



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

EMERSON YVAY ALMEIDA DE SOUSA

**BIORREDUÇÃO DE CETONAS AROMÁTICAS PRÓ-QUIRAIS E OUTROS
COMPOSTOS CARBONILADOS UTILIZANDO AS SEMENTES DE *Sinapis alba* L.
(MOSTARDA AMARELA)**

FORTALEZA

2017

EMERSON YVAY ALMEIDA DE SOUSA

BIORREDUÇÃO DE CETONAS AROMÁTICAS PRÓ-QUIRAIS E OUTROS
COMPOSTOS CARBONILADOS UTILIZANDO AS SEMENTES DE *Sinapis alba* L.
(MOSTARDA AMARELA)

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte

FORTALEZA

2017

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

S696b Sousa, Emerson Yvay Almeida de.

Biorredução de cetonas aromáticas pró-quirais e outros compostos carbonilados utilizando as sementes de *Sinapis alba* L. (mostarda amarela) / Emerson Yvay Almeida de Sousa. – 2017.
102 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos.

Coorientação: Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte.

1. *Sinapis alba*. 2. Acetofenona. 3. Biorredução. I. Título.

CDD 540

EMERSON YVAY ALMEIDA DE SOUSA

BIORREDUÇÃO DE CETONAS AROMÁTICAS PRÓ-QUIRAIS E OUTROS
COMPOSTOS CARBONILADOS UTILIZANDO AS SEMENTES DE *Sinapis alba* L.
(MOSTARDA AMARELA)

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: 20/02/2017

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. João Carlos da Costa Assunção
Instituto Federal do Ceará – IFCE

Dedico este trabalho a Deus primeiramente,
que iluminou meus passos rumo a conquista do saber.
A todos meus familiares, à minha mãe e meu pai,
aos meus irmãos e minha noiva,
são pessoas que fizeram parte de minha vida
ao longo desse período e alcance
desta graduação tão almejada.

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente a minha mãe Maria de Fátima e ao meu pai Francisco Valter, aos meus irmãos Ellison, Enderson e Lucibele que sempre estiveram ao meu lado e me ajudaram em todos os momentos, fundamentando o ser humano que me tornei.

A minha noiva, Mayara Oliveira, mostrando-se uma companheira que me ajudou e me motivou nos momentos de desânimos e de dificuldades nas atividades experimentais exigidas na Pós-Graduação

A minha orientadora, Dra. Telma Leda Gomes de Lemos, pela confiança, amizade, apoio, pelos ensinamentos e pela orientação que resultou nesse trabalho. Professora cuja trajetória de vida e profissional me inspira e serve de exemplo.

Ao professor Dr. Francisco de Queiroz Monte, meu co-orientador, que não dispensou esforços ao apoiar meu trabalho, dando contribuições fundamentais e decisivas para sua conclusão. Professor que aprendi a admirar por sua brilhante atuação profissional e por seu carisma inigualável.

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

Aos amigos e colegas do LBPN por estarem presentes no cotidiano das atividades experimentais, sendo decisivos para realização desse trabalho, especialmente ao André Martins, Gisele Rocha, Bruna Marques, Patrícia Georgina, Iolanda Frota, Felipe Maia, Daniele Alves, Jennifer Cavalcante, Juliana Maria e Marcia Cleane.

Aos amigos e colegas do LABS em especial a Bruna Rocha, Carol Lustosa, Daniely Holanda, Maria Vieira, Francisco Aquino, Diana Kelly e ao Marcos Reinaldo pelos ensinamentos.

Aos colegas da turma de mestrado, 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 CAPES pela bolsa concedida, CNPq e FUNCAP pelo fomento.

A todos, meu sincero e fraterno muito obrigado!

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso, Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.”

Josué 1:9

RESUMO

O presente estudo investigou o potencial das sementes do vegetal *Sinapis alba* em catalisar reações de redução de compostos carbonilados, principalmente de cetonas e aldeídos aromáticos, e determinar a composição em ácidos graxos no óleo fixo. O principal objetivo foi a obtenção de álcoois enantiomericamente enriquecidos a partir de cetonas aromáticas.

