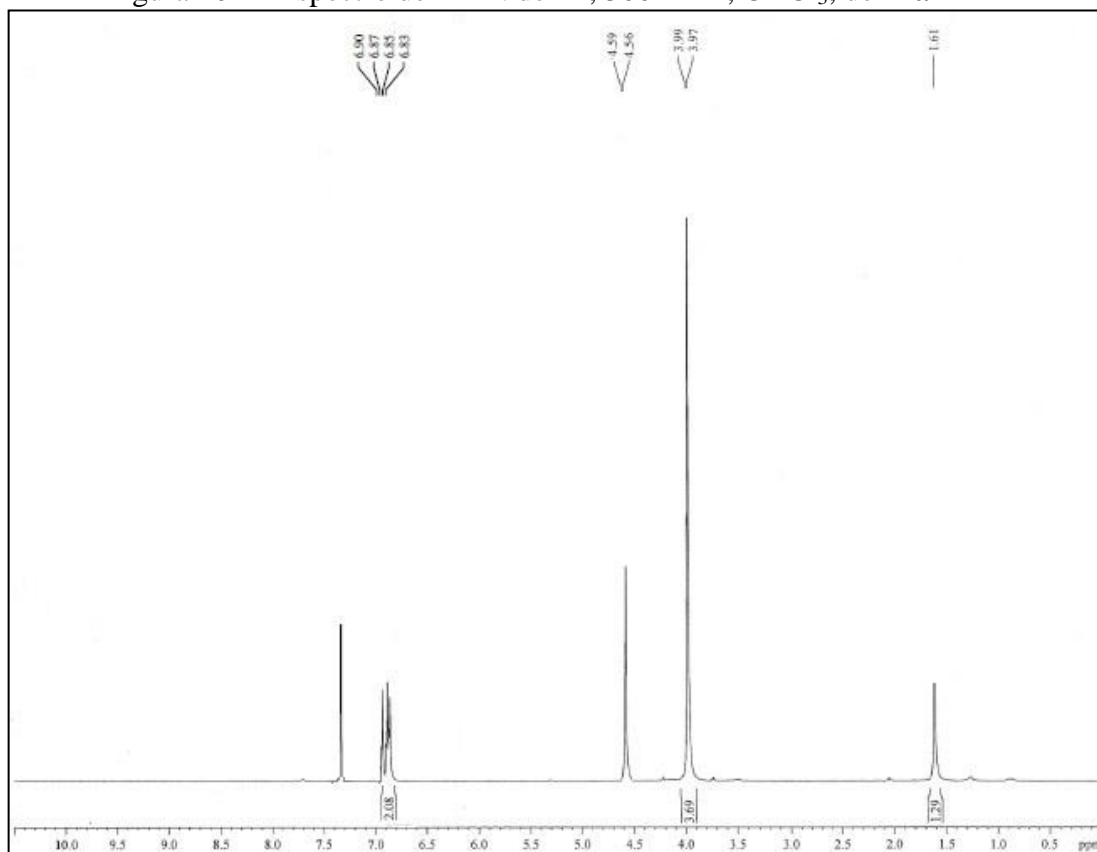
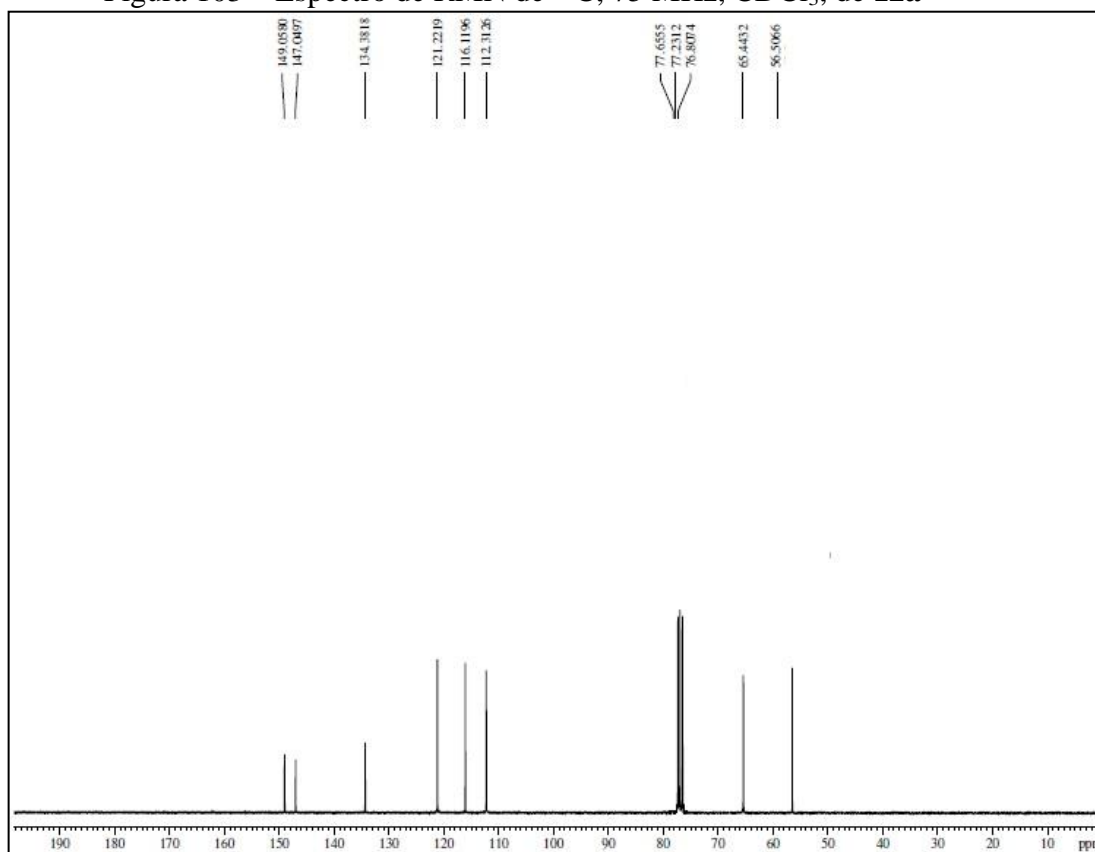
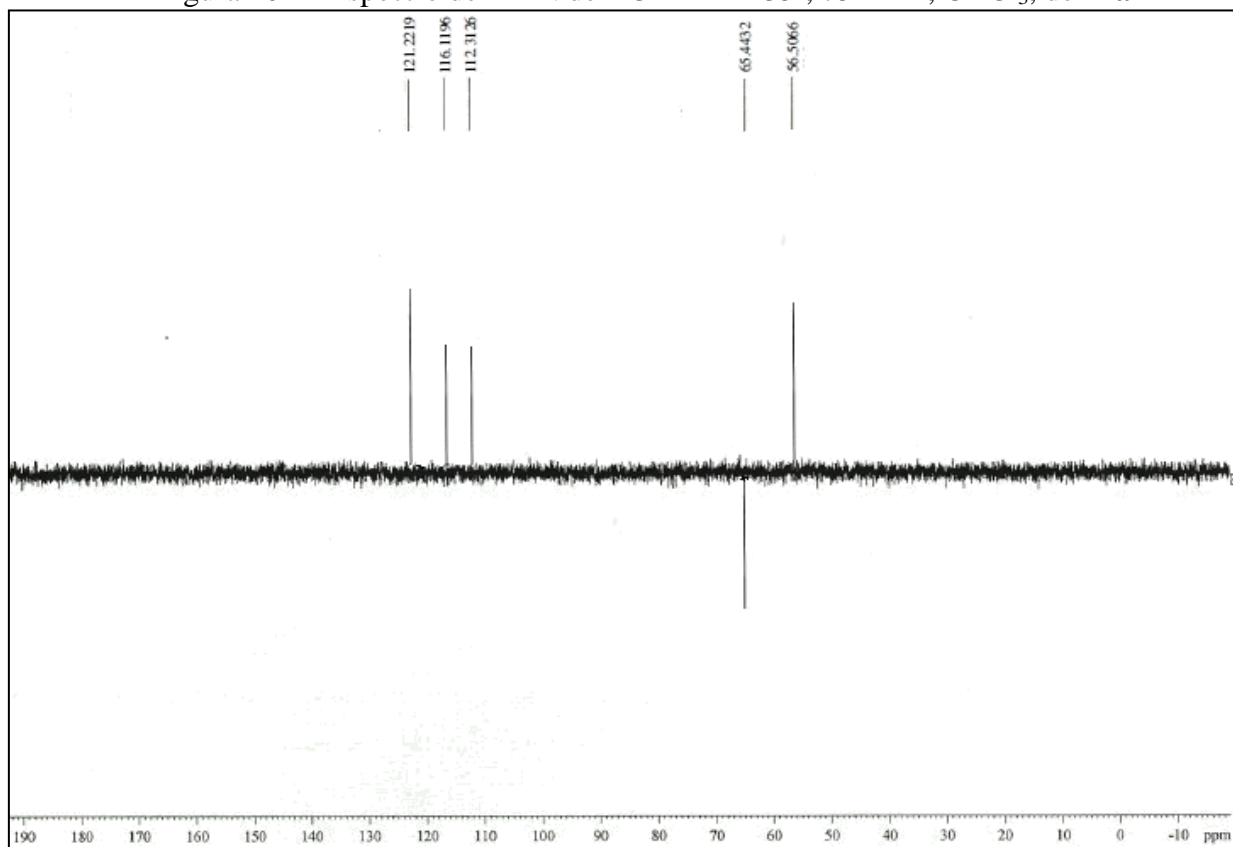
Figura 100 – Espectro de massas de **12a**,  $T_R = 11,768$  minutosFigura 101 – Espectro de massas de **12b**,  $T_R = 8,400$  minutosFigura 102 – Espectro de RMN de  $^1H$ , 300 MHz,  $CDCl_3$ , de **12a**

Figura 103 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **12a**Figura 104 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135°, 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **12a**

A obtenção de **13a** (Figura 105) foi detectada, inicialmente, pela comparação entre os espectros de massas de **13** (Figura 106) e de **13a** (Figura 107, p. 119) com íons moleculares em  $m/z$  156 e 158, respectivamente. Por sua vez, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 108, p. 119) de **13a** registrou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  5,12 [s, 2H ( $\text{CH}_2\text{O}$ )] e 7,54 a 8,11 ( $m_s$ , 7H), estes últimos sinais devidos aos hidrogênios aromáticos. Esta análise foi confirmada pelos sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 109, p. 120) [ $\delta_{\text{C}}$  63,7 ( $\text{H}_2\text{CO}$ ) e 124 a 137 (carbonos aromáticos)], inclusive, com o registro do sinal em  $\delta_{\text{C}}$  63,7 negativo no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT 135° (Figura 110, p. 120).

Figura 105 – Cromatograma (GC/EM) do produto **13a** de redução do 1-naftaldeído (**13**) com grãos de *X. americana*

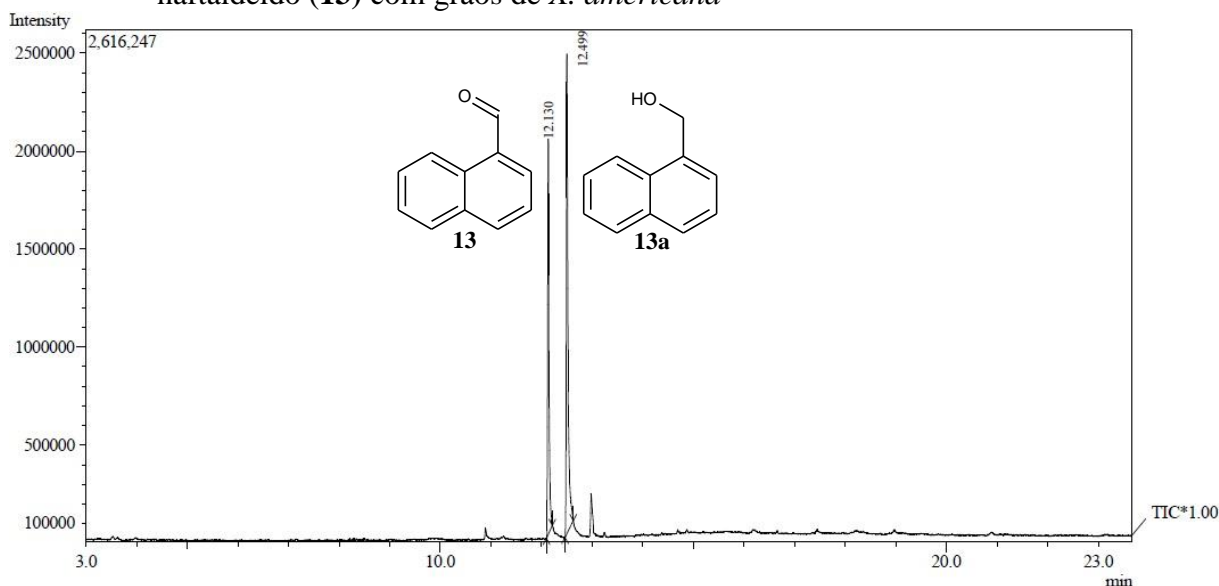


Figura 106 – Espectro de massas de **13**,  $T_R = 12,130$  minutos

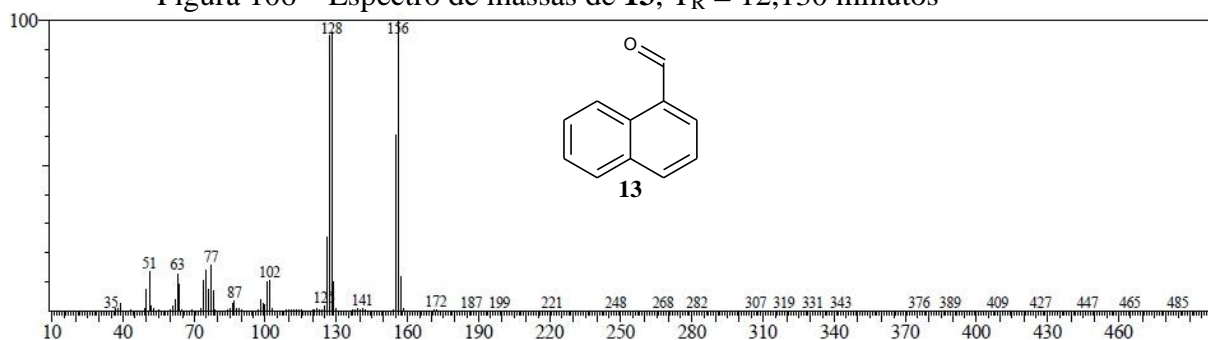


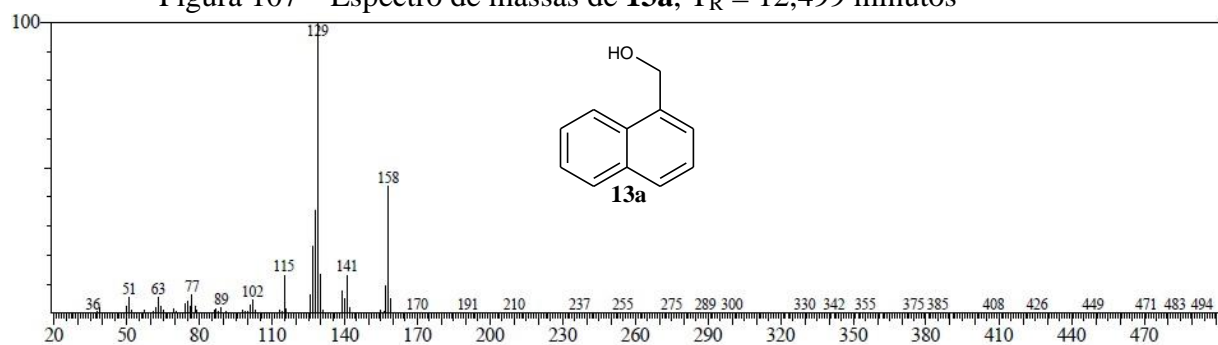
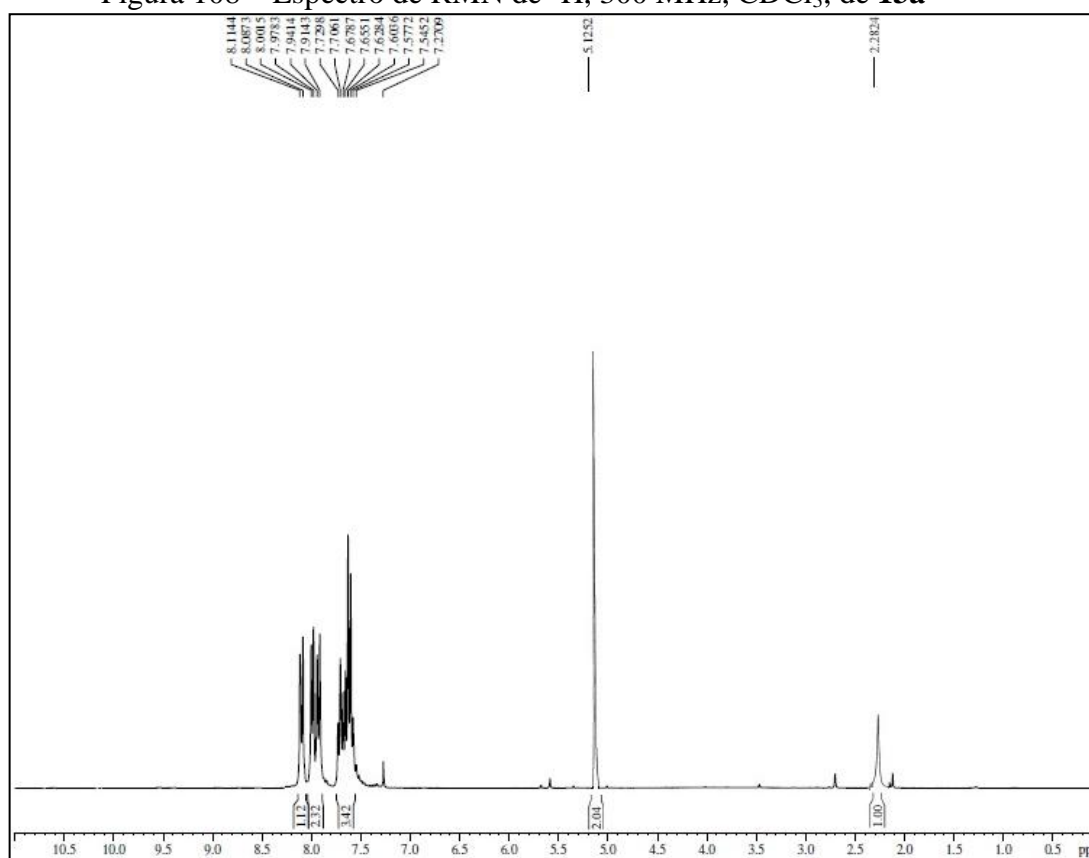
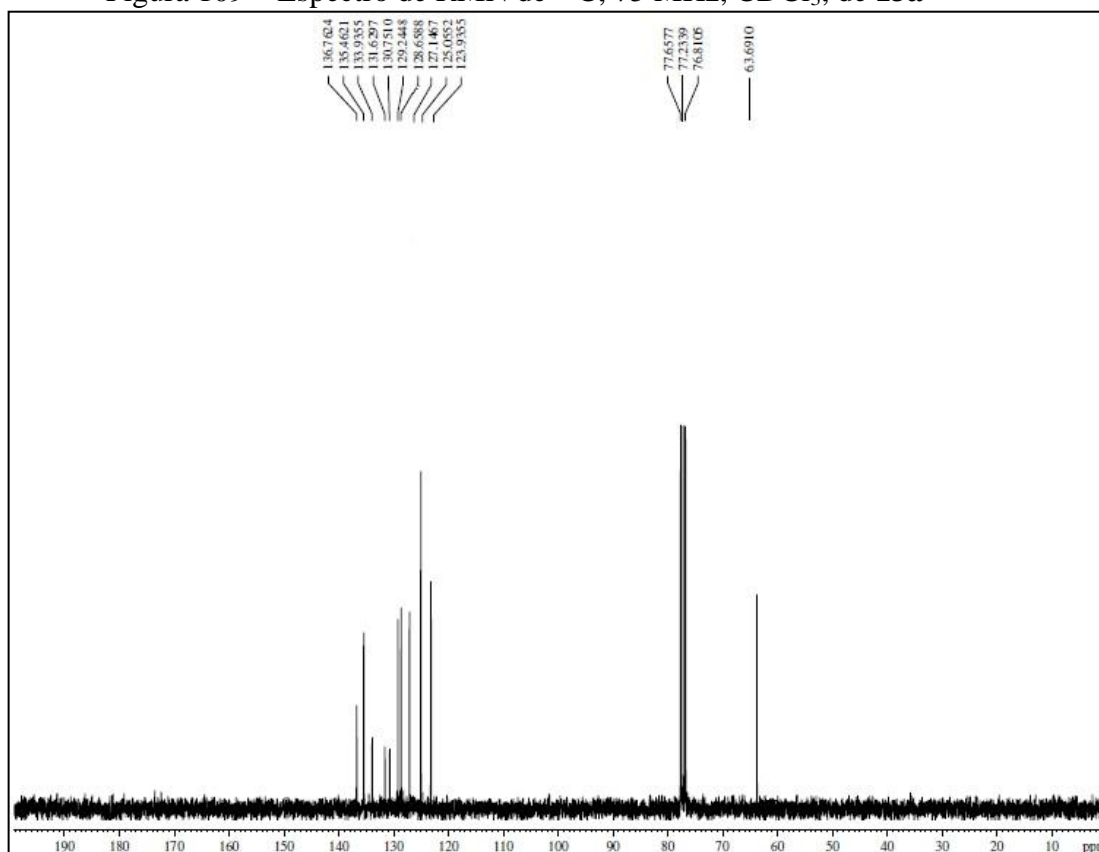
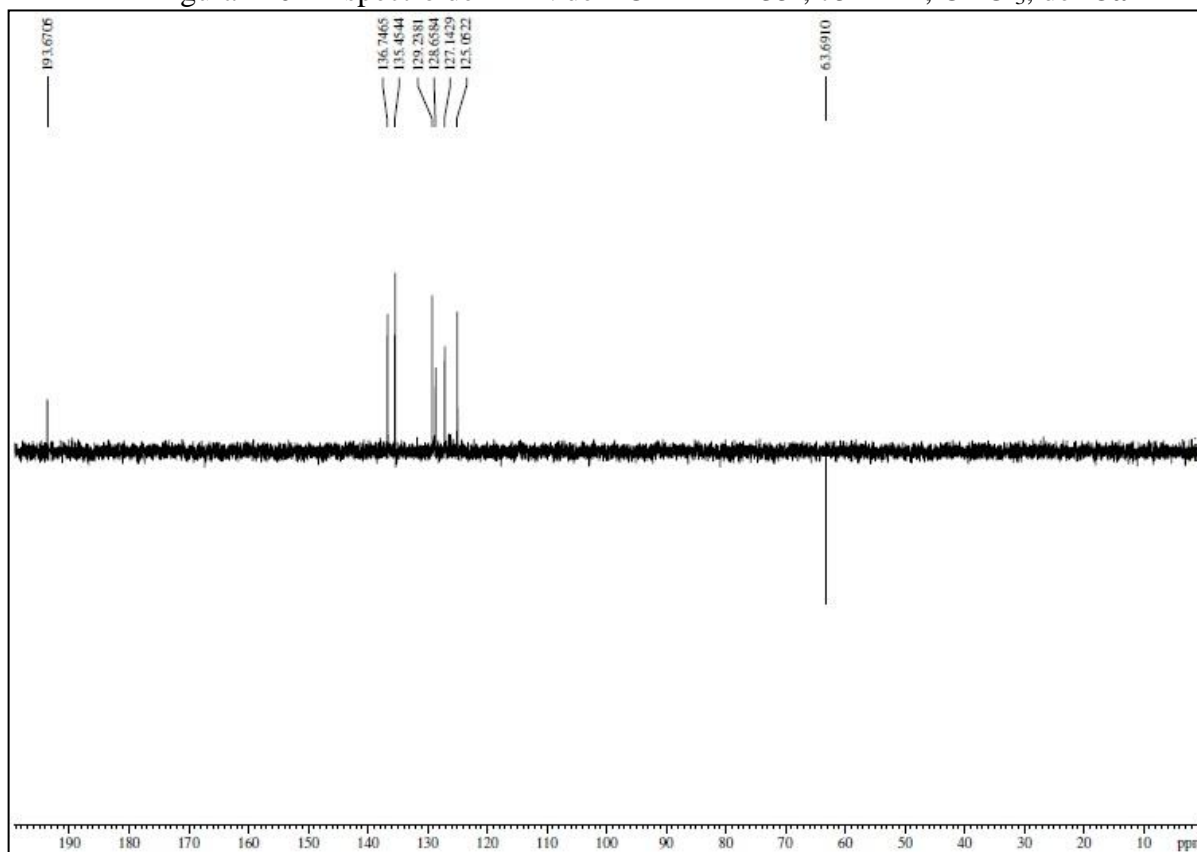
Figura 107 – Espectro de massas de **13a**,  $T_R = 12,499$  minutosFigura 108 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **13a**



Figura 109 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **13a**Figura 110 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135°, 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **13a**

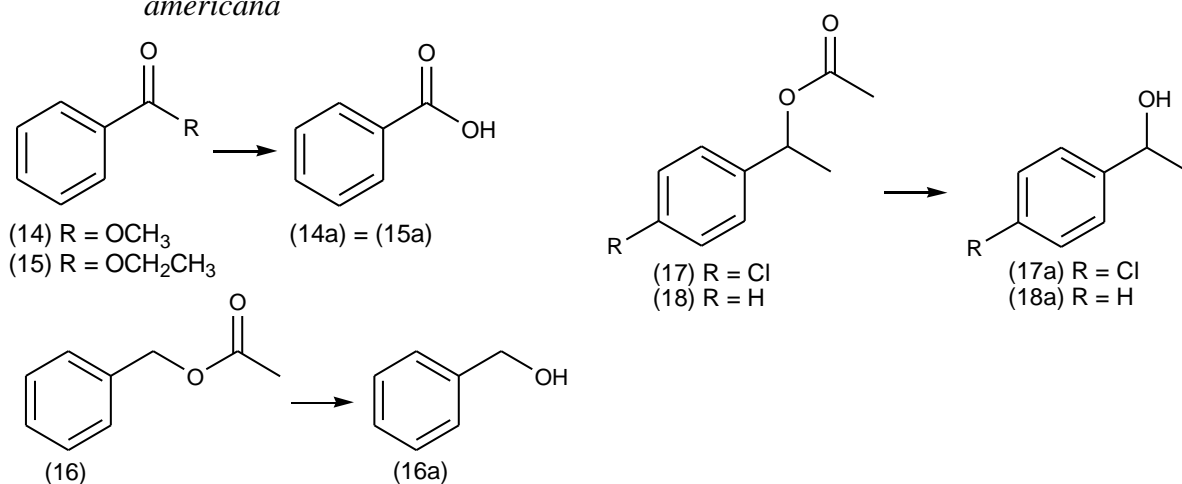
Em resumo, a bioconversão dos aldeídos ocorreu na faixa de médio (51%) a excelente rendimento (>99%). Entretanto, os valores pontuais para cada aldeído foram mais expressivos em relação às cetonas.

#### 6.1.4 Hidrólise de ésteres

O passo seguinte consistiu em observar a eficiência do sistema enzimático frente a grupos carbonila da função éster. Os compostos selecionados foram benzoato de metila (**14**), benzoato de etila (**15**), o acetato de benzila (**16**), acetato de *p*-cloro-feniletila (**17**) e acetato de feniletila (**18**), tomando o primeiro como padrão. Os produtos obtidos a partir dos cinco ésteres foram os ácidos carboxílicos (**14a** e **15a**) e alcoóis (**16a**, **17a** e **18a**) (Esquema 11).

A enzima de hidrólise dos ésteres na espécie *X. americana* mostrou alta eficácia originando os produtos **17a** (58%) e **18a** (65%) com bons rendimentos e **14a**, **15a** e **16a** com excelentes rendimentos (98%) (Tabela 12).

Esquema 11 – Reações de hidrólise de ésteres catalisadas pelos grãos de *X. americana*



Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 12 – Percentagens relativas obtidas por CG/EM dos produtos da hidrólise de **14–18**

Produto	Bioconversão (%)	ee (%)
<b>14a</b>	98	-
<b>15a</b>	98	-
<b>16a</b>	98	-
<b>17a</b>	58	87 ( <i>S</i> )
<b>18a</b>	65	34,2 ( <i>S</i> )

ee = excesso enantiomérico; Fonte: elaborada pelo autor.

A obtenção de **14a** (Figura 111) foi detectada, inicialmente, pela comparação entre os espectros de massas de **14** (Figura 112) e de **14a** (Figura 113, p. 123) com íons moleculares em  $m/z$  136 e 122, respectivamente. Por sua vez, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 114, p. 123) de **14a** registrou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,50 (t, 7,5 Hz, 2H), 7,64 (t, 7,4 Hz, 1H), 8,20 (d, 7,3 Hz, 2H) e 11,93 (sl, 1H), devidos aos átomos de hidrogênios aromáticos e ácido carboxílico, respectivamente, compatíveis com **14a**. Esta análise foi confirmada pelos cinco sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 115, p. 124) [ $\delta_{\text{C}}$  126,7 (2CH=), 129,6 (C=), 130,4 (2CH=), 134,0 (HC=) e 172,8 (C=O)].

Figura 111 – Cromatograma (CG/EM) do produto **14a** de hidrólise do benzoato de metila (**14**) com grãos de *X. americana*

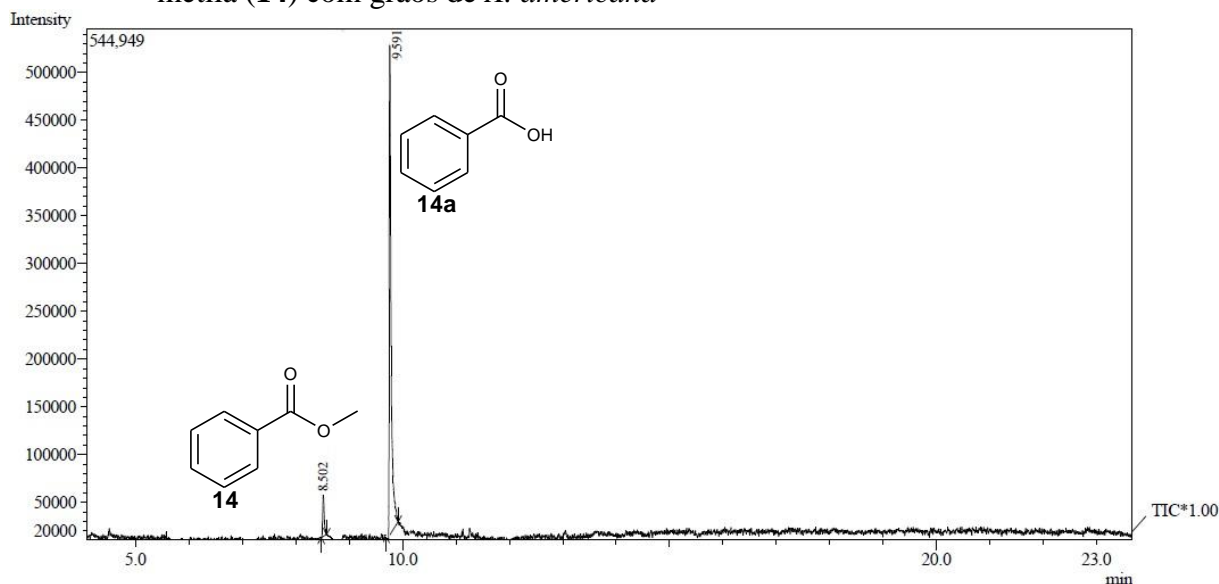


Figura 112 – Espectro de massas de **14**,  $T_{\text{R}} = 8,502$  minutos

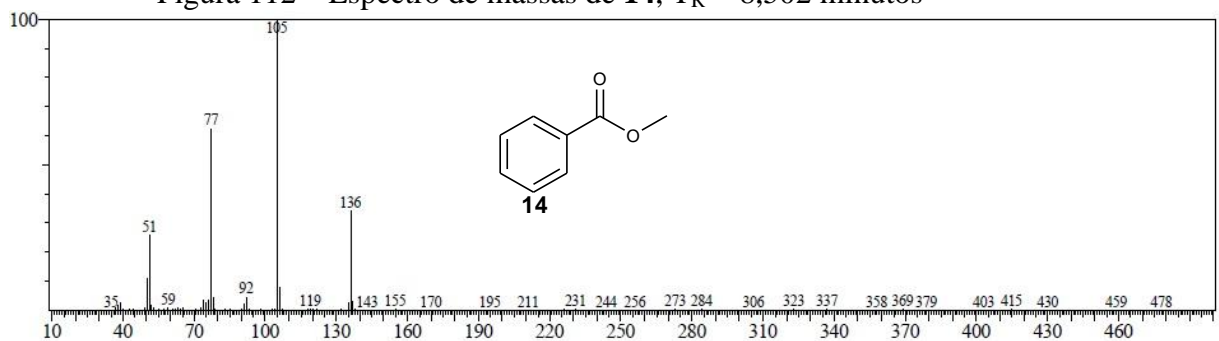


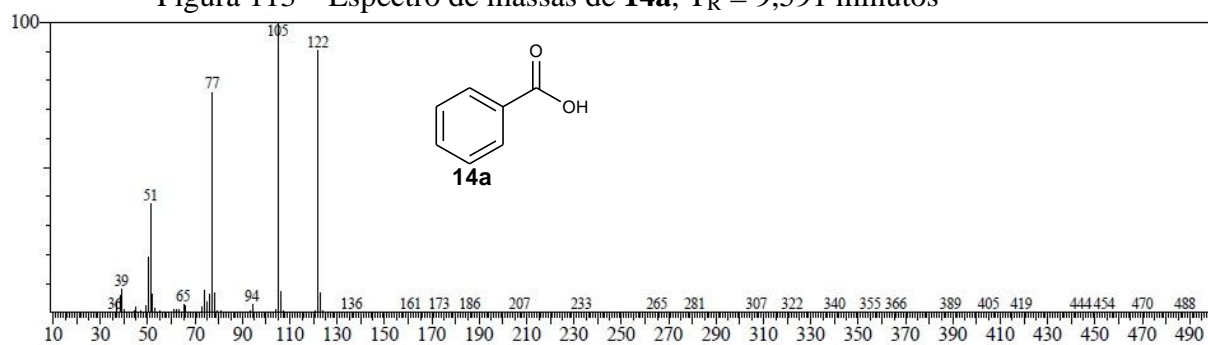
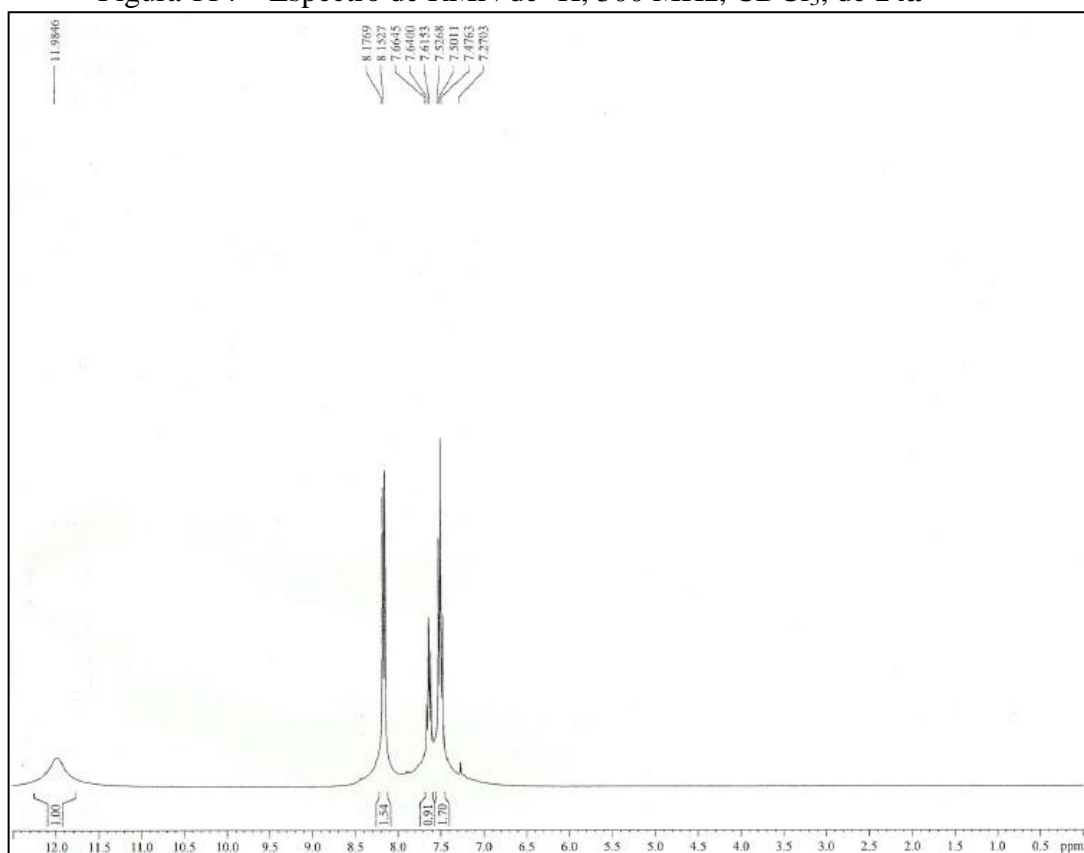
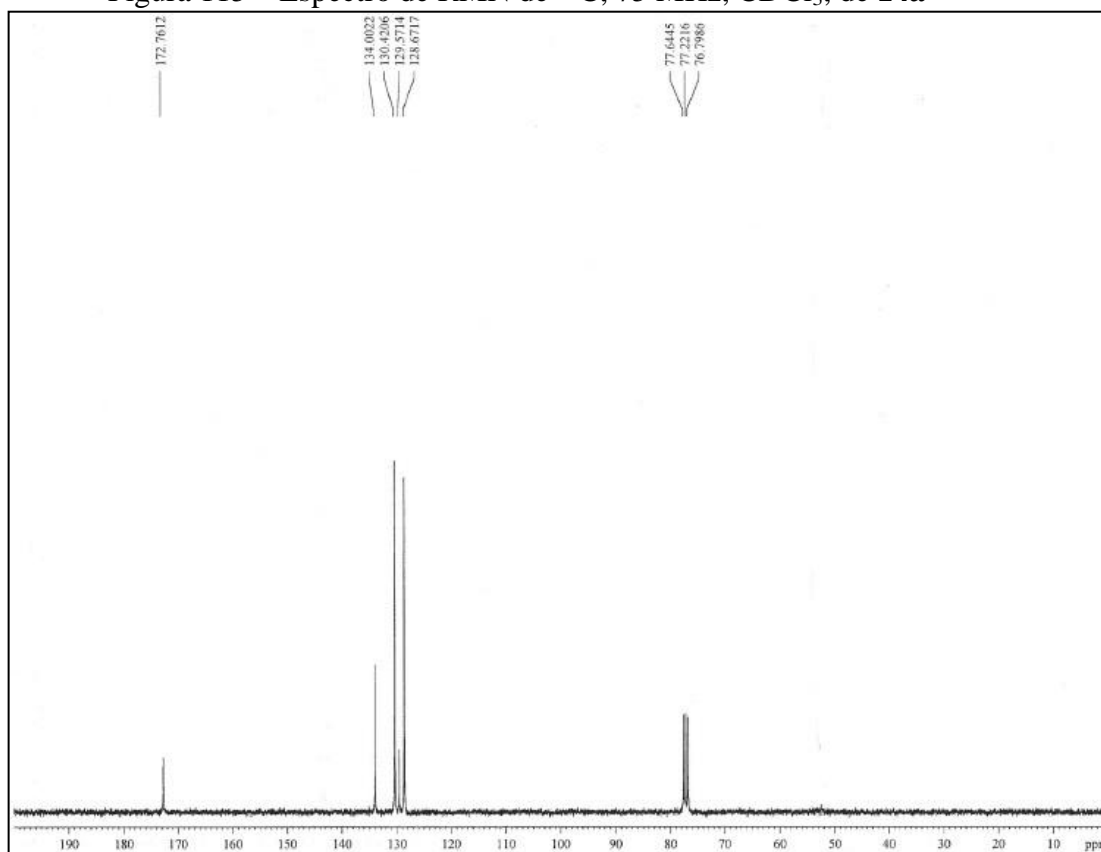
Figura 113 – Espectro de massas de **14a**,  $T_R = 9,591$  minutosFigura 114 – Espectro de RMN de  $^1H$ , 300 MHz,  $CDCl_3$ , de **14a**

Figura 115 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **14a**

A obtenção de **15a** (Figura 116, p. 125) foi detectada, inicialmente, pela comparação entre os espectros de massas de **15** (Figura 117, p. 125) e de **15a** (Figura 118, p. 125) com íons moleculares em  $m/z$  150 e 122, respectivamente. Por sua vez, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 119, p. 126) de **15a** registrou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,44 (t, 7,4 Hz, 2H), 7,55 (t, 7,3 Hz, 1H), 8,10 (d, 7,3 Hz, 2H) e 12,0 (sl, 1H), devidos aos átomos de hidrogênios aromáticos e ácido carboxílico, respectivamente, compatíveis com **15a**. Esta análise foi confirmada pelos cinco sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 120, p. 126) [ $\delta_{\text{C}}$  128,4 (2CH=), 129,7 (2CH=), 130,7 (C=), 133,9 (HC=) e 172,8 (C=O)].

Figura 116 – Cromatograma (CG/EM) do produto **15a** de hidrólise do benzoato de etila (**15**) com grãos de *X. americana*

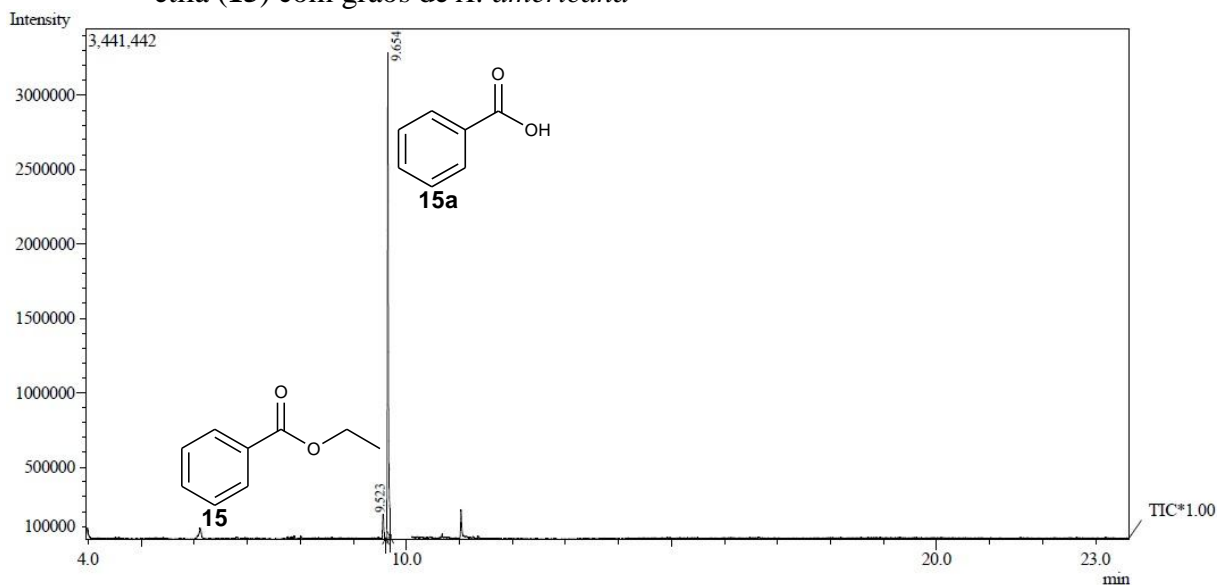


Figura 117 – Espectro de massas de **15**,  $T_R = 9,523$  minutos

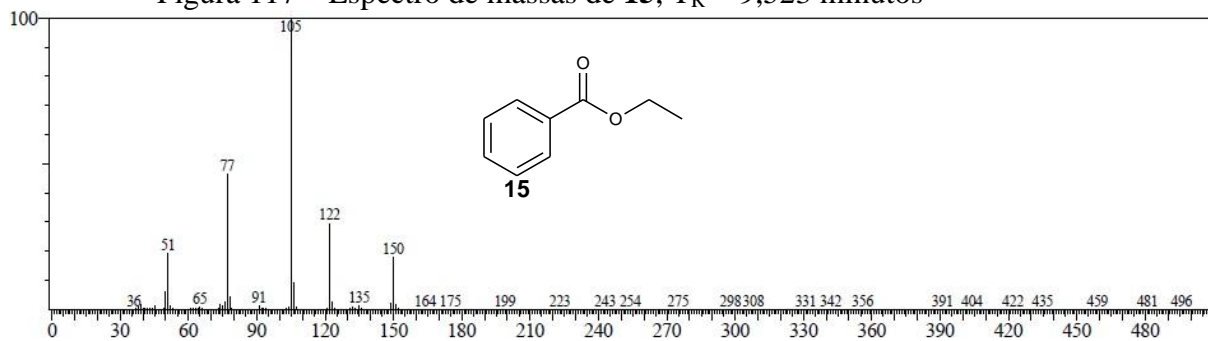


Figura 118 – Espectro de massas de **15a**,  $T_R = 9,654$  minutos

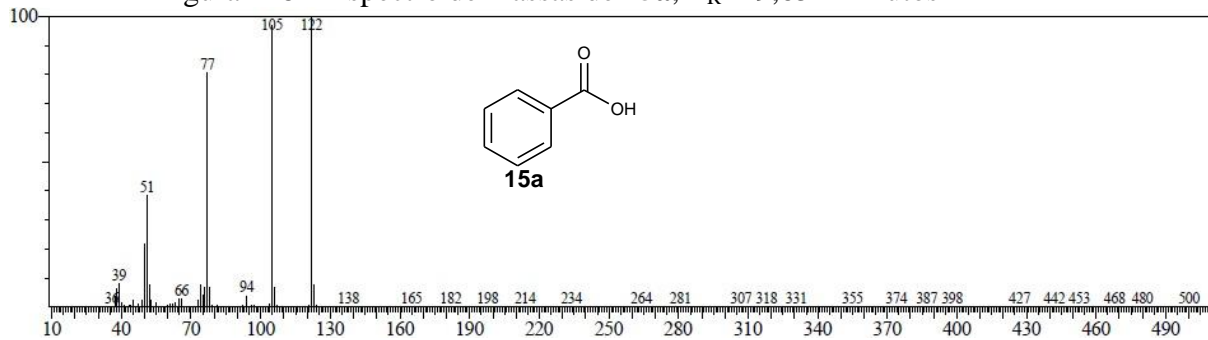
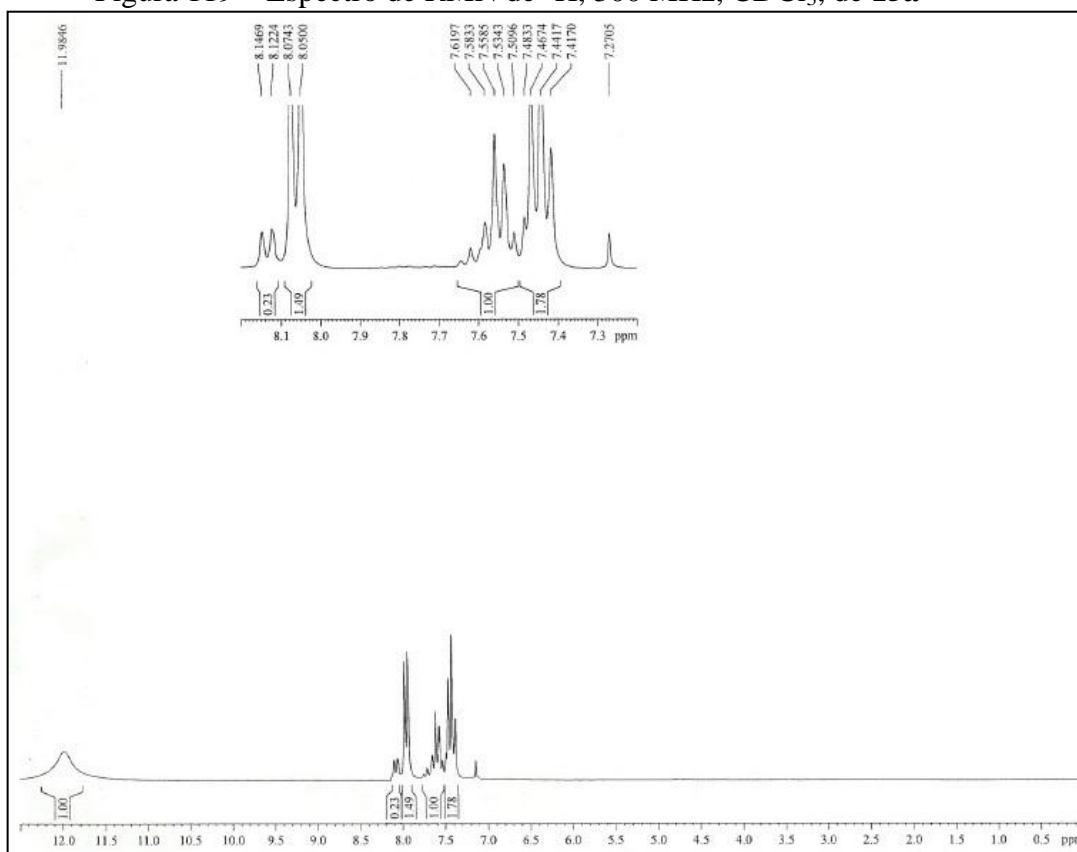
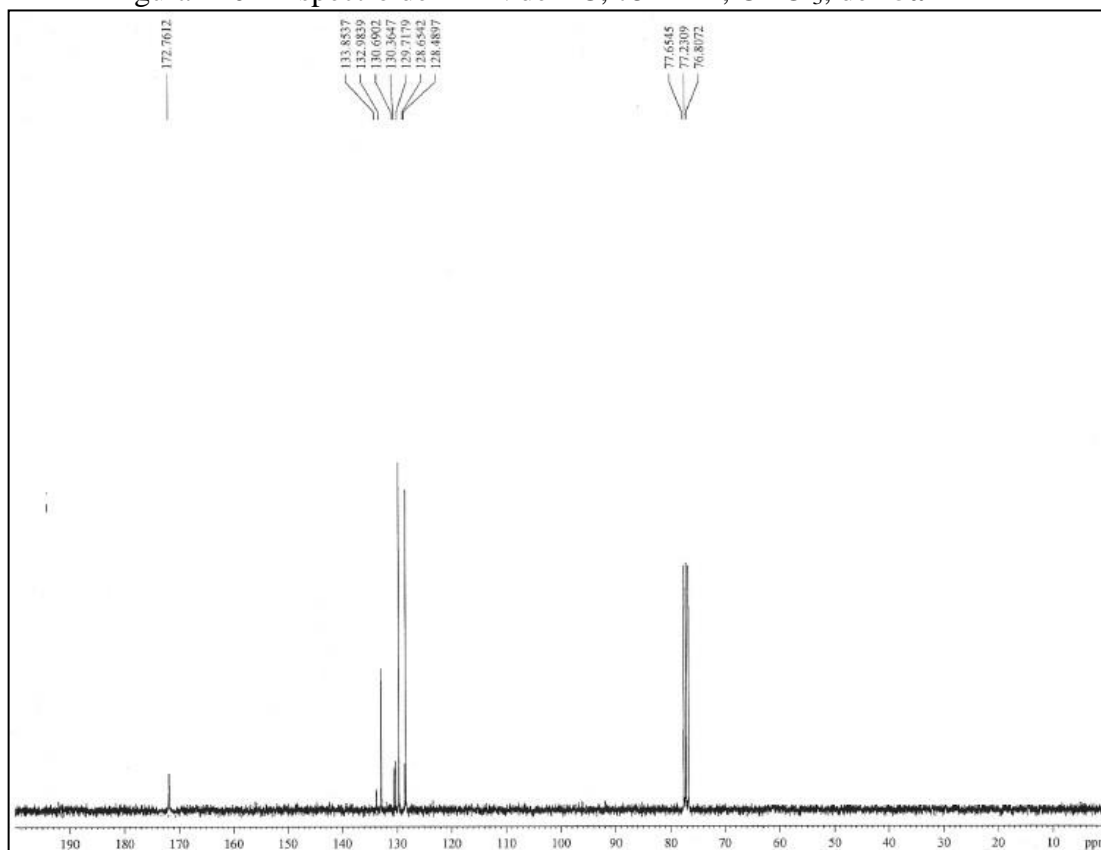


Figura 119 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **15a**Figura 120 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **15a**

A obtenção de **16a** (Figura 121) foi detectada, inicialmente, pela comparação entre os espectros de massas de **16** (Figura 122) e de **16a** (Figura 123, p. 128) com íons moleculares em  $m/z$  150 e 108, respectivamente. Por sua vez, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 124, p. 128) de **16a** registrou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  2,0 (s), 4,66 (s) e 7,29 (s), devidos aos átomos de hidrogênios hidroxílico, metilênicos ( $\text{CH}_2\text{-O}$ ) e aromáticos, respectivamente, compatíveis com **16a**. Esta análise foi confirmada pelos cinco sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 125, p. 129) [ $\delta_{\text{C}}$  65,5 ( $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 127,1 (2CH=), 127,7 (HC=), 128,6 (2HC=) e 141,0 (C=)].