Inicialmente foi determinado o teor de proteínas solúveis pelo método de Bradford. Este teor (110g/L), relativamente alto, demonstrou a possibilidade da presença de enzimas no material vegetal e indicou sua potencialidade como fonte biocatalisadora. A seguir, utilizando acetofenona como substrato modelo, foram realizadas reações de redução para a otimização dos parâmetros reacionais na obtenção do produto 1-feniletanol, tendo em vista obter maior rendimento e maior excesso enantiomérico. Os parâmetros de reação estudados foram: quantidade de biocatalisador, tempo de reação, velocidade de rotação, temperatura, co-solvente, meio tamponante (pH) e uso de polivinilpirrolidona (PVP). As reações foram conduzidas em meio aquoso utilizando soluções tampões para pH 6,0 e pH 6,5/PVP. Os melhores resultados foram obtidos em pH 6,0 com conversão de 69,8%, enquanto o melhor excesso enantiomérico (61,2%) para o isômero S foi conseguido pelo uso do co-solvente isopropanol. Foram realizadas ainda, reações de redução nas condições otimizadas a partir de derivados da acetofenona (2-metil-acetofenona, 2-metóxi-acetofenona, 3-metóxi-acetofenona, 3-nitro-acetofenona, 4-nitro-acetofenona, 4-flúor-acetofenona e 4-bromo-acetofenona) e do benzaldeído (4-nitrobenzaldeído e 4-metóxi-benzaldeído), além do cinamaldeído, 1-indanona e benzamida. A quantificação dos teores de conversão foi realizada através de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/EM) e o excesso enantiomérico foi realizado em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), utilizando colunas quirais OD-H e OB-H.

Palavras-chave: *Sinapis alba*; Acetofenona; Biorredução.

ABSTRACT

The present study investigated the seeds of the vegetable *Sinapis alba* in order to verify its biocatalytic potential in reactions of reduction of aromatic ketones and aldehydes, among other carbonylated compounds, as well as to verify the presence of fatty acids in the fixed oil. In the first case, regarding ketones, the objective was to obtain enantiomerically pure alcohols and, in the second case, to identify the fatty acids.

Initially the soluble protein content was determined by the Bradford method. This relatively high content (110 g / L) demonstrated the possibility of the presence of enzymes in the plant material and indicated its potential as a biocatalyst source. Then, using acetophenone as a model substrate, reduction reactions were performed to optimize the reaction parameters in obtaining the 1-phenylethanol product, in order to obtain a higher yield and a higher enantiomeric excess. The reaction parameters studied were: amount of biocatalyst, reaction time, speed of rotation, temperature, use of co-solvent, buffering medium (pH) and use of polyvinylpyrrolidone (PVP). Reactions were conducted in aqueous medium using buffer solutions at pH 6.0 and pH 6.5 / PVP. The best results were obtained at pH 6.0 with conversion of 69.8%, while the best enantiomeric excess (61.2%) for the S-isomer was achieved by the use of the co-solvent isopropanol. Further reduction reactions were performed from acetophenone derivatives (2-methyl-acetophenone, 2-methoxyacetophenone, 3-methoxyacetophenone, 3-nitro-acetophenone, 4-nitro-acetophenone, 4-fluoroacetophenone and 4-bromoacetophenone), but also from benzaldehyde and some of its derivatives, among others. The quantification of the conversion rates was performed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC / MS) and the enantiomeric excess was performed by High Efficiency Liquid Chromatography (HPLC) using chiral OD-H and OB-H columns.