Figura 121 – Cromatograma (CG/EM) do produto **16a** de hidrólise do acetato de benzila (**16**) com grãos de *X. americana*

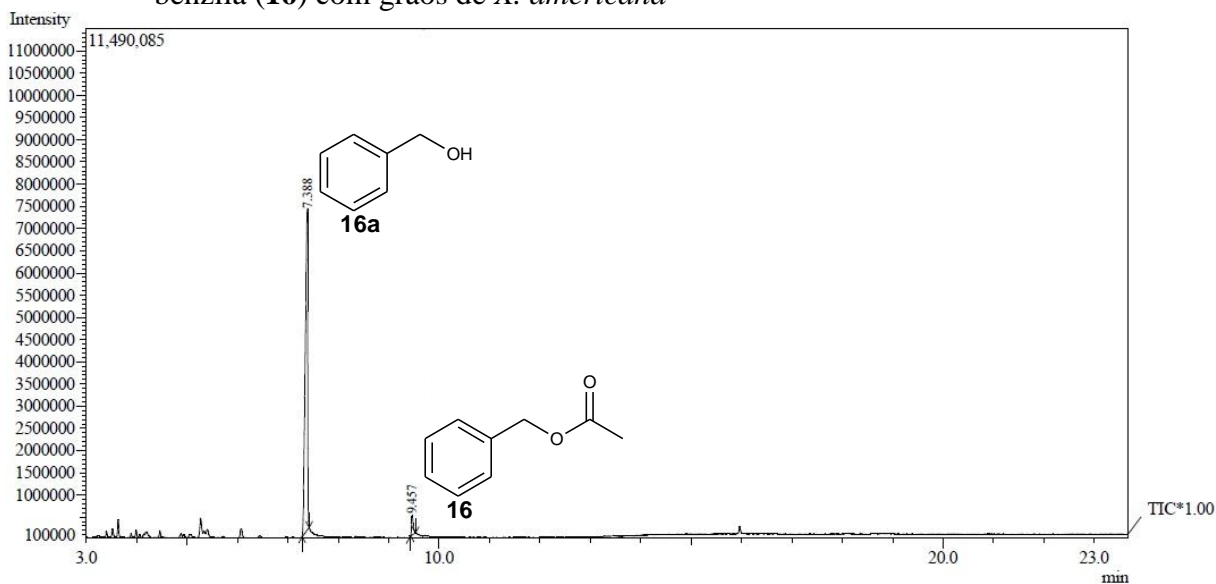


Figura 122 – Espectro de massas de **16**,  $T_{\text{R}} = 9,457$  minutos

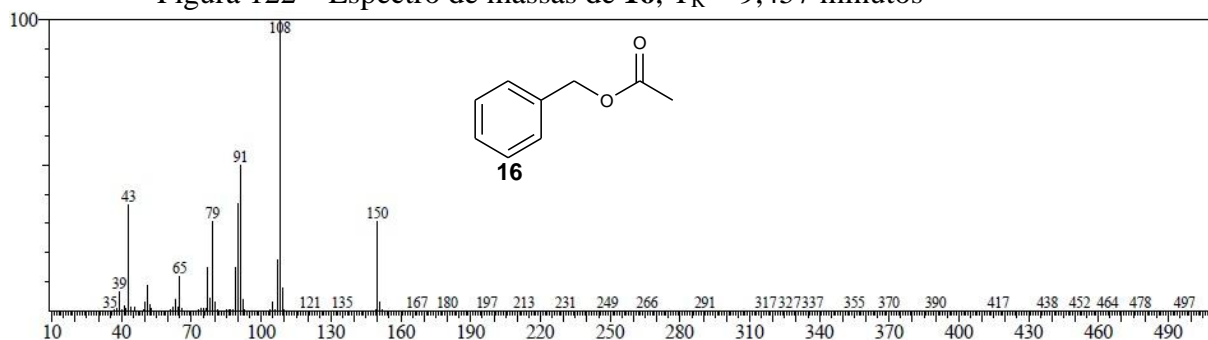




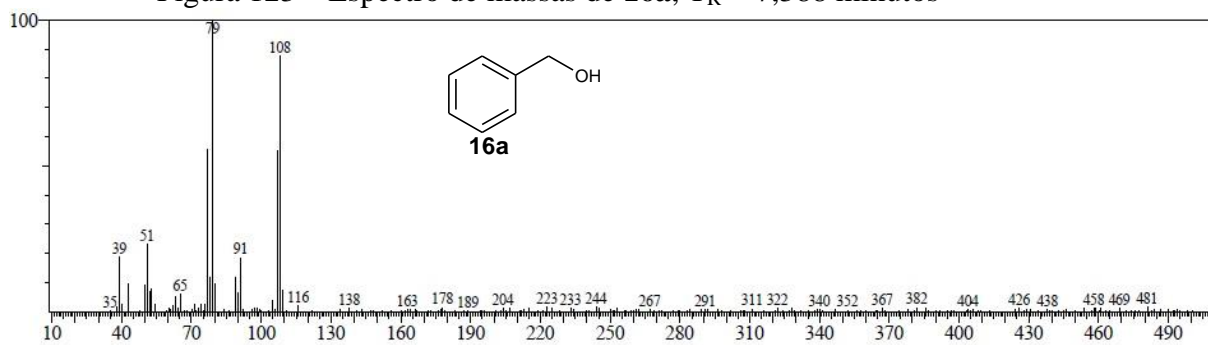
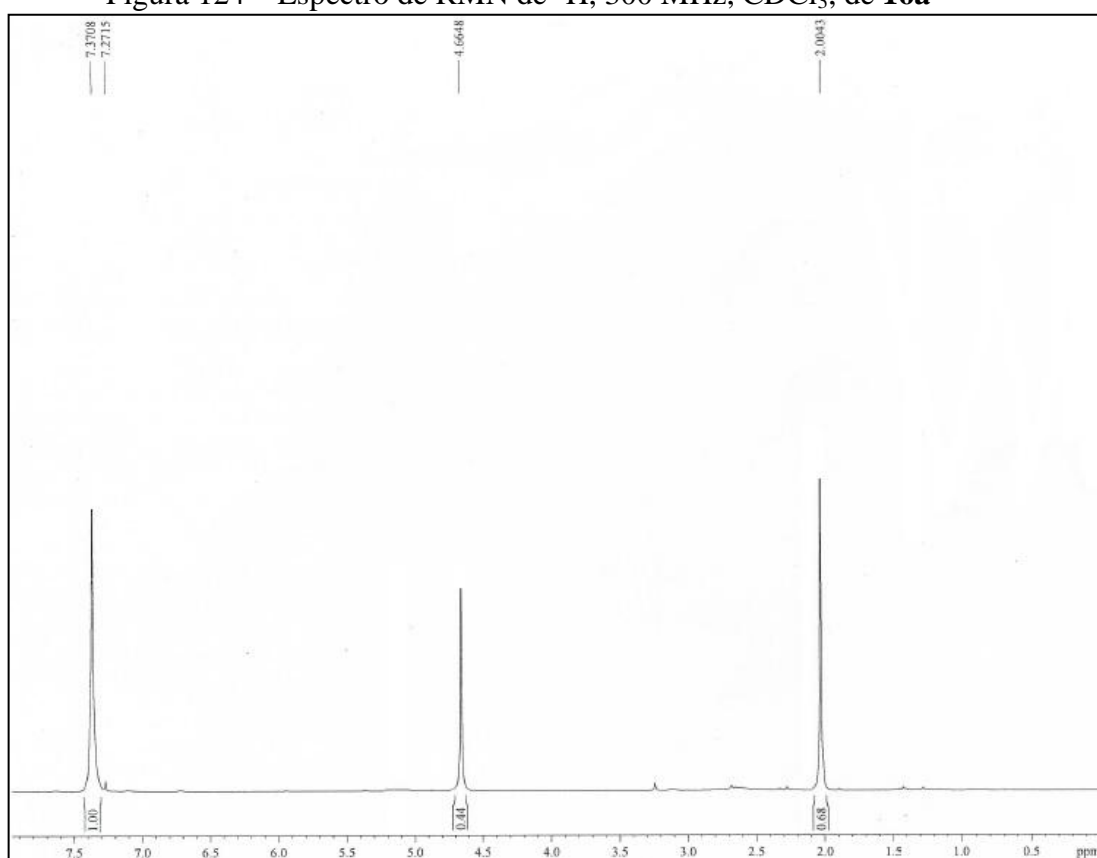
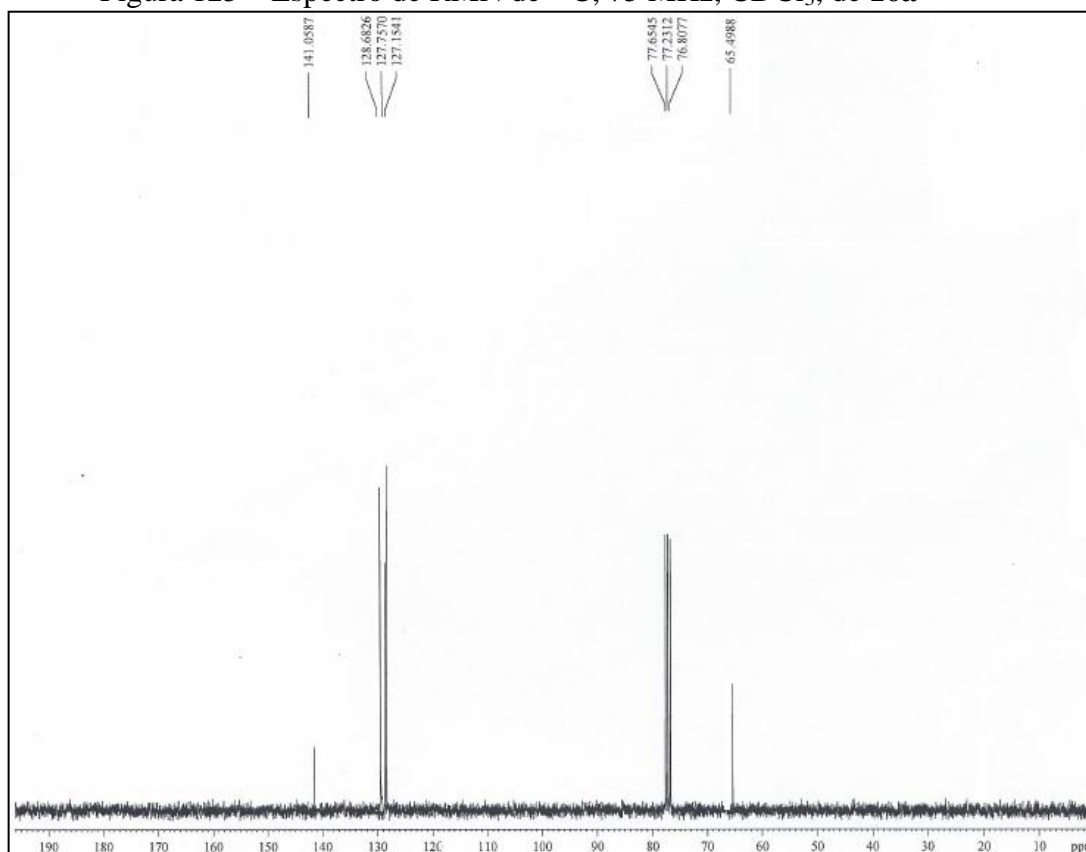
Figura 123 – Espectro de massas de **16a**,  $T_R = 7,388$  minutosFigura 124 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **16a**

Figura 125 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **16a**



A obtenção de **17a** (Figura 126, p. 130) foi detectada, inicialmente, pela comparação entre os espectros de massas de **17** (Figura 127, p. 130) e de **17a** (Figura 128, p. 130) com íons moleculares em  $m/z$  198/200 e 156/158, respectivamente. Por sua vez, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 129, p. 131) de **17a** registrou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  1,41 (d, 6,5 Hz,  $\text{CH}_3$ ), 4,79 [q, 6,4 Hz ( $\text{CH-O}$ )], 7,23 (d, 8,6 Hz) e 7,29 (d, 8,7 Hz), estes dois últimos sinais devidos aos átomos de hidrogênio aromáticos, compatíveis com **17a**. Esta análise foi confirmada pelos seis sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 130, p. 131) [ $\delta_{\text{C}}$  25,3 ( $\text{CH}_3$ ), 69,7 ( $\text{CH-O}$ ), 126,9 (2 $\text{CH=}$ ), 128,6 (2 $\text{CH=}$ ), 133,0 ( $\text{C=}$ ) e 144,4 ( $\text{C=}$ )].

Figura 126 – Cromatograma (CG/EM) do produto **17a** de hidrólise do acetato de 4'-cloro-1-feniletila (**17**) com grãos de *X. americana*

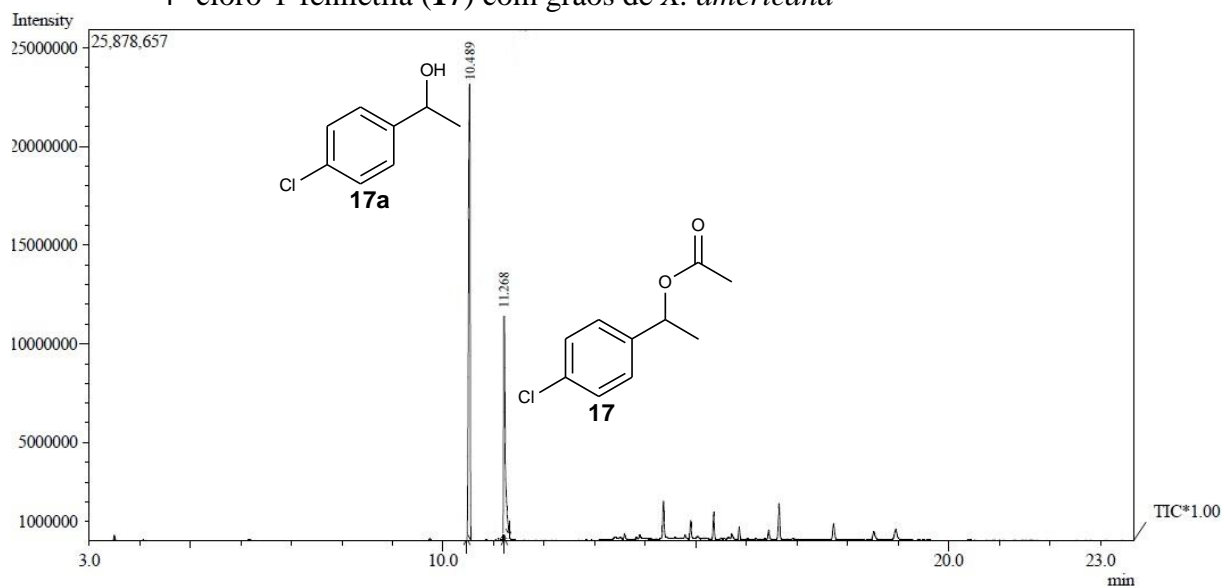


Figura 127 – Espectro de massas de **17**,  $T_R = 11,268$  minutos

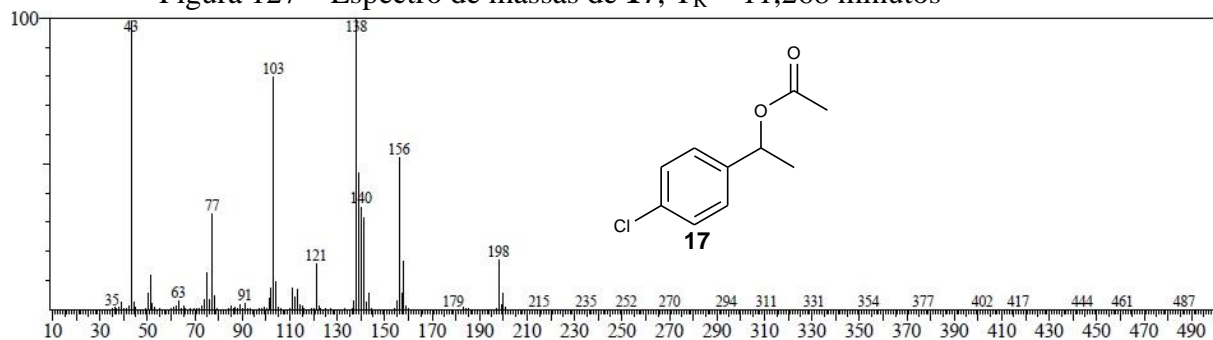


Figura 128 – Espectro de massas de **17a**,  $T_R = 10,489$  minutos

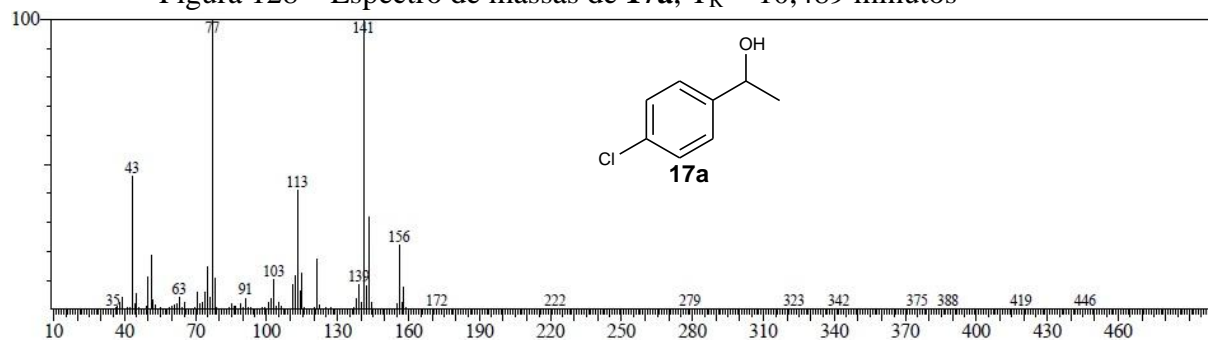
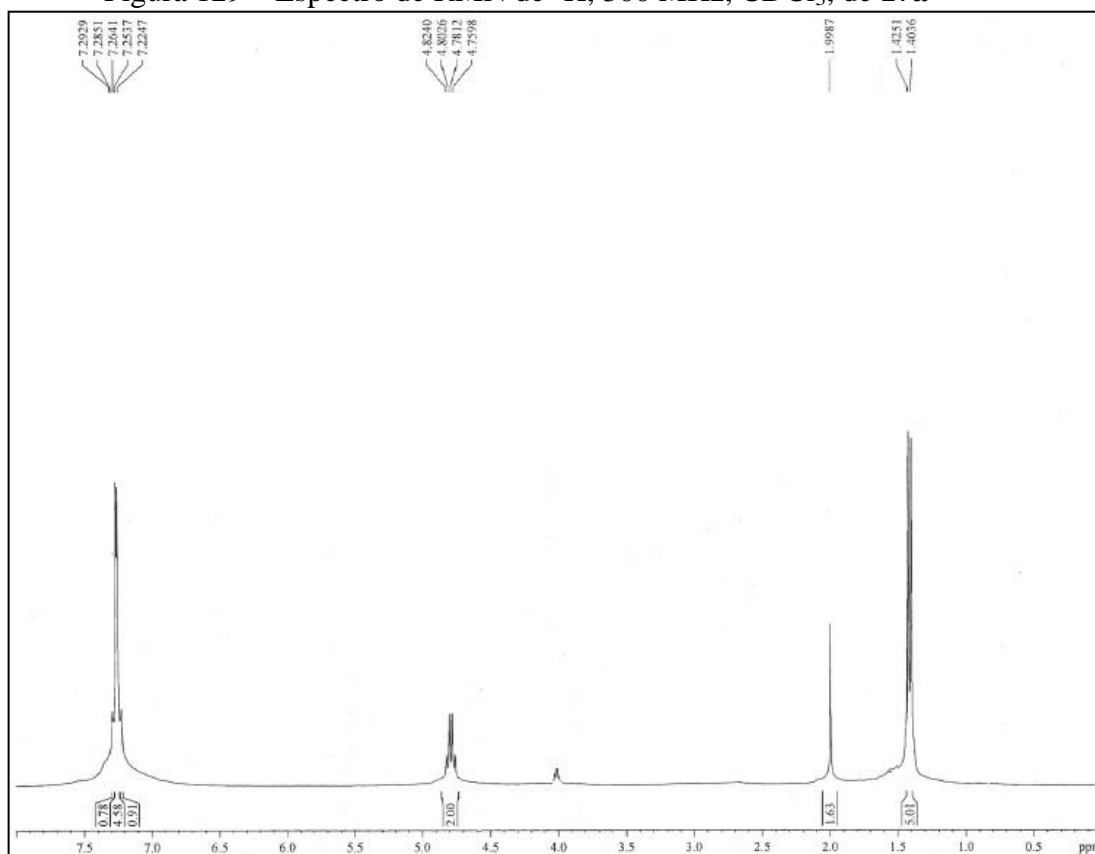
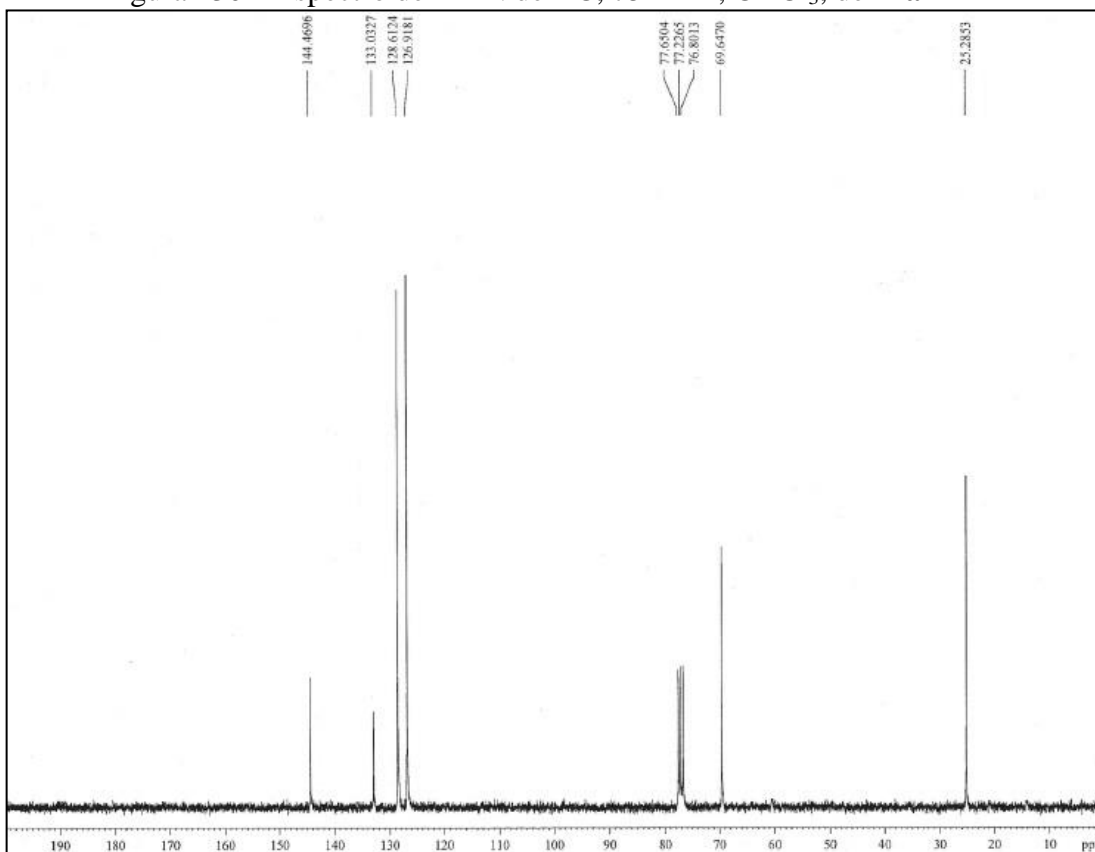
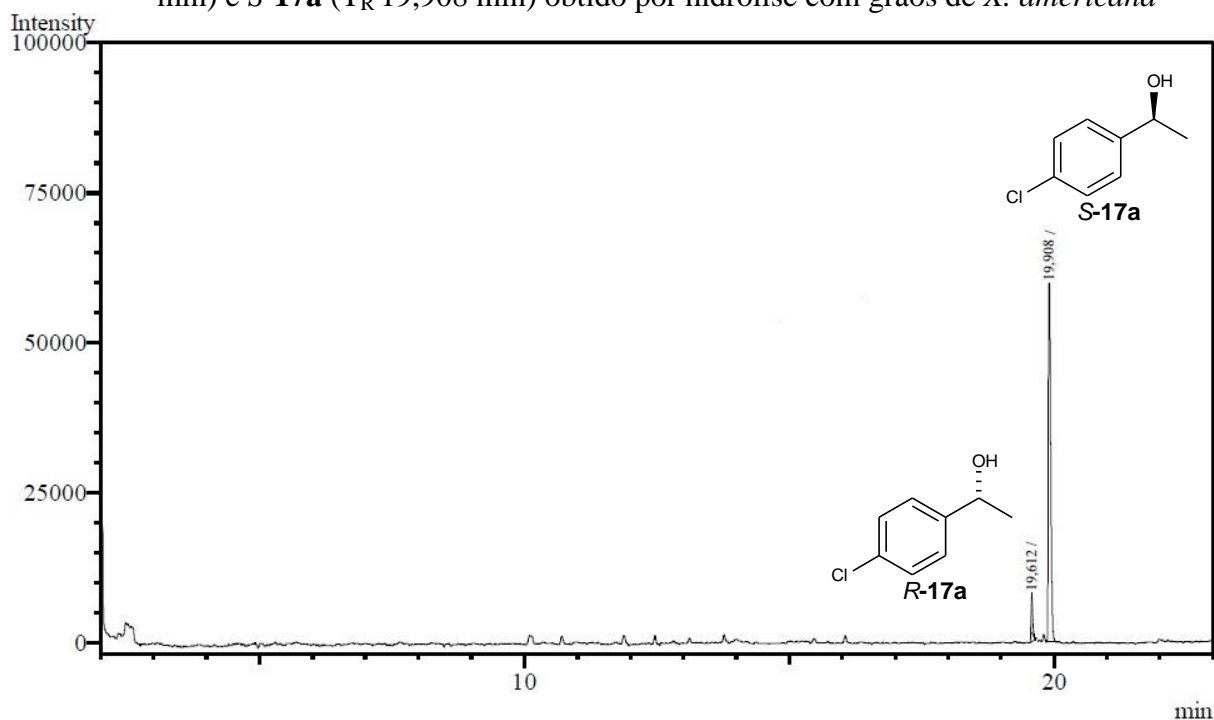


Figura 129 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **17a**Figura 130 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **17a**

A identificação do isômero *S* com *ee* de 87% (Tabela 12, p. 121) foi resolvida mediante a comparação dos tempos de retenção em coluna quiral e área dos picos dos alcoóis **17a** (*R,S*) por injeção em CG/DIC (Figura 131) e mostrou-se em acordo com o modelo de Prelog para a biorredução de cetonas pró-quirais (YADAV *et al.*, 2002).

Figura 131 – Cromatograma CG/DIC da mistura de alcoóis *R*-**17a** ( $T_R$  19,612 min) e *S*-**17a** ( $T_R$  19,908 min) obtido por hidrólise com grãos de *X. americana*



A obtenção de **18a** (Figura 132, p. 133) foi detectada, inicialmente, pela comparação entre os espectros de massas de **18** (Figura 133, p. 133) e de **18a** (Figura 134, p. 133) com íons moleculares em  $m/z$  164 e 122, respectivamente. Por sua vez, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 135, p. 134) de **18a** registrou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  1,48 (d, 6 Hz, 3H), 4,82 (q, 6 Hz, 1H) e 7,30 (sl, 5H), devidos aos átomos de hidrogênios metílico, carbinólico ( $\text{CH-O}$ ) e aromáticos, respectivamente, compatíveis com **18a**. Esta análise foi confirmada pelos seis sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 136, p. 134) [ $\delta_{\text{C}}$  25,0 ( $\text{CH}_3$ ), 69,9 ( $\text{CH-O}$ ), 125,4 (2CH=), 127,1 (CH=), 128,3 (2HC=) e 145,9 (C=)].

Figura 132 – Cromatograma (CG/EM) do produto **18a** de hidrólise do acetato de 1-feniletila (**18**) com grãos de *X. americana*

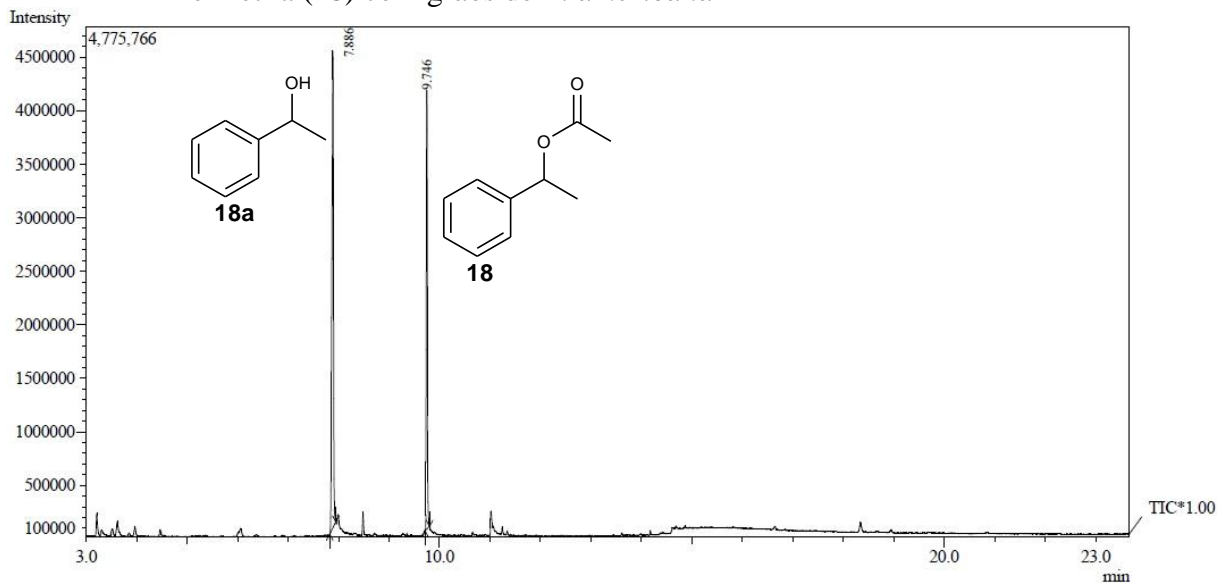


Figura 133 – Espectro de massas de **18**,  $T_R = 9,746$  minutos

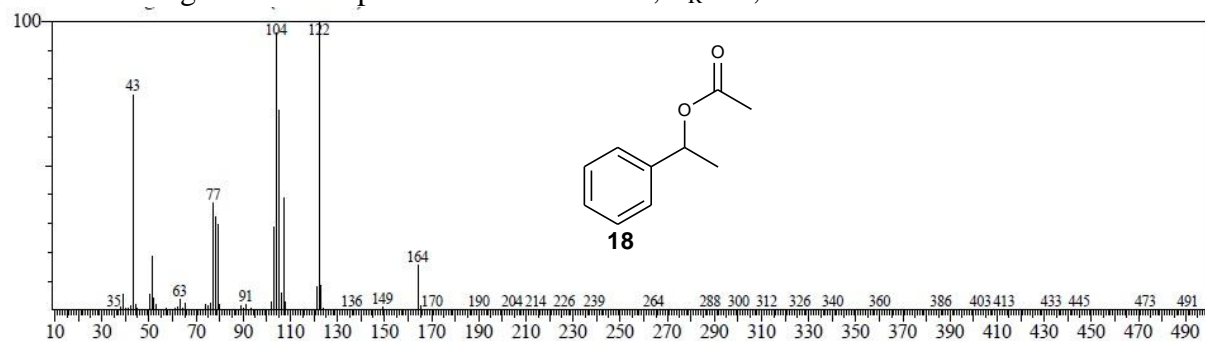


Figura 134 – Espectro de massas de **18a**,  $T_R = 7,886$  minutos

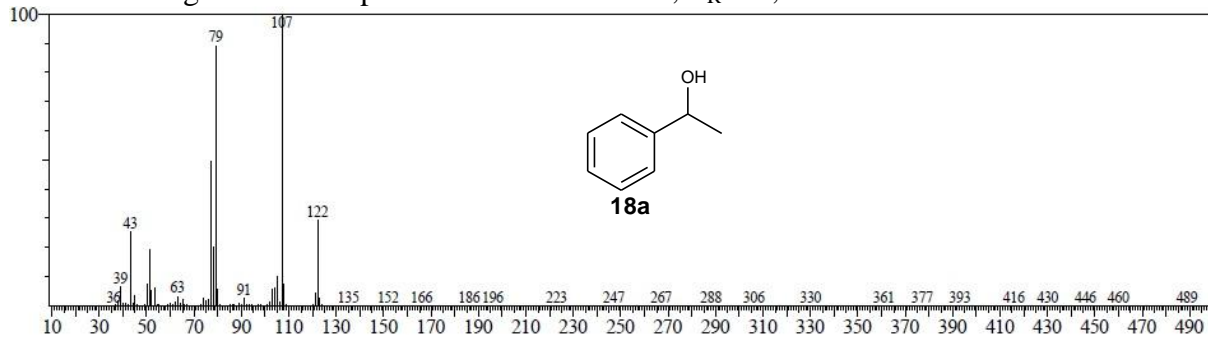
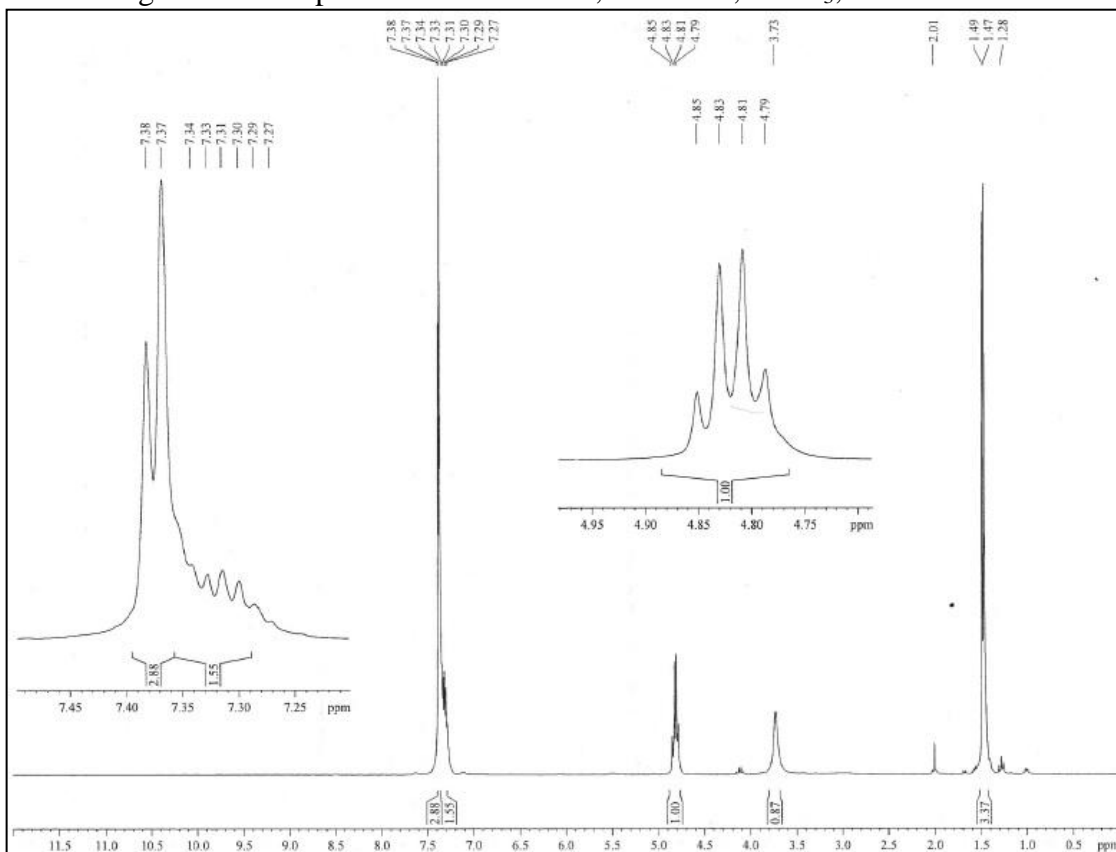
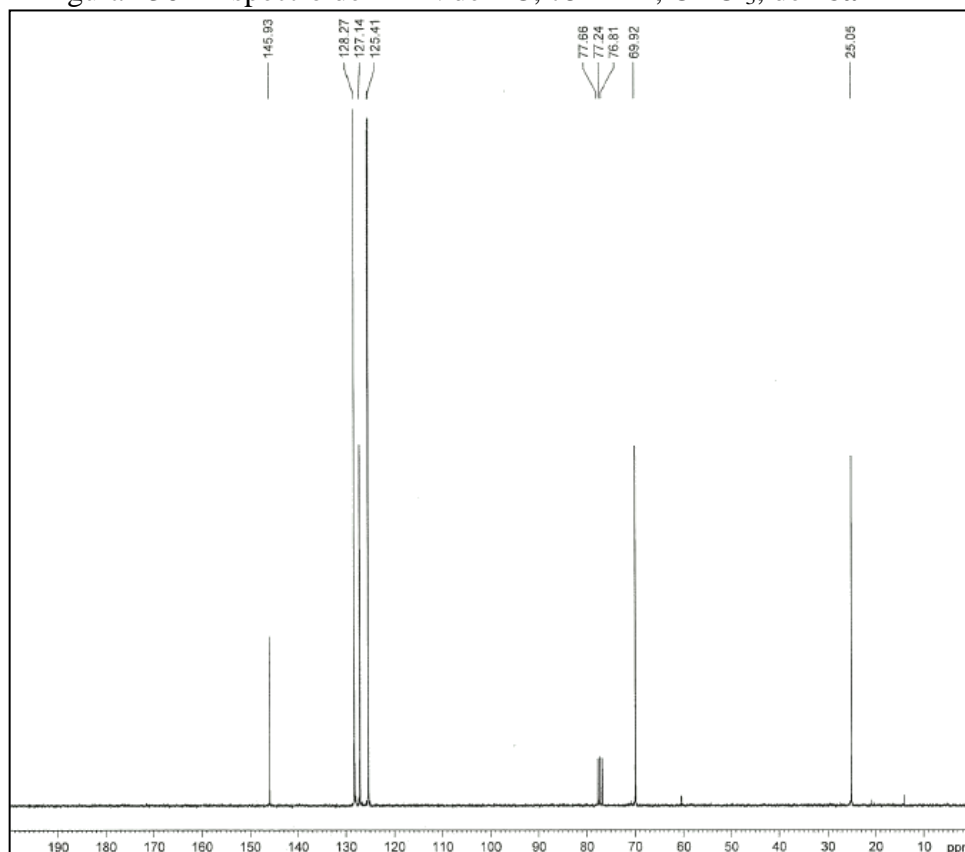
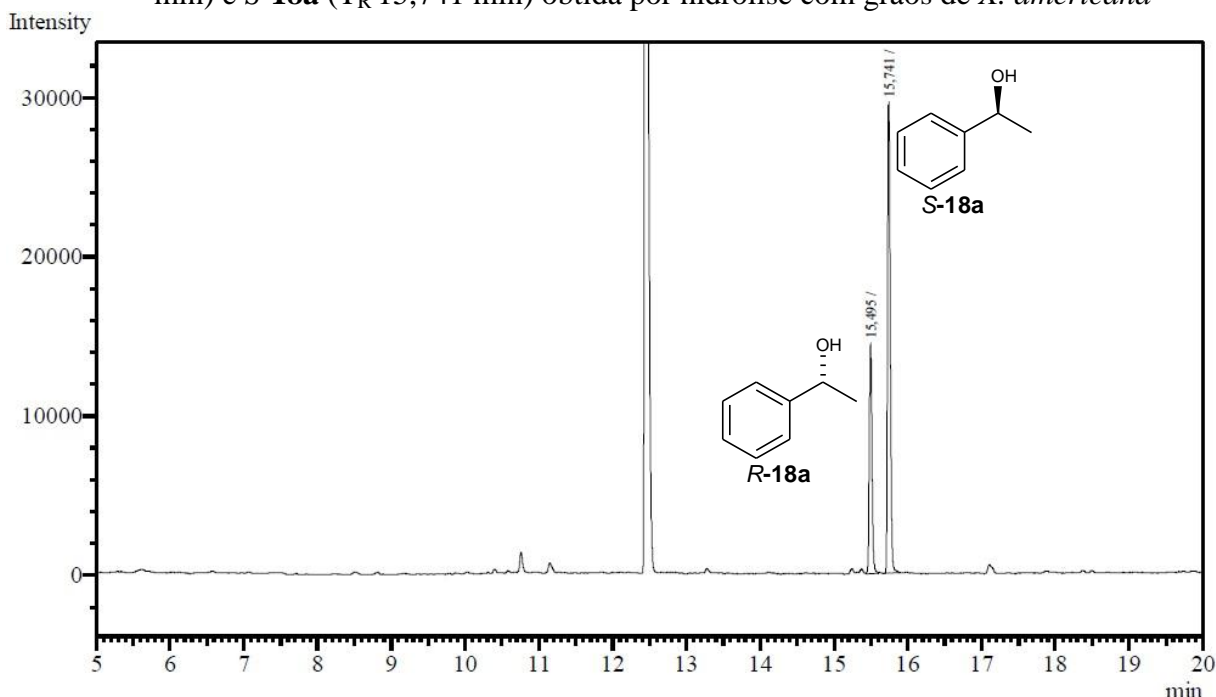


Figura 135 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **18a**Figura 136 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **18a**

A identificação do isômero *S* com *ee* de 34,2% (Tabela 12, p. 121) foi resolvida mediante a comparação dos tempos de retenção em coluna quiral e área dos picos dos alcoóis **18a** (*R,S*) por injeção em CG/DIC (Figura 137) e mostrou-se em acordo com o modelo de Prelog para a biorredução de cetonas pró-quirais (YADAV *et al.*, 2002).

Figura 137 – Cromatograma CG/DIC da mistura de alcoóis *R*-**18a** ( $T_R$  15,495 min) e *S*-**18a** ( $T_R$  15,741 min) obtida por hidrólise com grãos de *X. americana*



Em resumo, as hidrólises ocorreram com valores de médio (58%) a excelentes rendimentos (98%).

### 6.1.5 Esterificação (acilação) de alcoóis

Alguns ésteres apresentam aroma e sabores agradáveis sendo bastante usados nas indústrias alimentícias e cosméticas. Em particular, a acetilação de determinados substratos (alcoóis, amins, fenóis) é de interesse por tornarem os substratos mais solúveis em solventes orgânicos usuais e por “protegerem” os grupos funcionais inerentes. As lipases, enzimas hidrolíticas, podem ser empregadas como catalisadores em reações de esterificação, transesterificação, aminólise e hidrólise e, são as enzimas mais frequentemente usadas na química orgânica (CASTRO *et al.*, 2004). O deslocamento do equilíbrio na reação, no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese), é controlado pela quantidade de água presente na mistura reacional. Entre as várias razões que as tornam uma opção particularmente atrativa,

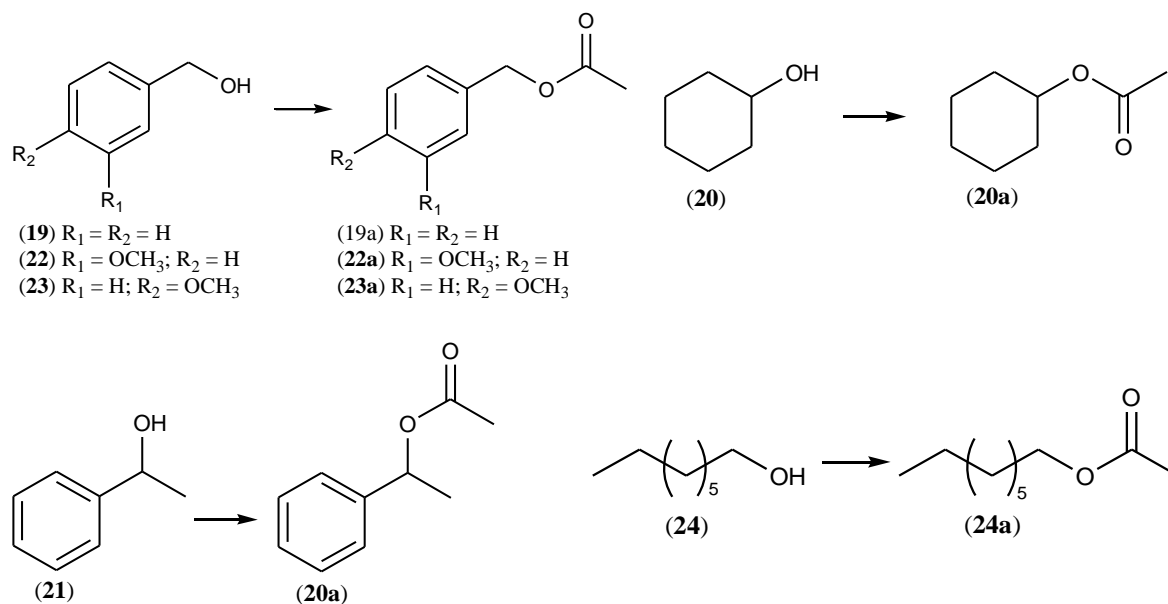


pode-se citar a ampla disponibilidade e a facilidade de uso, pois não necessitam cofatores. Em adição, atuam em uma faixa de pH relativamente grande, são muito estáveis e apresentam especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade. Conseqüentemente, são extensivamente empregadas para aplicações industriais (GUPTA *et al.*, 2015; GOPINATH *et al.*, 2013).

O potencial biocatalítico de *X. americana* em reação de esterificação foi avaliado na acetilação dos alcoóis benzílico (**19**), 3-metoxi-benzílico (**20**), 4-metoxi-benzílico (**21**), 1-fenil-etanol (**22**), ciclohexanol (**23**) e *n*-octanol (**24**) (Esquema 12, p. 137). Inicialmente, utilizando o álcool benzílico (**19**) como substrato padrão, a reação foi efetuada em diferentes condições buscando a otimização do processo tendo em vista melhor conversão (%). Assim, foram variados os parâmetros: quantidade do biocatalisador (0,5, 1,0 e 2,0 g), temperatura (30, 35 e 40 °C), velocidade de agitação (150, 175 e 225 rpm), tempo (24, 48 e 72 h) e reagente doador de grupo acila (anidrido acético, acetato de butila e acetato de vinila). Após tentativas diversificando os valores dos diferentes parâmetros, a incubação de **19** (50 µL; 52 mg, 0,481 mmol) com grãos frescos (2,0 g) em 10 mL de hexano em presença do acetato de vinila (100 µL) a temperatura ambiente (30 °C) com agitação a 225 rpm por 24 horas (item 6.2.5.3, p. 156) mostrou o melhor resultado (>99%). No tocante ao reagente doador de grupo acila, em presença de acetato de butila não houve acetilação e, com anidrido acético, a conversão máxima foi de 80%. Com relação à temperatura, os rendimentos a 30, 35 e 40 °C foram praticamente os mesmos, com opção de conduzir as reações a temperatura ambiente (30 °C).

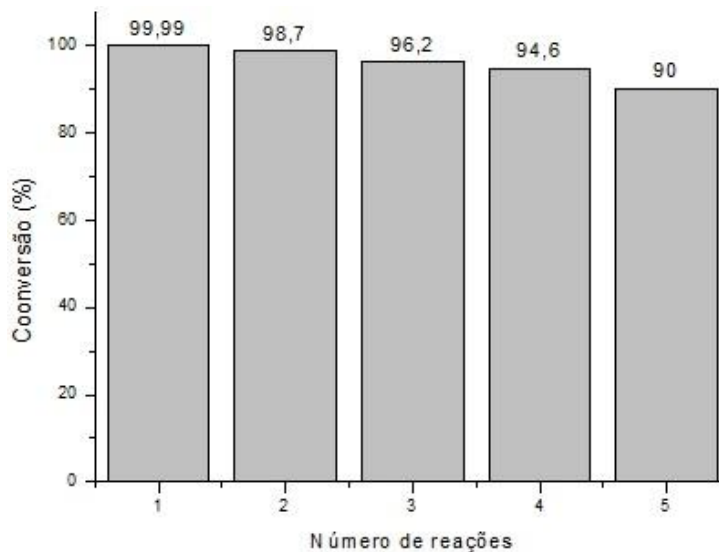
As mesmas quantidades e condições foram utilizadas nas reações de acetilação com os demais substratos: 3-metoxi-benzílico (**20**), 4-metoxi-benzílico (**21**), 1-feniletanol (**22**), ciclohexanol (**23**) e *n*-octanol (**24**). Todas as análises foram realizadas em duplicata. Em adição, objetivando avaliar a capacidade de reuso do biocatalisador, foi observado na reação de acetilação do álcool benzílico que o mesmo material enzimático pode ser reutilizado em até cinco vezes mantendo conversão igual ou maior a 90% (Figura 138, p. 137). Os resultados foram representados na Tabela 13 (p. 137). As reações foram primeiramente analisadas por CCD com visualização por borrficação com solução de vanilina/ácido perclórico em etanol como revelador, sendo observada a formação dos produtos. Em alguns casos foram efetuadas colunas cromatográfica para retirar resquícios de ácidos carboxílicos.

Esquema 12 – Reações de acetilação de alcoóis catalisadas pelos grãos de *X. americana*



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 138 – Rendimentos reacionais das acetilações do álcool benzílico com os grãos de *X. americana*



Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 13 – Percentagens relativas obtidas por CG/EM dos produtos da acetilação de 19–24

Produto	Bioconversão (%)	ee (%)
<b>19a</b>	>99	-
<b>20a</b>	>99	-
<b>21a</b>	>99	-
<b>22a</b>	>99	24,8 ( <i>R</i> )
<b>23a</b>	18	-
<b>24a</b>	40	-

ee = excesso enantiomérico; Fonte: elaborada pelo autor.

A obtenção de **19a** (Figura 139) foi detectada, inicialmente, pela comparação entre os espectros de massas de **19** (Figura 140) e de **19a** (Figura 141, p. 139) com íons moleculares em  $m/z$  1108 e 150, respectivamente. Por sua vez, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 142, p. 139) de **19a** registrou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  2,10 (s, 3H), 5,12 (s, 2H) e 7,34 (s, 5H), devidos aos átomos de hidrogênios metílico, carbinólico ( $\text{CH}_2\text{-O}$ ) e aromáticos, respectivamente, compatíveis com **19a**. Esta análise foi confirmada pelos seis sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 143, p. 140) [ $\delta_{\text{C}}$  20,9 ( $\text{C-CH}_3$ ), 66,3 ( $\text{C-CH}_2\text{-O}$ ), 128,2 (2 $\text{CH=}$ ), 128,3 ( $\text{CH=}$ ), 128,6 (2 $\text{CH=}$ ), 136,0 ( $\text{HC=}$ ) e 170,9 ( $\text{C=O}$ )].

Figura 139 – Cromatograma (GC/EM) do produto **19a** de acetilação do álcool benzílico (**19**) com grãos de *X. americana*

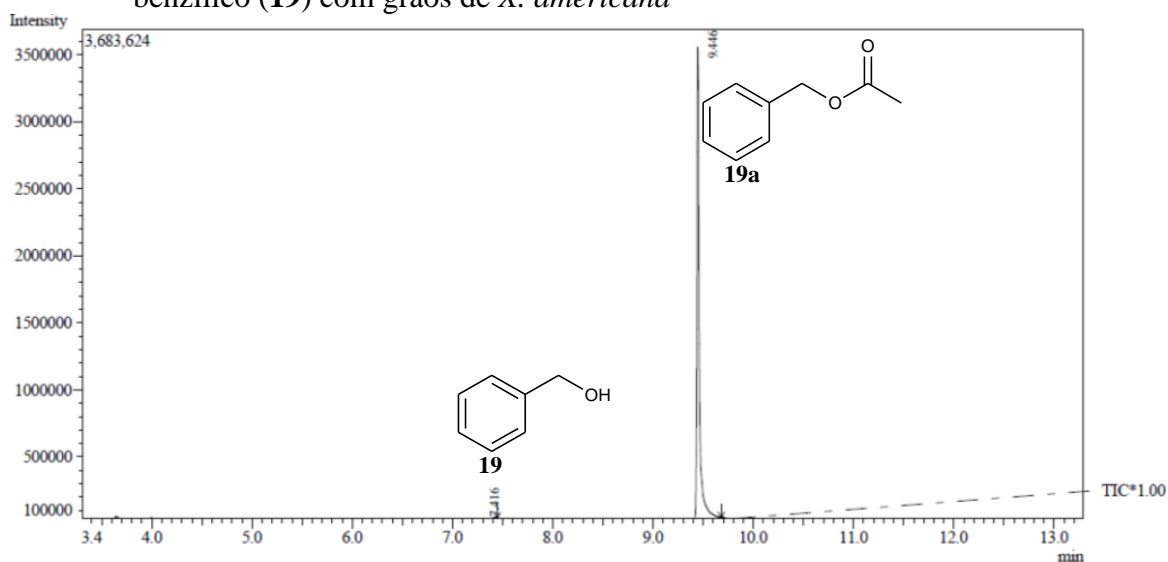


Figura 140 – Espectro de massas de **19**,  $T_{\text{R}} = 7,416$  minutos

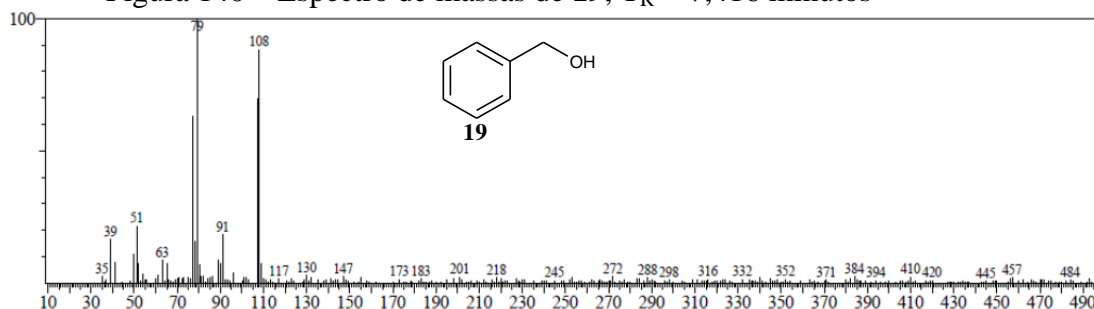


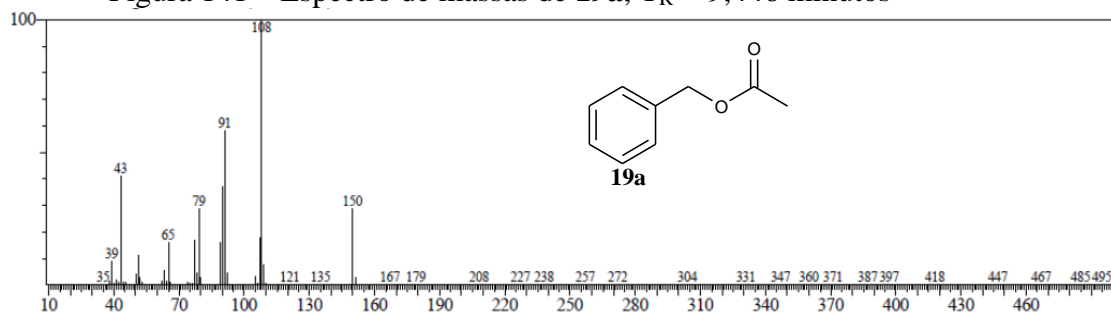
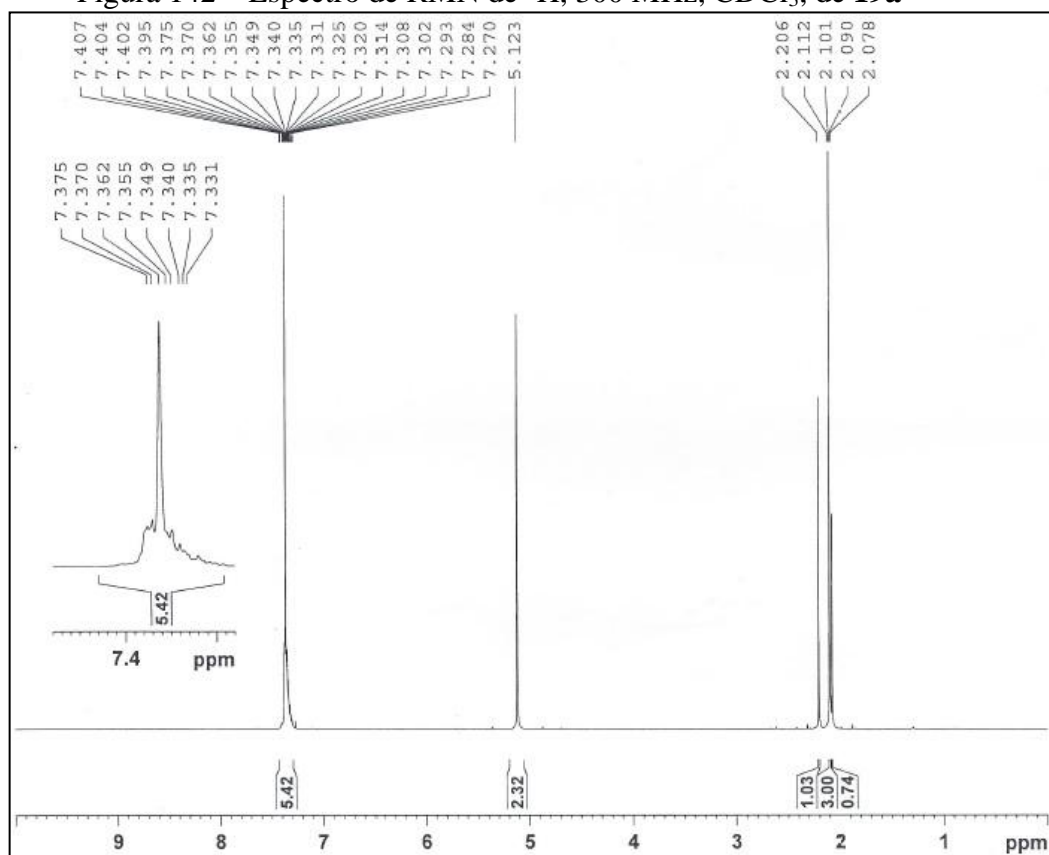
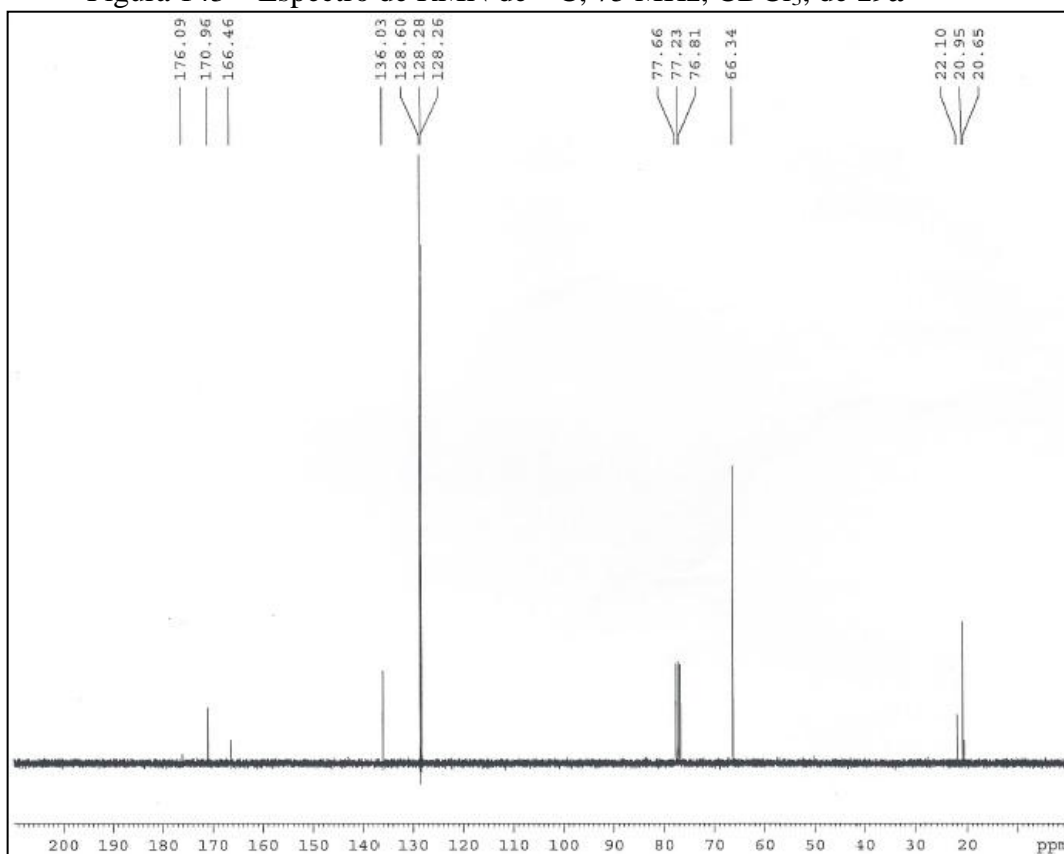
Figura 141 – Espectro de massas de **19a**,  $T_R = 9,446$  minutosFigura 142 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **19a**

Figura 143 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **19a**



A obtenção de **20a** (Figura 144, p. 141) foi detectada, inicialmente, pela comparação entre os espectros de massas de **20** (Figura 145, p. 141) e de **20a** (Figura 146, p. 141) com íons moleculares em  $m/z$  138 e 180, respectivamente. Por sua vez, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 147, p. 142) de **20a** registrou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  2,24 (s,  $\text{CH}_3$ ), 3,87 (s,  $\text{CH}_3\text{-O}$ ), 5,18 (s,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 6,82 (m, 3H) e 7,40 (dl, 1H), sendo os dois últimos sinais devidos aos átomos de hidrogênios aromáticos, compatíveis com **20a**. Esta análise foi confirmada pelos dez sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 148, p. 142) [ $\delta_{\text{C}}$  21,2 ( $\text{CH}_3$ ), 55,6 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 66,5 ( $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 114,5/121,6/123,6/130,2/137,9/160,3 e 171,0 (C=O)].

Figura 144 – Cromatograma (CG/EM) do produto **20a** de acetilação do álcool 3-metoxibenzílico (**20**) com grãos de *X. americana*

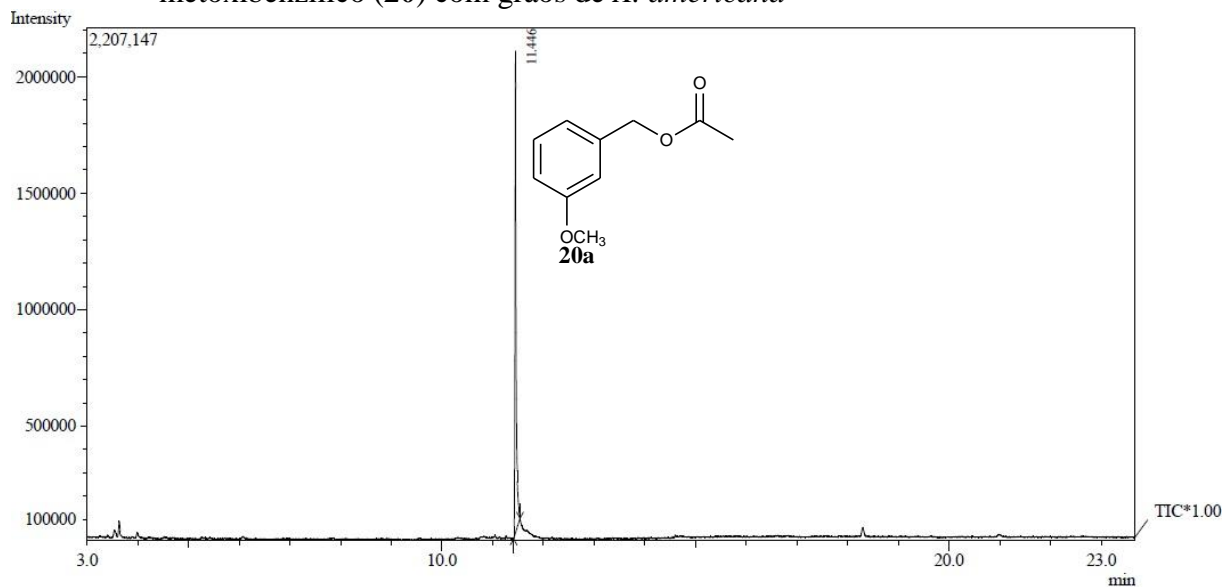


Figura 145 – Espectro de massas de **20**,  $T_R = 10,730$  minutos

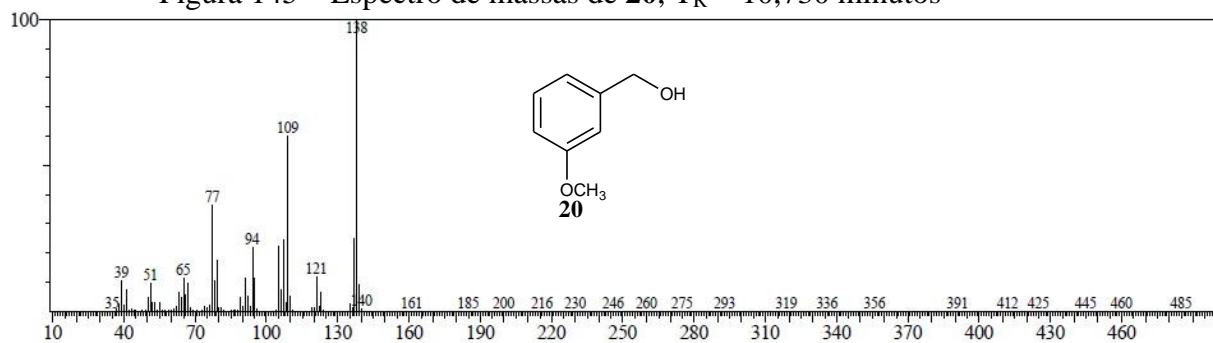


Figura 146 – Espectro de massas de **20a**,  $T_R = 11,446$  minutos

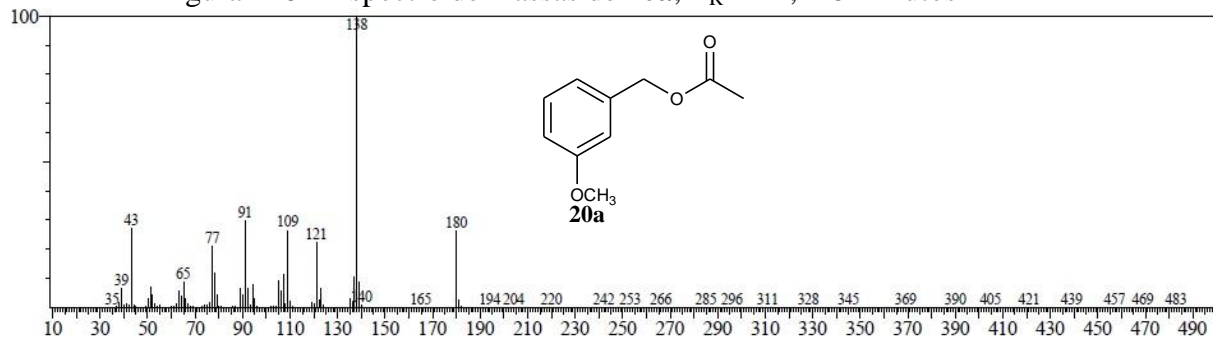


Figura 147 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **20a**

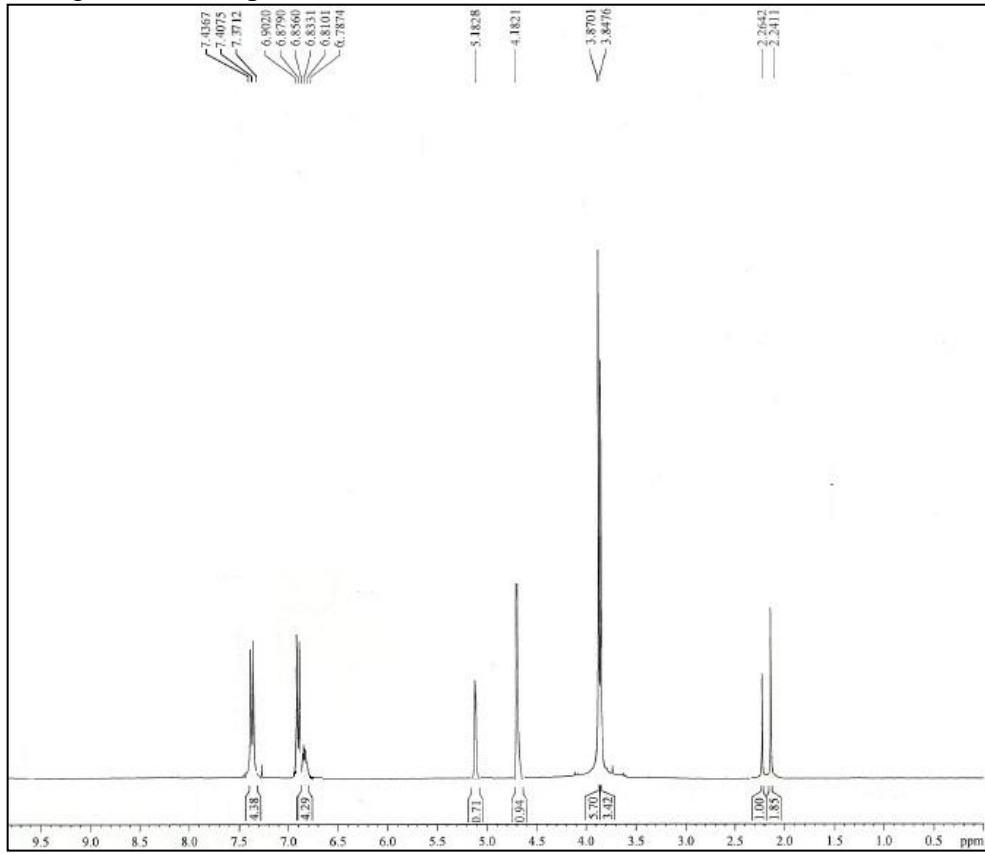
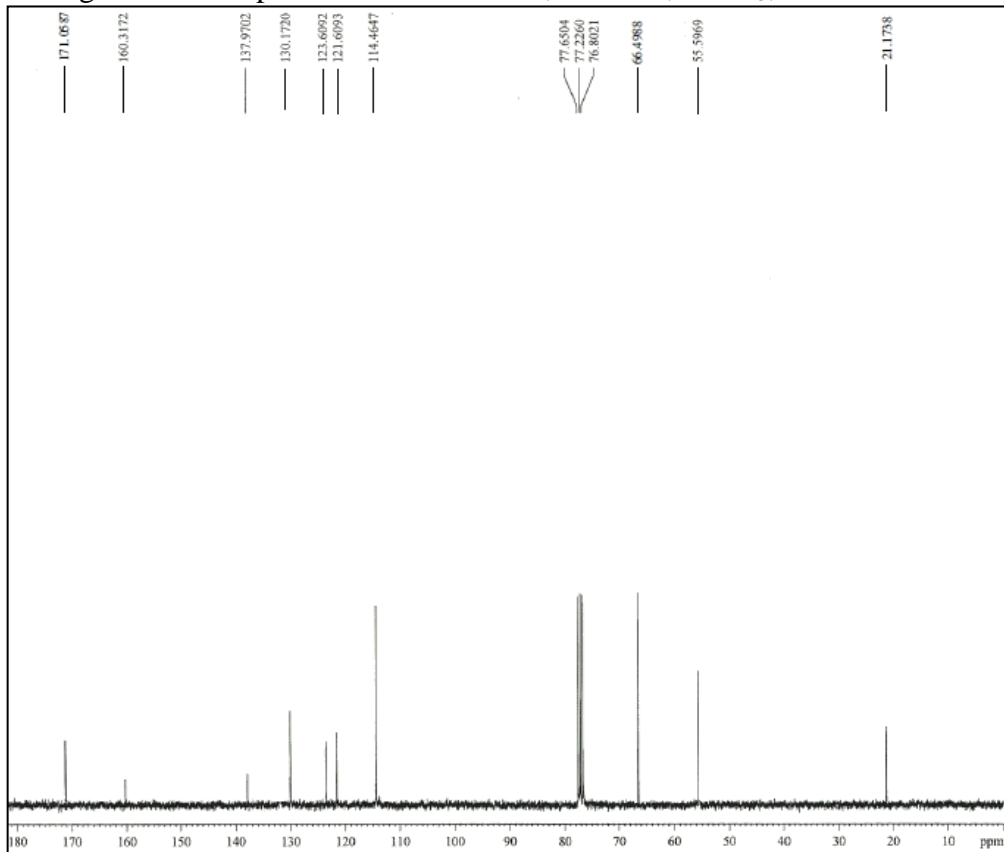


Figura 148 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **20a**



A obtenção de **21a** (Figura 149) foi detectada, inicialmente, pela comparação entre os espectros de massas de **21** (Figura 150) e de **21a** (Figura 151, p. 144) com íons moleculares em  $m/z$  138 e 180, respectivamente. Por sua vez, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 152, p. 144) de **21a** registrou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  2,11 (s, 3H), 3,87 [s, 3H, (CH<sub>3</sub>O)], 5,12 [s, 2H (CH<sub>2</sub>-O)], 6,99 (d, 2H) e 7,55 (d, 2H), sendo os dois últimos sinais devidos aos átomos de hidrogênios aromáticos, compatíveis com **21a**. Esta análise foi confirmada pelos oito sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 153, p. 145) [ $\delta_{\text{C}}$  21,2 (CH<sub>3</sub>), 55,5 (CH<sub>3</sub>O), 65,1 (CH<sub>2</sub>-O), 113,9/128,6/129,6/159,3 e 171,8 (C=O)].

Figura 149 – Cromatograma (CG/EM) do produto **21a** de acetilação do álcool 4-metoxibenzila (**21**) com grãos de *X. americana*

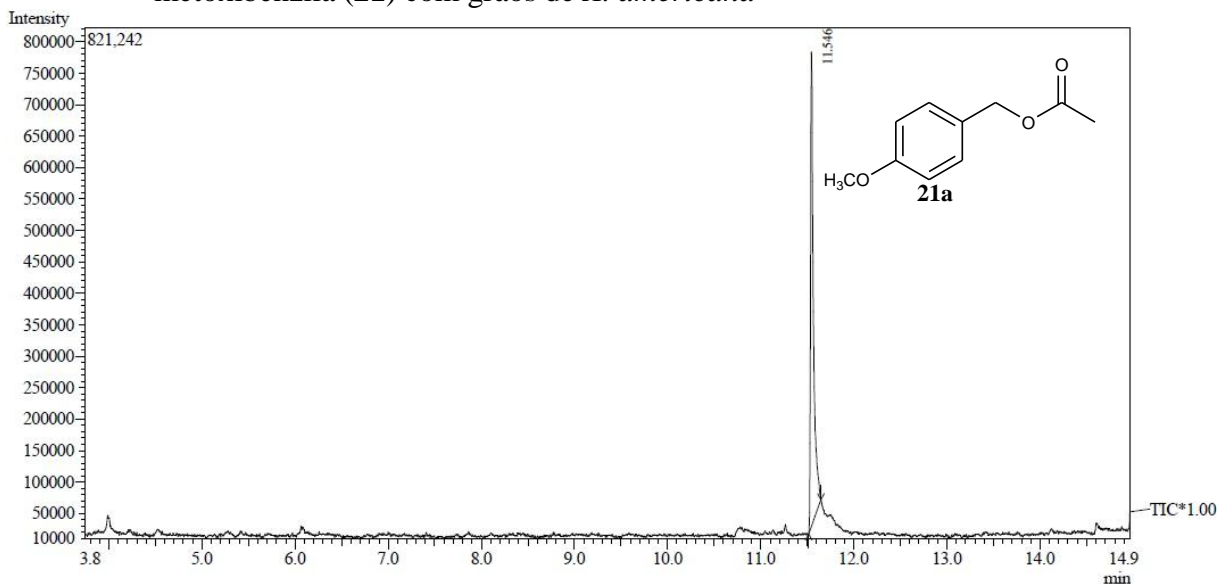


Figura 150 – Espectro de massas de **21**,  $T_{\text{R}} = 10,694$  minutos

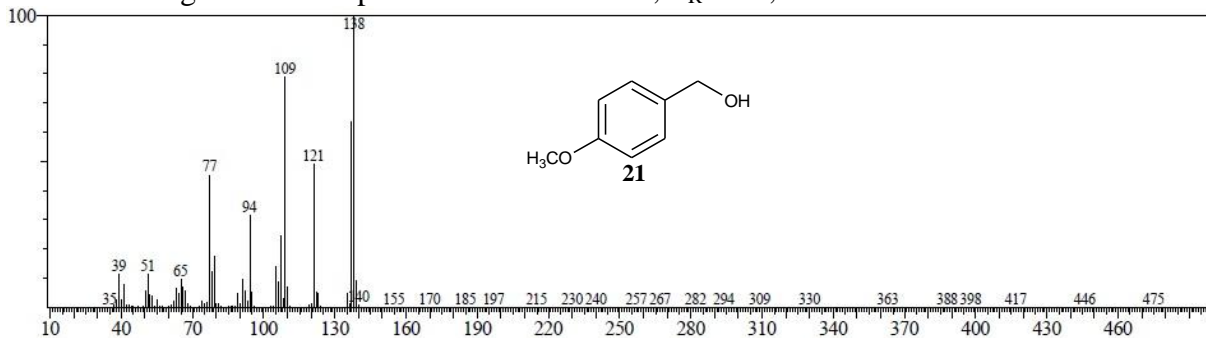




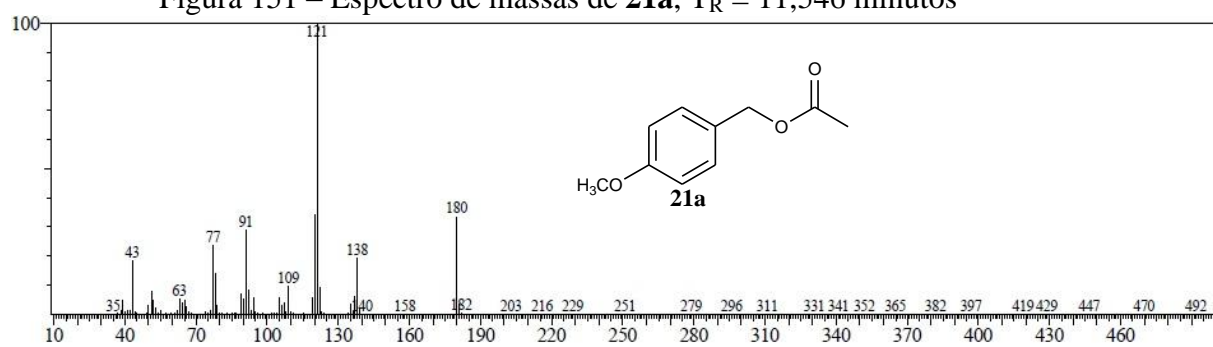
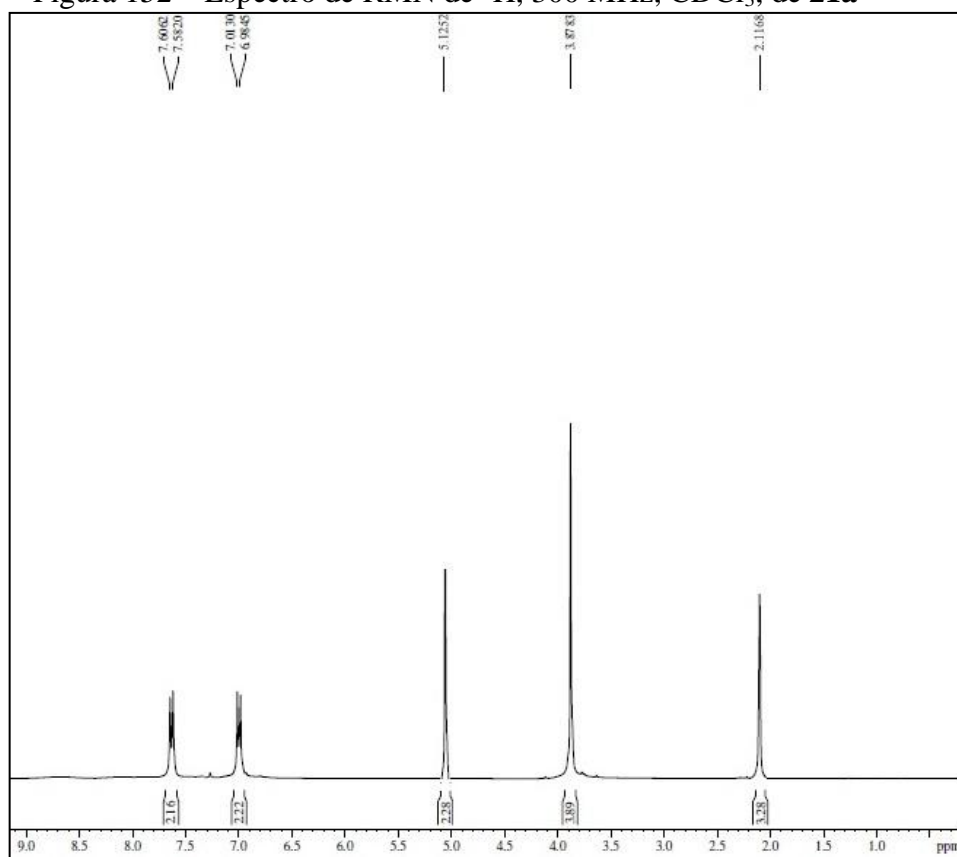
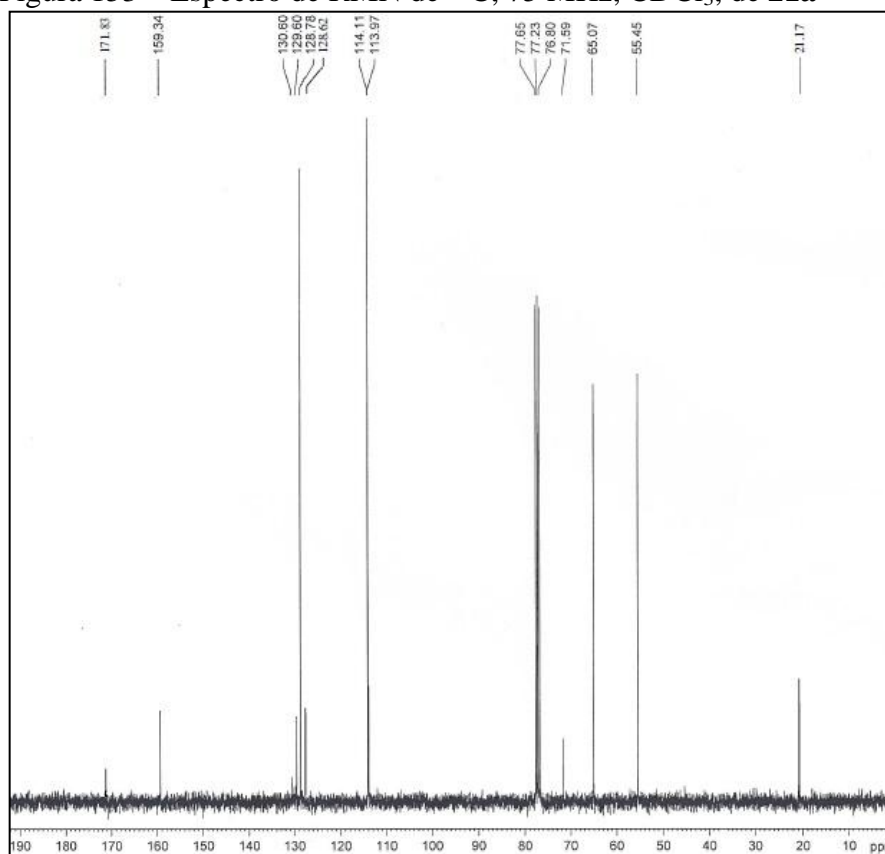
Figura 151 – Espectro de massas de **21a**,  $T_R = 11,546$  minutosFigura 152 – Espectro de RMN de  $^1H$ , 300 MHz,  $CDCl_3$ , de **21a**

Figura 153 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **21a**



A obtenção de **22a** (Figura 154, p. 146) foi detectada, inicialmente, pela comparação entre os espectros de massas de **22** (Figura 155, p. 146) e de **22a** (Figura 156, p. 146) com íons moleculares em  $m/z$  122 e 164, respectivamente. Por sua vez, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 157, p. 147) de **22a** registrou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  1,53 (d, 6,0 Hz, 3H), 2,02 (s, 3H), 5,87 [q, 1H, (CH-O)], 7,30 (sl, 5H), compatíveis com **22a**. Esta análise foi confirmada pelos oito sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 158, p. 147) [ $\delta_{\text{C}}$  21,9 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 22,3 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 72,5 ( $\underline{\text{C}}\text{H-O}$ ), 126,2 ( $2\underline{\text{C}}\text{H=}$ ), 127,9 ( $\text{CH=}$ ), 128,8 ( $2\text{CH=}$ ), 141,8 ( $\text{C=}$ ) e 170,4 ( $\text{C=O}$ ).

Figura 154 – Cromatograma (GC/EM) do produto **22a** de acetilação do 1-feniletanol (**22**) com grãos de *X. americana*

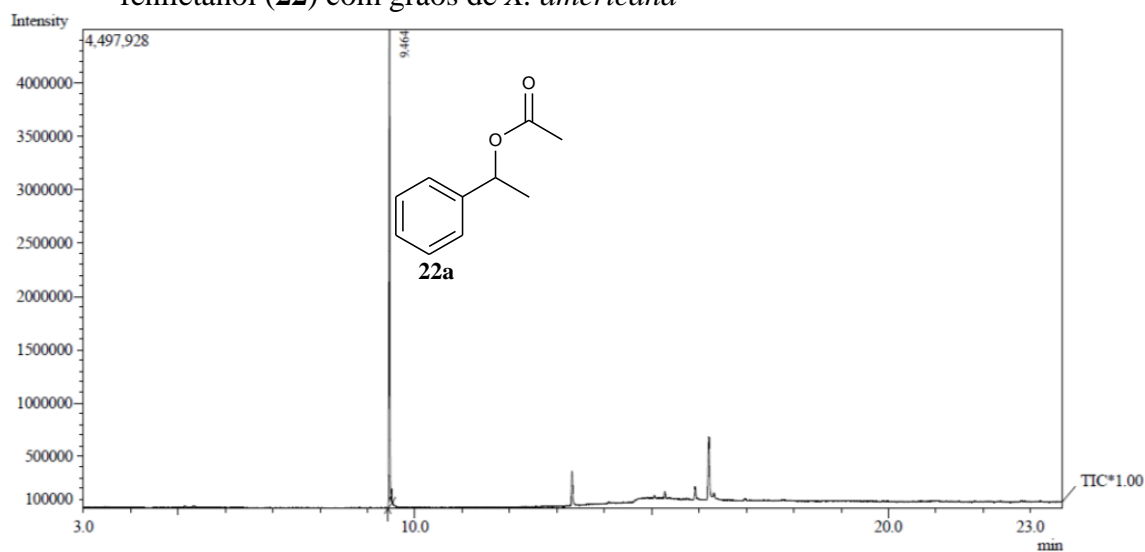


Figura 155 – Espectro de massas de **22**,  $T_R = 7,915$  minutos

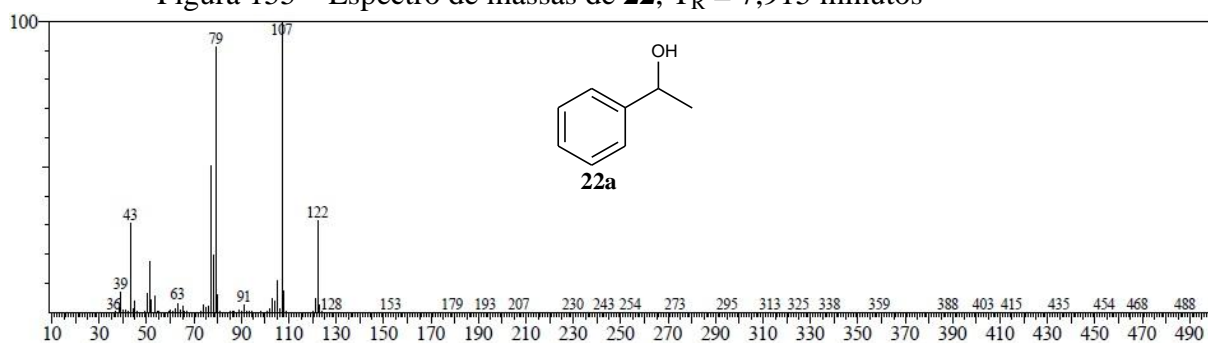


Figura 156 – Espectro de massas de **22a**,  $T_R = 9,464$  minutos

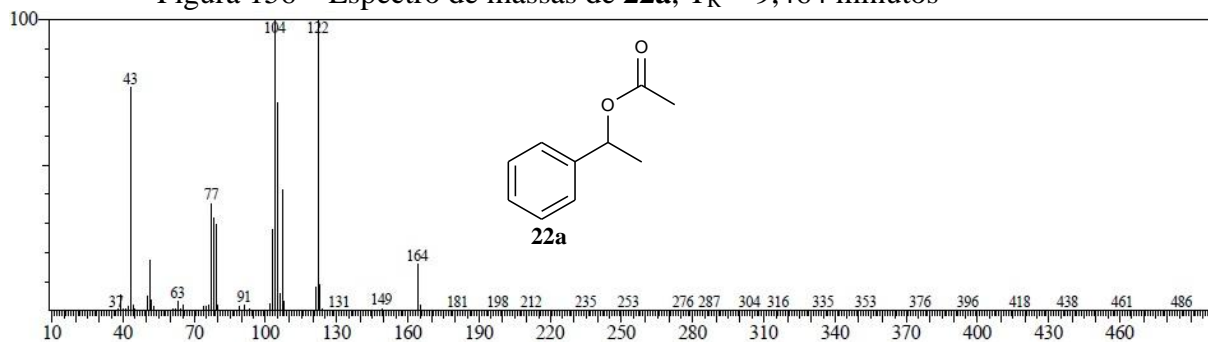
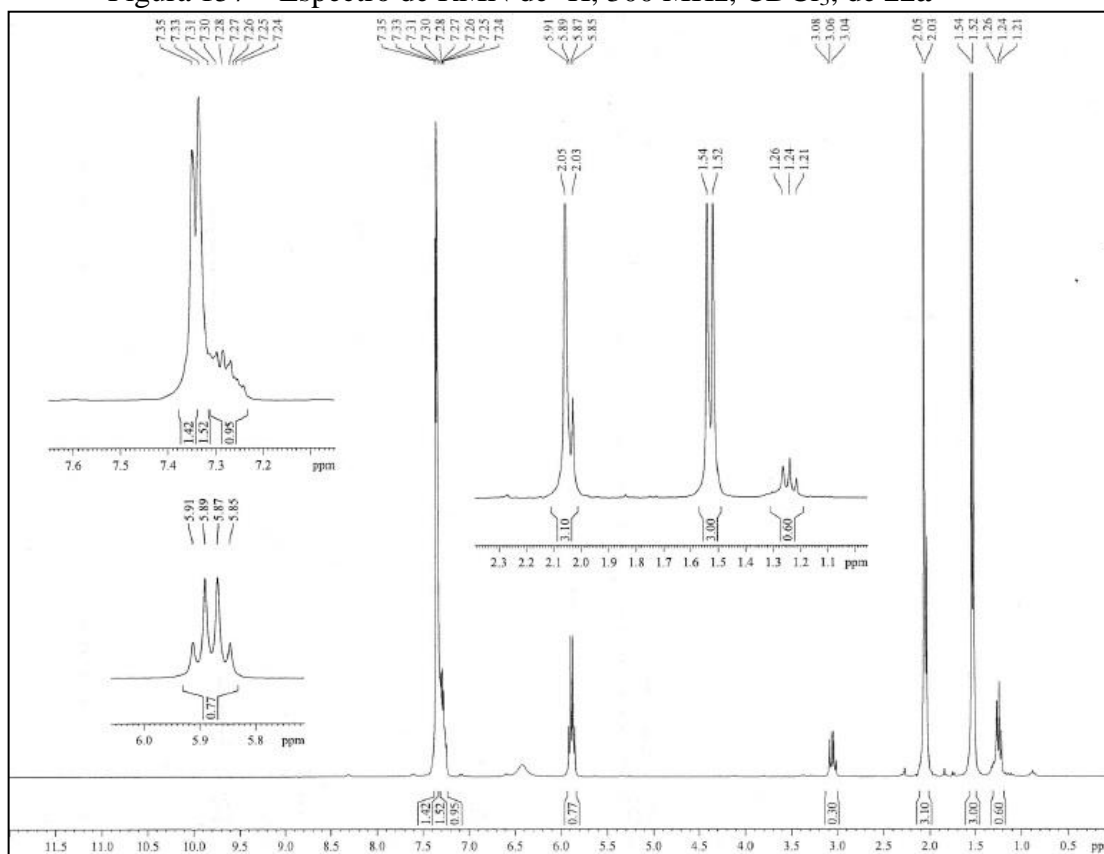
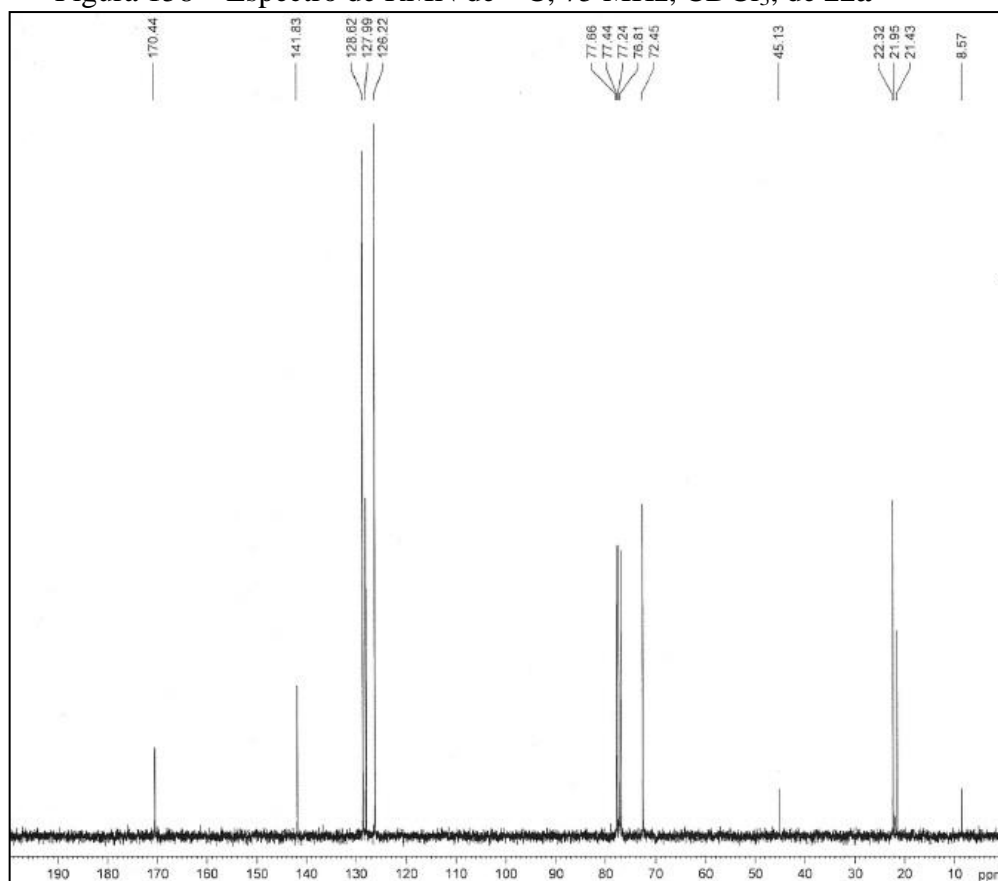
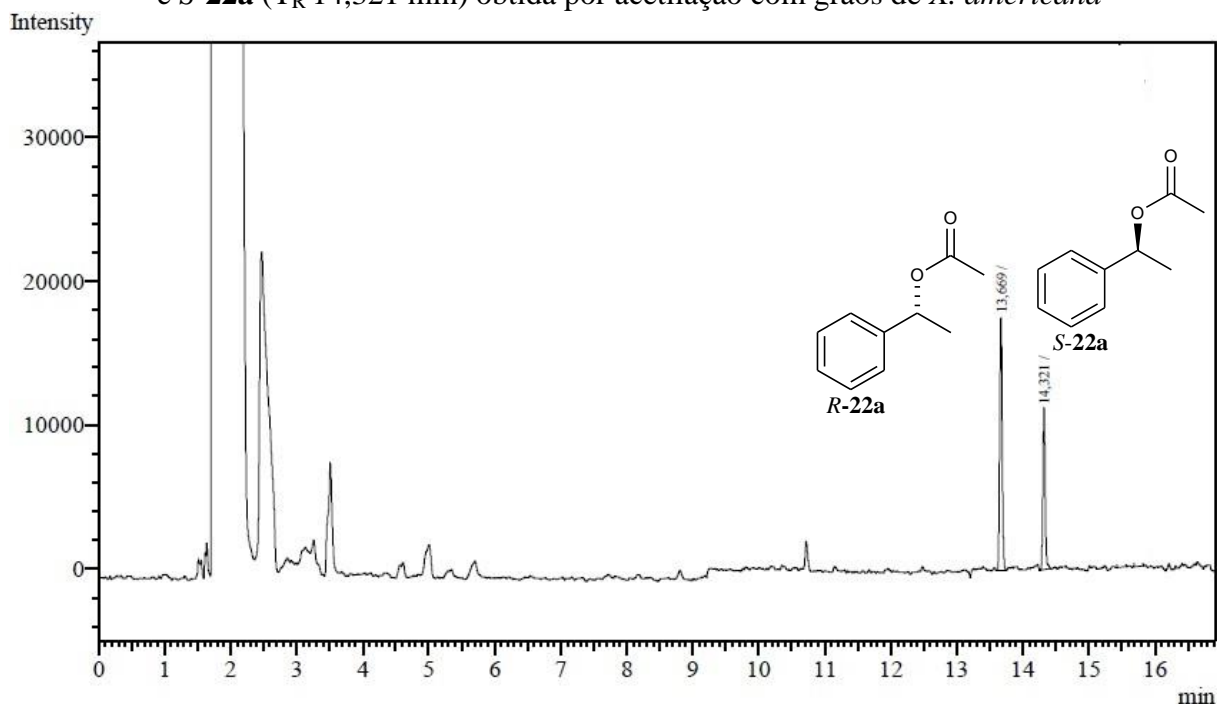


Figura 157 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **22a**Figura 158 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **22a**

A identificação do isômero *R* com *ee* de 24,8% (Tabela 13, p. 137) foi resolvida mediante a comparação dos tempos de retenção e área dos picos dos ésteres **22a** (*R,S*) por injeção em CG/DIC (Figura 159) e não mostrou-se em acordo com o modelo de Prelog para a biorredução de cetonas pró-quirais (YADAV *et al.*, 2002).

Figura 159 – Cromatograma CG/DIC da mistura de ésteres *R-22a* ( $T_R$  13,669 min) e *S-22a* ( $T_R$  14,321 min) obtida por acetilação com grãos de *X. americana*



A obtenção de **23a** (Figura 160, p. 149) foi detectada, inicialmente, pela comparação entre os espectros de massas de **23** (Figura 161, p. 149) e de **23a** (Figura 162, p. 149). Não foi observado o pico referente ao peso molecular esperado ( $m/z$  142) do produto **23a** (Figura 162, p. 149). Entretanto, o pico em  $m/z$  82 pode ser explicado devido à fragmentação do tipo retro Diels-Alder em função da perda de  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$  (M-60). Por sua vez, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 163, p. 150) de **23a** registrou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  2,08 (s, 3H) e 3,59 [m, 1H (CH-O)], entre outros, compatíveis com **23a**. Esta análise foi confirmada pelos seis sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 164, p. 150) [ $\delta_{\text{C}}$  24,3 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 25,6/33,1/35,6 ( $3\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ), 70,4 ( $\underline{\text{C}}\text{H-O}$ ) e 171,0 (C=O)].

Figura 160 – Cromatograma (GC/EM) do produto **23a** de redução do cicloexanol (**23**) com os grãos de *X. americana*

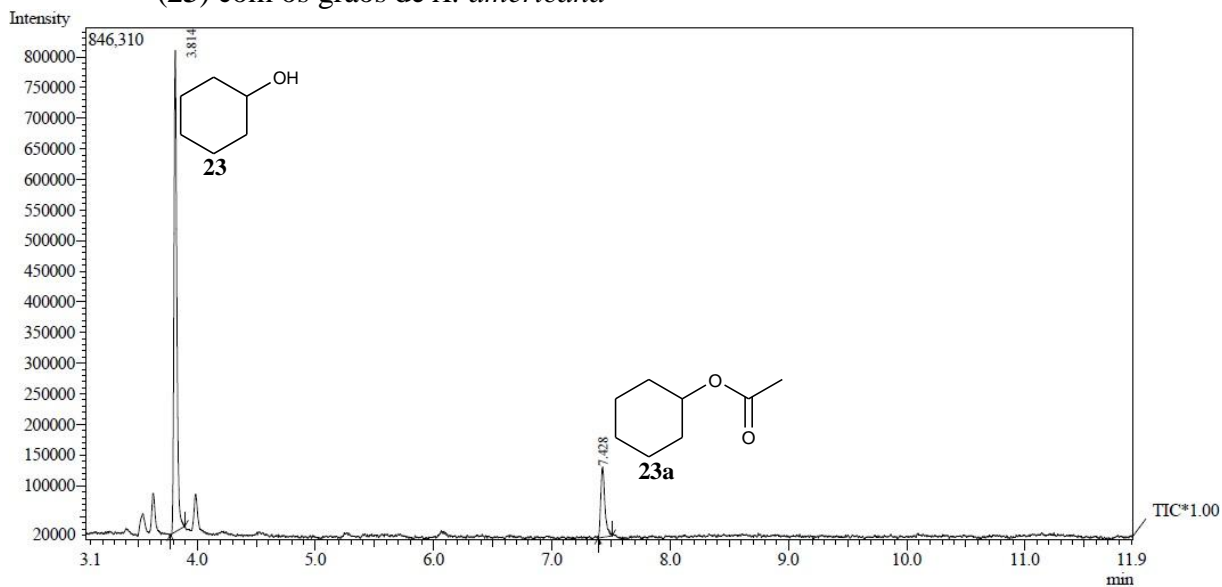


Figura 161 – Espectro de massas de **23**,  $T_R = 3,814$  minutos

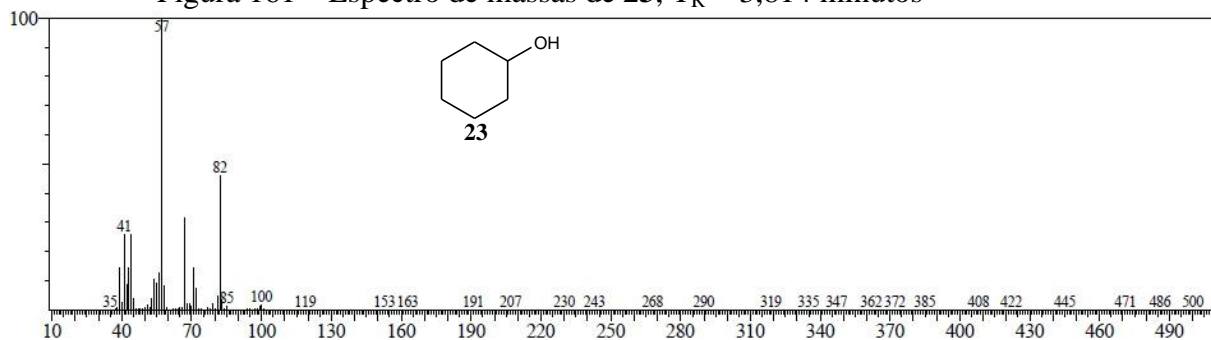


Figura 162 – Espectro de massas de **23a**,  $T_R = 7,428$  minutos

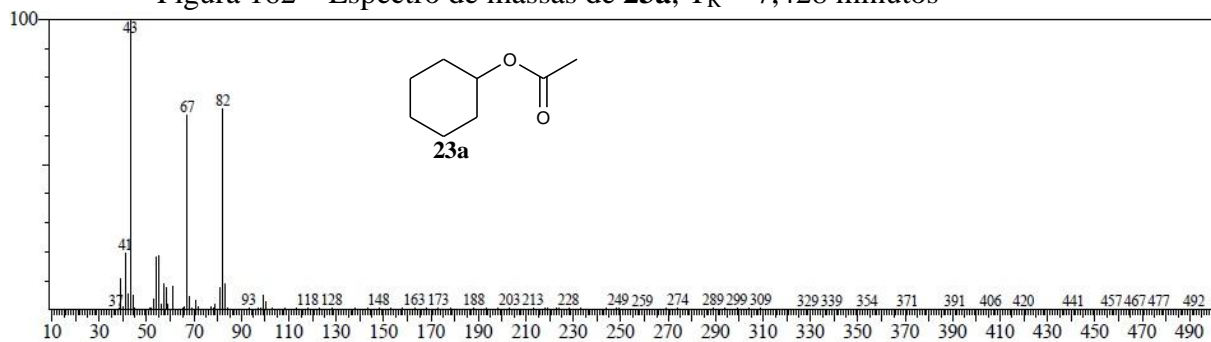
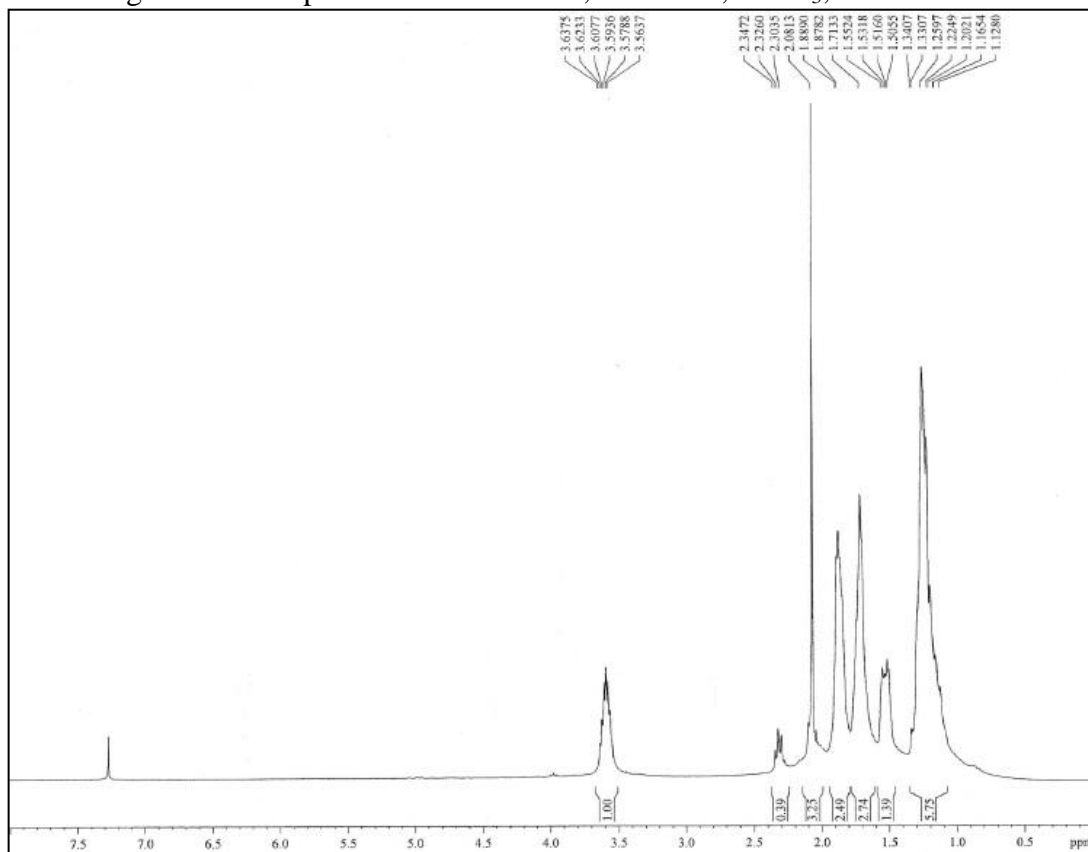
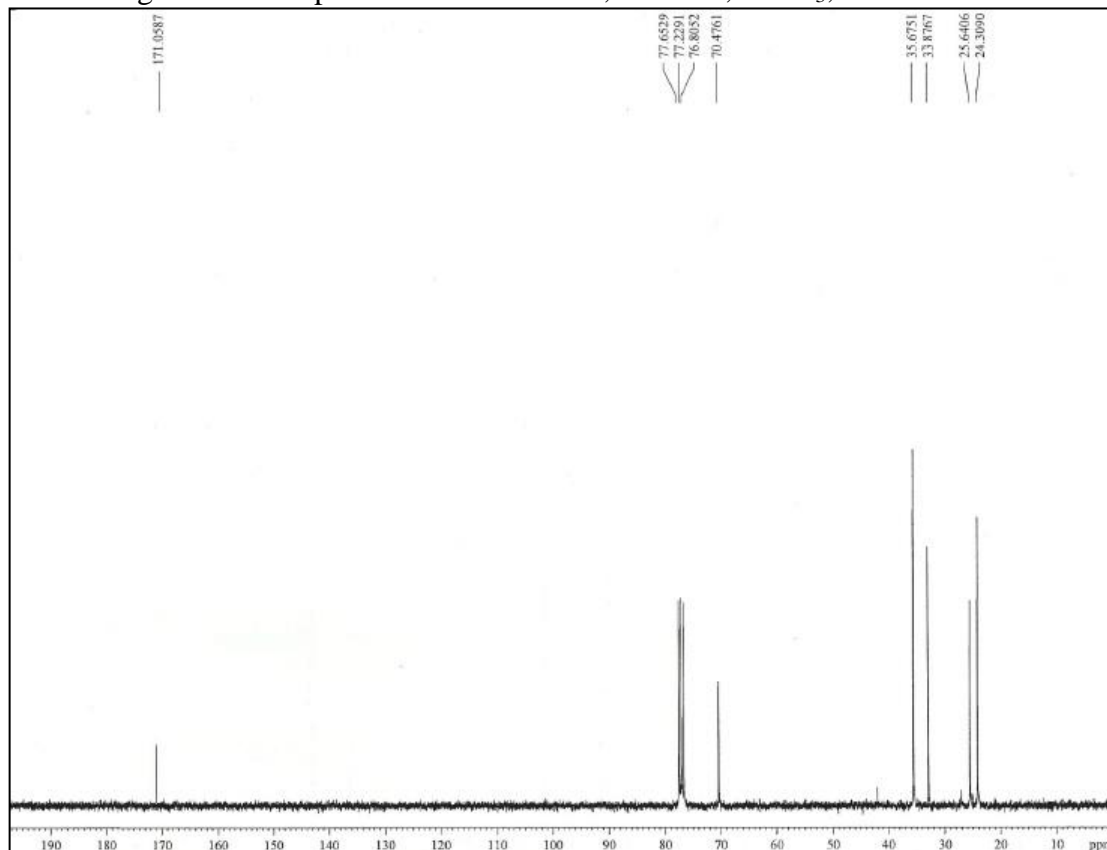


Figura 163 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **23a**Figura 164 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **23a**

A obtenção de **24a** (Figura 165) foi detectada, inicialmente, pela comparação entre os espectros de massas de **24** (Figura 166) e de **24a** (Figura 167, p. 152). Não foi observado o pico referente ao peso molecular esperado ( $m/z$  172) do produto **24a**. Entretanto, o pico em  $m/z$  112 pode ser explicado devido à fragmentação do tipo retro Diels-Alder em função da perda de  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$  (M-60). Por sua vez, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 168, p. 152) de **24a** registrou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  0,87 (t, 3H), 2,00 (s, 3H) e 4,87 (m, 2H), entre outros, compatíveis com **24a**. Esta análise foi confirmada pelos sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 169, p. 153) [ $\delta_{\text{C}}$  14,1 ( $\text{CH}_3$ ), 20,1 a 39,9 (7 $\text{CH}_2$ ), 71,2 ( $\text{CH}_2\text{-O}$ ) e 170,8 ( $\text{C=O}$ ).

Figura 165 – Cromatograma (CG/EM) do produto **24a** de acetilação do álcool *n*-octanol (**24**) com grãos de *X. americana*

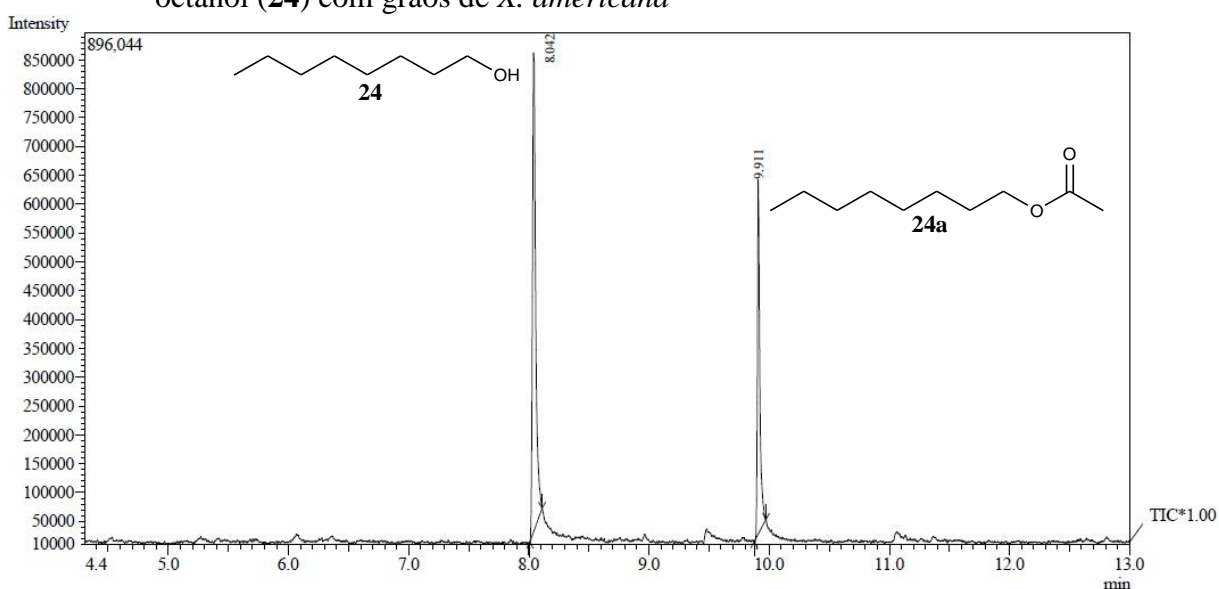


Figura 166 – Espectro de massas de **24**,  $T_{\text{R}} = 8,042$  minutos

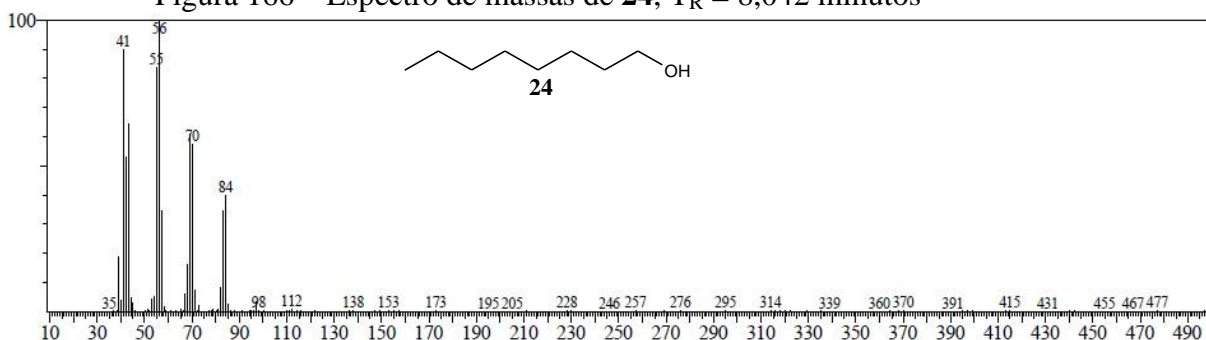




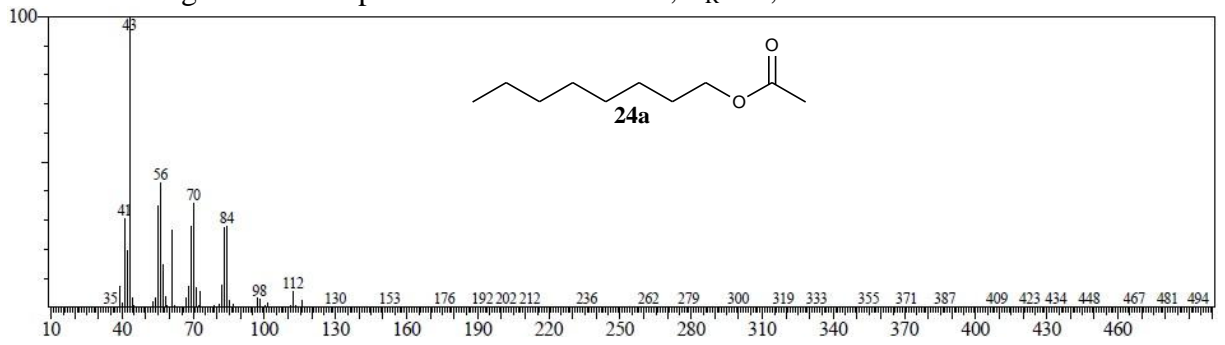
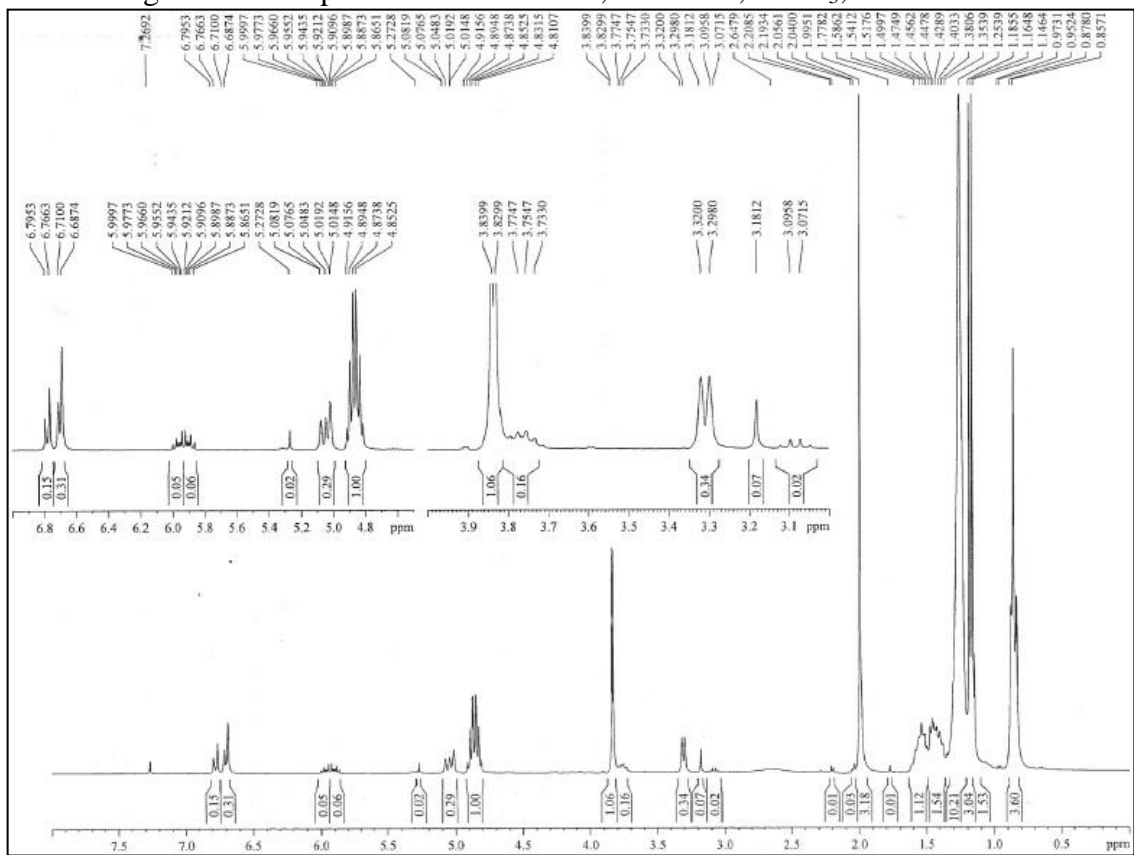
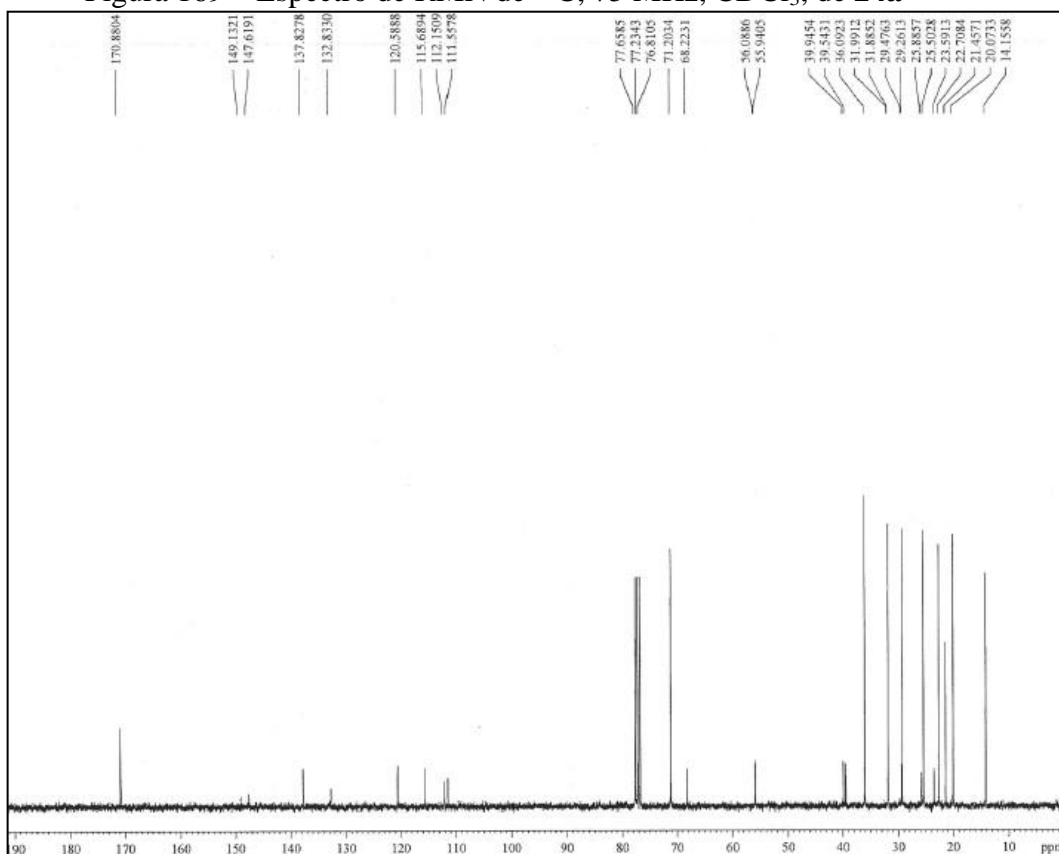
Figura 167 – Espectro de massas de **24a**,  $T_R = 9,911$  minutosFigura 168 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **24a**

Figura 169 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , de **24a**



Em resumo, as esterificações ocorreram com valores de baixo (18%) a excelentes rendimentos (>99%).

## 6.2 Parte experimental

### 6.2.1 Material vegetal

Os grãos frescos de *X. americana* foram coletados na localidade de Garapa, Acarape – Ceará. A planta foi identificada no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará por Luiz Wilson Lima-Verde (exsicata N° 040411, Herbário Prisco Bezerra).

### 6.2.2 Reagentes e solventes

Os solventes e reagentes utilizados nas reações de biotransformações, em geral, foram de grau analítico (PA) e de procedência comerciais (Merck, Synth e Vetec).

### 6.2.3 Métodos cromatográficos

Na cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada cromatoplaças de sílica gel (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 2-25 µm, Merck) com suporte de papel de alumínio. Os compostos foram detectados por exposição à luz ultravioleta nos comprimentos de onda em 254 e 365 nm em aparelho de marca Vilbert Loumart e por borrifação com solução de vanilina/ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) 0,75 M/etanol seguido de aquecimento em soprador térmico por cerca de 1 minuto; As cromatografias em colunas utilizaram gel de sílica 60 Å (Vetec) para coluna *flash* e gel de sílica 60 (Vetec) com granulometria de 70-230 mesh para coluna gravitacional; A determinação dos tempos de retenção dos substratos e seus respectivos produtos foi efetuada em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas (CG/EM).

### 6.2.4 Métodos espectrométricos

#### 6.2.4.1 Cromatografia em fase gasosa / Espectrometria de Massa (CG/EM)

As análises por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM) foram efetuadas em aparelho Shimadzu GC/MS, modelo QP2010SE Plus usando coluna capilar Rtx®-5MS (95% dimetilpolisiloxano e 5% difenil) de 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,1 µm de espessura do filme da fase fixa; as temperaturas do injetor e do detector foram 240 e 280 °C, respectivamente; condições da coluna: 60 °C para 80 °C a 5 °C min<sup>-1</sup>, permanecendo por 3 minutos; então de 80 °C min<sup>-1</sup> até 280 °C a 30 °C min<sup>-1</sup> permanecendo nesta temperatura por 10 minutos, usando He como gás de arraste com vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. A análise com o detector de massa foi no modo *scan* com tempo de análise em 23,67 min.; o registro dos espectros de massa foi na faixa de 35 a 500 Daltons por impacto de elétrons (EMIE) com energia de ionização de 70 eV (voltagem de 1,5 KV), analisador do tipo quadrupolo e fonte de íons a 240 °C.

#### 6.2.4.2 Cromatografia gasosa acoplado ao detector de ionização em chama (CG/DIC)

No cálculo dos excessos enantioméricos foi utilizado cromatógrafo gasoso acoplado com detector de ionização em chama (CG/DIC), Shimadzu GC-2010 equipado com um autoinjeter AOC-20i e uma coluna capilar quiral de ciclodextrina (CP-Chirasil-Dex CB 25 m x 0,25 mm x 0,25 µm) utilizando hélio como gás de arraste com fluxo de 1,2 mL min<sup>-1</sup> no

modo *split*; as temperaturas do injetor e do detector foram 200 e 220 °C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada em 80 °C por 7 min, depois 10 °C min<sup>-1</sup> até 120 °C e, então, em 6 °C min<sup>-1</sup> a partir de 120 até 200 °C. O tempo total de análise foi de 24,33 min. Os excessos enantioméricos (*ee*) foram determinados por CG/DIC, mais precisamente através das áreas dos picos observados para cada álcool conforme a equação abaixo.

$$ee = \frac{A-a}{A+a} \times 100$$

Onde:

A = área do enantiômero em maior quantidade

a = área do enantiômero em menor quantidade

*ee* = excesso enantiomérico

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

#### 6.2.4.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C)

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C foram registrados em espectrômetro Bruker Avance DRX-300 (300 MHz) usando clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) como solvente; os deslocamentos químicos, dados na escala  $\delta$ , foram referenciados com relação a parte não deuterada do solvente CDCl<sub>3</sub> ( $\delta_H$  7,27).

#### 6.2.5 Determinação do teor de proteínas totais nos grãos de *X. americana*

Para a determinação do teor de proteínas estimado totais nos grãos de *X. americana* foi utilizado a metodologia de Nogueira e Souza (2005). Em um tubo de Kjeldahl (Figura 30, p. 72) foram colocados 0,3004 g da amostra (grãos de *X. americana*) e 2,5 g de um complexo catalítico [10,0 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 1,0 g de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O + 7,0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (d=1,84g/mL)], sendo a mistura reacional aquecida gradativamente em bloco digestor de 50 a 350 °C até o aparecimento de uma coloração azul-esverdeada transparente quando todo o nitrogênio presente é transformado em (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Após resfriamento à temperatura ambiente (28 °C), foram adicionados 10,0 mL de H<sub>2</sub>O destilada seguido de uma solução aquosa de NaOH 50% (m/v) até obtenção de uma solução de cor negra (aprox. 20 mL). A seguir, por destilação, amônia total é liberada (o ponto final da destilação foi verificado com papel

indicador de pH até que não ocorra mais reação alcalina) e capturada através de um erlenmeyer mantido em banho de gelo contendo 20 mL de solução de ácido bórico 4% e 4 gotas de solução de indicador misto [0,132g de vermelho de metila ( $C_{15}H_{15}N_3O_2$ ) e 0,06 g de verde de bromocresol ( $C_{21}H_{14}Br_4O_5S$ ) dissolvido em 200 mL de álcool etílico 70% (v/v)]. A titulação da solução destilada foi realizada com solução padrão de ácido clorídrico 0,1 mol/L até a viragem do indicador. O valor do percentual de proteína foi obtido conforme equações abaixo:

$$NT (\%) = \frac{V \times M \times f \times 0,014 \times 100}{m}$$

$$\text{Proteína (\%)} = NT (\%) \times 6,25$$

OBS: o cálculo para determinação do teor de proteína bruta é realizado através da multiplicação do teor de N pelo fator 6,25, considerando-se que as proteínas contêm, em média, 16% de N ( $100/16 = 6,25$ ).

Onde:

NT (%) = Percentual de nitrogênio total da amostra

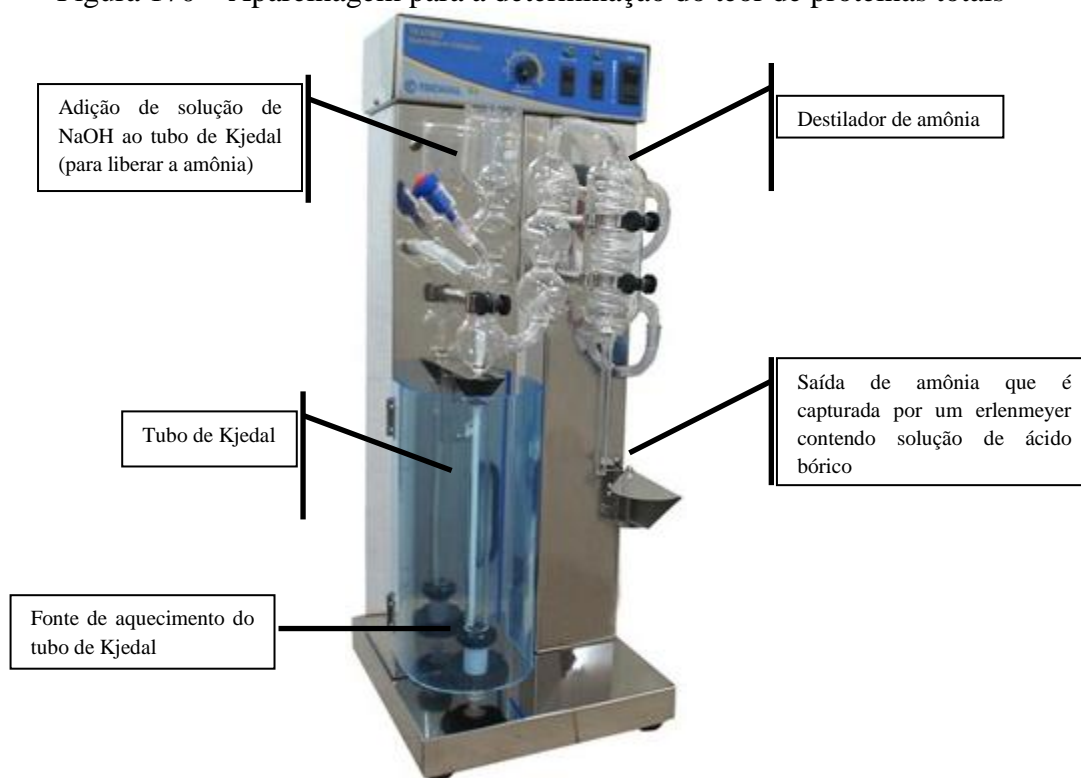
V = mililitros de solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L gastos na titulação, após a correção do branco;

M = molaridade teórica da solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L;

f = fator de correção da solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L;

m = massa da amostra em gramas.

Figura 170 – Aparelhagem para a determinação do teor de proteínas totais



Fonte: <http://goo.gl/PEs9Au> (Acessado em 11/09/2016)

### 6.2.6 Transformações biocatalisadas

Em todas as reações, os grãos de *X. americana* foram lavados com solução de hipoclorito de sódio 5% durante 20 minutos e enxaguados com H<sub>2</sub>O destilada. Para aumentar o contato dos substratos com o biocatalisador, a parte fina externa que envolve os grãos foi removida e o restante foi cuidadosamente reduzido a pequenos pedaços com utensílio mecânico comum de cozinha.

#### 6.2.5.1 Redução de aldeídos e cetonas

Usando metodologia adaptada (Yadav *et al.*, 2002), em experimentos separados, os substratos (cetonas e aldeídos) (50,0 mg) foram adicionados a uma suspensão de grãos frescos de *X. americana* (5,0 g) em H<sub>2</sub>O destilada para cetonas e tampão NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> para os aldeídos (50,0 mL, pH 5,0 para cetonas e 7,0 para aldeídos) e as misturas das reações foram agitadas (175 rpm) em uma mesa agitadora a temperatura ambiente (30 °C) por 72 horas. As suspensões finais foram filtradas e os filtrados extraídos com AcOEt (3 x 30 mL). As soluções foram submetidas a pequenas colunas cromatográficas de gel de sílica eluídas

com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . As fases orgânicas foram secas com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e os solventes evaporados sob vácuo para originar os derivados das cetonas **1a** (28 mg), **2a** (36 mg), **3a** (13 mg), **4a** (29 mg), **5a** (32 mg), **6a** (12 mg), **7a** (27 mg), **8a** (18 mg) e dos aldeídos **9a** (54 mg), **10a** (40 mg), **11a** (48 mg), **12a** (28 mg) e **13a** (33 mg). Após a obtenção dos produtos, foi realizado uma CCD com o eluente Hex:AcOEt (7:3) para verificar a pureza e a possível análise no equipamento CG/EM.

#### 6.2.5.2 Hidrólise de ésteres

Foram estabelecidas as condições ótimas de atuação dos grãos de *X. americana* (utilizando o benzoato de metila como substrato), sendo testados parâmetros como: quantidade de grãos, tempo reacional, quantidade de substrato (éster) e temperatura. Foi verificado que as melhores condições de ação dos grãos são: 2 g dos grãos, 72 horas de reação, 50 mg de substrato, água destilada (30 mL), 175 rpm e 30 °C de temperatura.

#### 6.2.5.3 Acetilação de alcoóis

Primeiramente os grãos foram triturados e submetidos à extração do óleo por maceração no período de 24 a 36 h com hexano, filtrando, concentrando, recuperando e reutilizando o solvente na extração a cada 12 h. Em seguida, foram estabelecidas as condições ótimas de atuação dos grãos de *X. americana* (utilizando o álcool benzílico como substrato), sendo testados parâmetros como: quantidade de grãos, tempo reacional, quantidade de substrato (álcool), solvente e temperatura reacional. Foi verificado que as melhores condições de ação dos grãos são: 2 g dos grãos, 24 horas de reação, 50 mg de substrato, hexano como solvente e 30 °C de temperatura.

Acetato de vinila foi utilizado como doador de grupo acetila, na proporção de 2:1 equivalente em relação ao álcool. O volume de solvente (hexano) foi de 10 mL, e os experimentos foram realizados em erlenmeyer de 125 mL submetidos à agitação em mesa agitadora (225 rpm).

## 7 CONCLUSÃO

A derivatização por sililação de componentes do óleo dos grãos de *X. americana* revelou-se de grande importância, pois, resultou na preparação de derivados mais voláteis que permitiram a identificação de muitos dos constituintes desses extratos de modo relativamente simples (CG/EM). Conforme esperado, no extrato hexano a sililação possibilitou caracterizar, sobretudo, ácidos graxos, enquanto, no extrato etanólico, permitiu evidenciar a presença de carboidratos.

A derivatização via saponificação/metilação dos componentes do óleo permitiu identificar dez ácidos graxos, também, através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM). Quatro destes ácidos (palmítico, oleico, ximeninico e lignocérico) já haviam sido identificados mediante análise do óleo dos grãos via derivatização por sililação. A investigação através dos ésteres metílicos foi importante, visto que, possibilitou identificar outros seis ácidos graxos (cerílico, nervonico, montânico, ximenico, ximenixico e lumequeico), além de confirmar a presença dos quatro primeiros, contribuindo, significativamente para o conhecimento da composição química do óleo em estudo.

Vale ressaltar a presença de esteroides (trimetilsilil éteres) no extrato hexano através de CG/EM, metabólitos geralmente caracterizados com a ajuda de outras técnicas de análise como Ressonância Magnética Nuclear (RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ), associadas a Espectrometria de Massa (EM).

Embora a presença de triterpenos seja mais comum em outras partes de plantas (caule, cascas e raízes) foi registrada a ocorrência desses metabólitos no extrato etanólico dos grãos de *X. americana*.

O baixo potencial antioxidante está em acordo com as constituições químicas dos extratos hexânico e etanólico, ou seja, a presença de moléculas com características não antioxidantes [quimicamente, os antioxidantes naturais são compostos de natureza aromática: fenóis e polifenóis; ácidos cinâmico, clorogênico, caféico e ferúlico; cumarinas, catequinas, flavonóides (entre alguns outros), enquanto, grãos vegetais são fontes de compostos de natureza lipídica].

Os testes de inibição da enzima acetilcolinesterase mostraram resultados satisfatórios apenas no caso do extrato etanólico. Alguns dos componentes [*Scyllo*-Inositol (8,34%) e *Epi*-Inositol (1,62%)] encontrados no extrato etanólico de *X. americana*, em combinação com a Colina, uma amina natural encontrada nos lipídeos, exercem várias atividades biológicas, inclusive, na nutrição de células cerebrais (a colina é importante para a



formação do neurotransmissor acetilcolina que regulariza de maneira indireta a memória em decorrência da idade avançada).

Os teores de proteínas (19,77%) e de óleo (27,71%) encontrados nos grãos da planta em estudo revelaram-se consideráveis em comparação com aqueles verificados em plantas com caracteres proteicos e oleaginosos, empregados comercialmente.

Os grãos de *X. americana*, conforme os resultados obtidos, apresentou um potencial biocatalítico muito eficiente para a redução, hidrólise e esterificação. Na redução, como previsto, os aldeídos foram os compostos mais reativos (51 a >99% de rendimentos), enquanto as cetonas apresentaram rendimentos que oscilaram entre baixos (6%) a bom (60%). Na hidrólise os rendimentos variaram de médio (58%) a excelente (98%) e nas reações de esterificação os resultados oscilaram de baixo (18%) a excelente (>99%). Em adição, vale destacar a ação quimio, regio e enantiosseletiva do biocatalisador, em relação a alguns compostos.

Os excessos enantioméricos apresentados pelos produtos obtidos nas reduções das cetonas pró-quirais foram de baixos (35%) a excelentes (>99%). Isto, como acontece de modo geral, foi interpretado como resultante da afinidade entre a estrutura química da cetona e as enzimas dos grãos de *X. americana*.

A otimização dos parâmetros da ação dos grãos de *X. americana* nas reações de esterificação, utilizando o benzoato de metila como substrato, permitiu estabelecer como melhores condições reacionais: 52,0 mg de substrato, 2,0 g dos grãos, velocidade de agitação de 225 rpm durante 24 h a 30 °C. Este mesmo estudo permitiu avaliar o potencial de reutilização dos grãos, sendo observada a possibilidade de reuso de 4 a 6 vezes com rendimentos acima de 90%.

Em adição, o presente estudo contribuiu para aumentar o conhecimento sobre o potencial medicinal de *X. americana*. Cataplasmas de plantas do gênero *Ximenia* são usadas como máscaras para tratamento da pele. O ácido ximeninico (componente presente no óleo de *X. americana*) e seu éster etílico (ximenoil) possuem ação tópica, sendo usados na forma de emulsões com ação anticelulítica.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, L. A.; BERTINI, L. M.; BIZERRA, A. M. C.; MATTOS, M. C.; MONTE, F. J. Q.; LEMOS, T. L. G. *Zingiber officinale* (Gengibre) como fonte enzimática na redução de compostos carbonílicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 483-487, 2015.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, London, v. 127, p. 183-198, 2002.
- ARAÚJO, M. R. S.; MONTE, F. J. Q.; BRAZ-FILHO, R. A new sesquiterpene from *Ximenia americana* Linn. **Helvetica Chimica Acta**, v. 92, p. 127-132, 2009.
- ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.
- ASSUNÇÃO, João Carlos da Costa. **Reações de biocatálise utilizando sistemas de células íntegras e de enzimas imobilizadas de *Saccharum officinarum* Linn (cana de açúcar)**. 2008, 236 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.
- BANDEIRA, P. N.; PESSOA, O. D. L.; TREVISAN, M. T. S.; LEMOS, T. L. G. Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* March. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6b, p. 1078-1080, 2002.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição da Puccamp**, Campinas, v. 12, n. 2, p.123-130, 1999.
- BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1200, 1958.

BOMBARDELLI, E.; GUGLIELMINI, G.; MORAZZONI, P.; CURRI, S. B.; POLINELLI, W. Microvasculokinetic activity of ximenynic acid and ethyl ester. **Fitoterapia**, v. 65, n. 3, p. 195-201, 1994.

BRASILEIRO, M. T.; EGITO, A. A.; LIMA, J. G.; RANDAU, K. P.; PEREIRA, G. C.; ROLIM NETO, P. J. *Ximenia americana* L.: Botânica, Química e Farmacologia no Interesse da tecnologia farmacêutica. **Revista Brasileira de farmácia**, v. 89, n. 2, p. 164-167, 2008.

BROOKS, C. J. W. Some aspects of mass spectrometry in research on steroids. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, v. 293, p. 53-67, 1979.

BUDZIKIEWICZ, H.; DJERASSI, C.; WILLIAMS, D. H. **Mass spectrometry of organic compounds**. London: Holden-Day, 1967.

CAETANO, A. C. S. **Potencial antioxidante de extratos de resíduos de acerolas (*Malpighia emarginata* D.C.) em diferentes sistemas modelos e na estabilidade oxidativa do óleo de soja**. 2009. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e cultura**. São Paulo, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CARNEIRO, F. M.; SILVA, M. J. P.; BORGES, L. L.; ALBERNAZ, L. C.; COSTA, J. D. P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, Iporá, v.3, n. 2, p.44-75, 2014.

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

CHAVES, E. M. F.; CHAVES, E. B. F. COELHO-de-SOUSA, G. FIGUEIREDO, L. S. Um olhar sobre *Ximenia americana* L. e suas potencialidades. **Acta Tecnológica**, São Luis, v. 9, n. 1, p. 70-77, 2014.

CHIZHOV, O. S.; MOLODTSOV, N. V.; KOCHETKOV, N. K. Mass spectrometry of trimethylsilyl ethers carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 4, n. 3, p. 273-276, 1967.

CLAYDEN, J., GREEVES, N., WARREN, S., WOTHERS, P. **Organic Chemistry**.  
Florência: Oxford University Press, 2004.

CORDELL, G. A.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; MATTOS, M. C. Vegetales as Chemical Reagents. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 478-492, 2007.

COSTA, D. A.; CHAVES, M. H.; SILVA, W. C. S.; COSTA, C. L. S. Constituintes químicos, fenóis totais e atividade antioxidante de *Sterculia striata* St. Hil. et Naudin. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 40, n. 1, p. 207-212, 2010.

CRISTONI, A.; GUGLIELMINI, G.; STUCCHI, P.; BOUET, A. **A unsaturated fatty acid from traditional African cosmesis**. Proceedings in Cosmetics USA: New York, 1999.

CURSINO, L. M. C.; MESQUITA, A. S. S.; MESQUITA, D. W. O.; FERNANDES, C. C.; PEREIRA JUNIOR, O. L.; AMARAL, I. L.; NUNEZ, C. V. Triterpenos das folhas de *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 39, n.1, p. 181-185, 2009.

DALLE-DONE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, n. 1, p. 23-38, 2003.

DIEKMAN, J.; DJERASSI, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CXXV. Mass spectrometry of some steroid trimethylsilyl ethers. **Journal Organic Chemistry**, v. 32, n. 4, p. 1005-1012, 1967.

DeJONGH, D. C.; RADFORD, T.; HRIBAR, J. D.; HANESSIAN, S.; BIEBER, M.; DAWSON, G.; SWEELEY, C. C. Analysis of Trimethylsilyl Derivatives of Carbohydrates by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. **Journal of the American Chemical Society**, v. 91, n. 7, p. 1728-1740, 1969.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRESS, V. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

EROMOSELE, C. O.; EROMOSELE, I. C. Fatty acid compositions of seed oils of *Haematostaphis barteri* and *Ximenia americana*. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 3, p. 303-304, 2002.

FEITOSA, C. R. S.; GOMES, B. A.; MENEZES, J. E. S. A.; COSTA, S. M. O.; MORAES, S. M.; MONTE, F. J. Q. Inibição de acetilcolinesterase pela espécie *Cissus sicyoides* L. **Química no Brasil**, v. 9, n. 1 e 2, p. 21-24, 2015.

FERREIRA, C. **Caracterização por GC-MS de glicídios derivatização assistida por microondas**. 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado em Química Forense) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2011.

FORLENZA, O. V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Revista de psiquiatria clínica**, v. 32, n. 3, p. 137-48, 2005.

FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; PASCOAL NETO, C. Identification of new hydroxy fatty acids and ferulic acid ester in the wood of *Eucalyptus globulus*. *Holzforshung*, v. 56, n. 2, p.143-149, 2002.

FREITAS, L. S. **Desenvolvimento de procedimentos de extração do óleo de semente de uva e caracterização química dos compostos extraídos**. 2007. 206 f. Tese (Doutorado em Química Analítica e Ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

GIADA, M. L. R.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos de alimentos. **Nutrire Revista da Sociedade Brasileira de Alimentos e Nutrição**, v. 28, p. 91-107, 2004.

GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; LAKSHMIPRIYA, T.; HILDA, A. Strategies to Characterize Fungal Lipases for Applications in Medicine and Dairy Industry. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

GUPTA, R.; KUMARI, A.; SYAL, P.; SINGH, Y. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology, **Progress In Lipid Research**, v. 57, p. 40-54, 2015.

GUSTAFSSON, J. A.; RYHAGE, R.; SJÖVALL, J. Migration of the trimethylsilyl group upon electron impact in steroids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 91, n. 5, p. 1236-1234, 1968.

HALKET, J. M.; WATERMAN, D.; PRZYBOROWSKA, A. M.; PATEL, R. K. P.; FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. Chemical Derivatization and Mass Spectral Libraries in Metabolic Profiling by GC/MS and LC/MS/MS. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 410, p. 219-243, 2005.

HANSEN, Jhoanne. **Clonagem, expressão e caracterização de duas lipoxigenases de *Shewanella woodyi***. 2013. 129 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2013.

HENRIQUE, M. C.; NUNOMURA, R. C. S.; NUNOMURA, S. M.; SILVA, S. G. Constituintes químicos isolados dos galhos e cascas de ampazeiro (*Parahancornia amapa*, Apocynaceae). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 44, n. 4, p. 533-538, 2014.

HUANG, Y.; YEH, P.; SHEN, C.; CHEN, C. Antioxidant flavonoids from the rhizomes of *Helminthostachys zeylanica*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 7, p. 1277-1283, 2003.

ISIDOROV, V. A.; ISODOROVA, A. G.; SCZCZEPANIAK, L.; CZYZEWSKA, U. Gas chromatographic-mass spectrometric: Investigation of the chemical composition of beebread. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 1056-1063, 2009.

JAMES, D. B.; ABU, E. A.; WUROCHEKKE, A. U.; ORJI, G. N. Phytochemical and antimicrobial investigation of the aqueous and methanolic extracts of *Ximenia americana*. **International Journal of Medical Sciences**, v. 7, p. 284-288, 2007.

KARADY, S.; PINES, S. H. Mass spectrometry of the trimethylsilyl ethers of 2-ketohexoses. **Tetrahedron**, v. 26, n. 19, p. 4527-4536, 1970.

KATES, M. **Techniques of lipidology. In Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology**. Amsterdam: Elsevier, 1986.

KLEIMAN, R.; BOHANNON, M. B.; GUNSTONE, F. D.; BARVE, J. A. Mass spectra of acetylenic fatty acid methyl esters and derivatives. **Lipids**, v. 11, n. 8, p. 599-603, 1976.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividade antioxidante em pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LE, N. H. T.; MALTERUDA, K. E. L.; DIALLO, D.; PAULSEN, B. S.; NERGÅRDA, C. S.; WANGENSTEEN, H. Bioactive polyphenols in *Ximenia americana* and the traditional use among Malian healers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 3, p. 858-862, 2012.

LOPES, L. L.; PELUZIO, M. C. G.; HERMSDORFF, H. H. M. Ingestão de ácidos graxos monoinsaturados e metabolismo lipídico. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 15, n. 1, p. 52-60, 2016.

LIU, Y. D.; LONGMORE, R. B.; FOX, J. E. D. Separation and Identification of Ximenynic Acid Isomers in the Seeds of *Santalum spicatum* R. Br. As Their 4,4-Dimethyloxazoline Derivatives. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 12, p. 1729-1731, 1996.

MAHATO, S. B., KUNDU, A. P. <sup>13</sup>C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

MANOEL, E. A. **Resolução de derivados racêmicos do mio-inositol catalisada por lípases**. 2011. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2007.

MEDEIROS, P. M.; SIMONEIT, B. R. T. Analysis of sugars in environmental samples by chromatography – mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1141, n. 2 p. 271-278, 2007.

MEVY, J. P.; BESSIERE, J. M.; GREFF, S.; ZOMBRE, G.; VIANO, J. Composition of the volatile oil from the leaves of *Ximenia americana* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, n. 7, p. 549-553, 2006.

MOGOSANU, G. D.; GRUMEZESCU, A. M.; MIHAIIESCU, D. E.; ISTRATI, D.; MOGOSANU, D. E.; ALICE BUTEICA S. Identification of sugars from *Silene albae herba* using GC–MS technique. **U.P.B. Sci. Bull. Series B**, v. 73, n. 2, p. 101-108, 2011.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal Science Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MONTE, F. J. Q.; LEMOS, T. L. G.; ARAÚJO, M. R. S.; GOMES, E. S. *Ximenia americana*: Chemistry, Pharmacology and Biological Properties, a Review. **Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**, capítulo 20, p. 429-450, 2012.

MURPHY, R. C. **Handbook of Lipid Research 7: Mass Spectrometry of Lipids**. New York: Fred Snyder Plenum Press, 1993.

NASCIMENTO, V. T.; MOURA, N. P.; VASCONCELOS, M. A. S.; MACIEL, M. I. S.; ALBUQUERQUE, U. P. A. Chemical characterization of native wild plants of dry seasonal forests of the semi-arid region of northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2112-2119, 2011.



NASCIUTTI, P. R.; COSTA, A. P. A.; SANTOS JÚNIOR, M. B.; MELO, N. G.; CARVALHO, R. O. A. Ácidos graxos e o sistema cardiovascular. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 22, p. 11-29, 2015.

NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. **Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Vegetal, Nutrição Animal e Alimentos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005.

OGUNLEYE, D. S.; IBITOYE, S. F. Studies of antimicrobial activity and chemical constituents of *Ximenia americana*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 2, p. 239-241, 2003.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689-702, 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**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 435-437, 2012.

PETERSSON, G. A. McLafferty type rearrangement of a trimethylsilyl group in silylated hydroxy carbonyl compounds. **Organic Mass Spectrometry**, v. 6, n. 5, p. 577-592, 1972.

PETRONILHO, E. C.; PINTO, A. C.; VILLARA, J. D. F. Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, v. 27, n. 3, p. 3-14, 2011.

PILISSÃO, C. **Aminólise enantiosseletiva do (R,S)-mandelato de metila**. 2006. 103 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

GARCÍA-RASO, A.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, M.; PÁEZ, M. I.; SANZ, J.; MARTÍNEZ-CASTRO, I. Gas chromatographic retention of carbohydrate trimethylsilyl ethers: III. Ketoheoses. **Journal of Chromatography A**, v. 471, p. 205-216, 1989.

REZANKA, T.; SIGLER, K. Identification of very long chain unsaturated fatty acids from *Ximenia* oil by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography mass spectroscopy. **Photochemistry**. v. 68, n. 6, p. 925-934, 2007.

RHEE, I. K.; MEENT, M. V.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R, Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using sílica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, v. 915, n. 1, p. 217-223, 2001.

RIBEIRO, D. A.; MACÊDO, D. G.; OLIVEIRA, L. G. S.; SARAIVA, M. E.; OLIVEIRA, S. F.; SOUZA, M. M. A.; MENEZES, I. R. A. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no Estado do Ceará, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 16, n. 4, p. 912-930, 2014.

SARMENTO, José Darcio Abrantes. **Caracterização de frutos de ameixa silvestre no semiárido do Nordeste brasileiro**. 2013. 146 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido do Rio Grande do Norte, Mossoró, 2013.

SEBBEN, V. C. **Análise de efedrinas e anfetamina em urina empregando SPE e SPME por CG/EM/EM**. 2007. 146 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SERENIKI, A.; VITAL, M. A. B. F.; A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v. 30, n. 1, p. 2008.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 8, p. 1053-1071, 1998.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SILVA, K. E. S. **Polissacarídeos da casca de *Ximenia americana*: isolamento, caracterização química e atividades na nocicepção e dor pancreática**. 2013. 92 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2013.

SILVA, R. A. C. **Estudo da composição química das folhas e cascas do caule da planta apícola *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* e atividades antioxidante e citotóxica**. 2012. 108 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012.

SILVA, R. A. C.; LEMOS, T. L. G.; FERREIRA, D. A.; MONTE, F. J. Q. *Ximena americana*: Chemical and Spectral Studies of Extracts of Seeds. Analysis of Trimethylsilyl Derivatives by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. **American Journal of Analytical Chemistry**, v.7, n. 2, p. 192-202, 2016.

SILVÉRIO, F.O. **Caracterização de extrativos de madeira de *eucalyptus* e depósitos de *pitch* envolvidos na fabricação de celulose e papel**. 2008. 179 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

SOUZA, A. C. G. **Efeito antioxidante de uma nova classe de compostos teluroacetenos: estudos *in vitro* e *in vivo***. 2010. 59 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira baseado em AP II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

SPITZER, V.; MARX, F.; MAIA, J. G. S.; PFEILSTICKER, K. Curupira tefeensis II. Occurrence of Acetylenic Fatty Acids. **Fat science technology**, v. 93, n. 5, p. 169-174, 1991.

SUN, L.; ZHANG, J.; LU, X.; ZHANG, L.; ZHANG, Y. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 10, p. 2689-2696, 2011.

TEPE, B.; SOKMEN, A. Screening of the antioxidative properties and total phenolic contents of three endemic *Tanacetum* subspecies from Turkish flora. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 16, p. 3076-3079, 2007.

TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V.; VAN DE MEENT, M.; RHEE, I. K.; VERPOORTE, R. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 301-304, 2003.

VIANNI, R.; BRAZ-FILHO, R. Ácidos Graxos Naturais: importância e ocorrência em alimentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 400-407, 1996.

YADAV, J. S.; NANDA, S.; REDDY, P. T.; RAO, A. B. Efficient enantioselective reduction of ketones with *Daucus carota* root. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, n. 11, p. 3900–3903, 2002.