Keywords: *Sinapis alba*; Acetophenone; Biorreduction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura dos isômeros da talidomida.....	11
Figura 2 - <i>Sinapis alba</i> L.....	14
Figura 3 - Estrutura protéica.....	19
Figura 4 - Estrutura monomérica do polímero PVP.....	22
Figura 5 - Reação geral de saponificação/metilação de um glicerídeo.....	27
Figura 6 - Detalhe do método de Bradford para determinação de proteínas após a adição do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250.....	30
Figura 7 - Esquema da reação de redução das cetonas pró-quirais por via química.....	31
Figura 8 - Esquema da reação de redução da acetofenona por via enzimática.....	32
Figura 9 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução da acetofenona utilizando 15 g de biocatalisador.....	34
Figura 10 - Cromatograma (CG-EM) do produto da biorredução da acetofenona utilizando 15 g de biocatalisador.....	34
Figura 11 - Espectro de massas do 1-feniletanol.....	34
Figura 12 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução da acetofenona em 96 horas de reação.....	37
Figura 13 - Cromatograma (CG-EM) do produto da biorredução da acetofenona em 96 horas de reação.....	38
Figura 14 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução da acetofenona em 200 rpm.....	40
Figura 15 - Cromatograma (CG-EM) do produto da biorredução da acetofenona em 200 rpm.....	40
Figura 16 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução da acetofenona em 25 °C.....	42
Figura 17 - Cromatograma (CG-EM) do produto da biorredução da acetofenona em 25 °C.....	43
Figura 18 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução da acetofenona em pH 6,0.....	45
Figura 19 - Cromatograma (CG-EM) do produto da biorredução da acetofenona em pH 6,0.....	45
Figura 20 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução da acetofenona em 10% IPA.....	47
Figura 21 - Cromatograma (CG-EM) do produto da biorredução da acetofenona em 10% IPA.....	48
Figura 22 - Estrutura monomérica do polímero PVP.....	48
Figura 23 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução da acetofenona em 1 g PVP.....	50

Figura 24 - Cromatograma (CG-EM) do produto da biorredução da acetofenona em 1 g PVP.	50
Figura 25 - Derivados da acetofenona selecionados para a reação com as sementes de <i>Sinapis alba</i> L.	52
Figura 26 - Produtos esperados da reação das cetonas -para substituídas utilizando as condições da reação otimizada.	54
Figura 27 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(4'-nitro)-feniletanol em pH 6,0.	55
Figura 28 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(4'-nitro)-feniletanol em PVP.	56
Figura 29 - Espectro de massas do 1-(4'-nitro)-feniletanol em PVP.	56
Figura 30 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(4'-bromo)-feniletanol em pH 6,0.	58
Figura 31 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(4'-bromo)-feniletanol PVP.	58
Figura 32 - Espectro de massas do 1-(4'-bromo)-feniletanol.	58
Figura 33 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(4'-fluoro)-feniletanol em pH 6,0.	60
Figura 34 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(4'-fluoro)-feniletanol em PVP.	60
Figura 35 - Espectro de massas do 1-(4'-fluoro)-feniletanol.	61
Figura 36 - Produtos esperados da reação das cetonas -meta substituídas utilizando as condições da reação otimizada.	62
Figura 37 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(3'-metóxi)-feniletanol em pH 6,0.	63
Figura 38 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(3'-metóxi)-feniletanol em PVP.	64
Figura 39 - Espectro de massas do 1-(3'-metóxi)-feniletanol.	64
Figura 40 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(3'-nitro)-feniletanol em pH 6,0.	66
Figura 41 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(3'-nitro)-feniletanol em PVP.	66
Figura 42 - Espectro de massas do 1-(3'-nitro)-feniletanol.	67

Figura 43 - Produtos esperados da reação das cetonas -orto substituídas utilizando as condições da reação otimizada.	67
Figura 44 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(2'-metóxi)-feniletanol em pH 6,0.....	69
Figura 45 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(2'-metóxi)-feniletanol em PVP.	69
Figura 46 - Espectro de massas do 1-(2'-metóxi)-feniletanol.	69
Figura 47 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(2'-metil)-feniletanol em pH 6,0.....	71
Figura 48 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(2'-metil)-feniletanol em PVP.	72
Figura 49 - Espectro de massas do 1-(2'-metil)-feniletanol.	72
Figura 50 - Outros compostos carbonilados selecionados para a reação com as sementes de <i>Sinapis alba</i> L.	73
Figura 51 - Espectro de massas do 1-fenilmetanol.....	74
Figura 52 - Espectro de massas do 1-(4'-nitro)-fenilmetanol.....	74
Figura 53 - Espectro de massas do 1-(4'-metóxi)-fenilmetanol.....	74
Figura 54 - Produtos da biorredução do cinamaldeído com sementes de <i>Sinapis alba</i> L.	76
Figura 55 - Espectro de massas do 3-fenilprop-2-en-1-ol.	76
Figura 56 - Espectro de massas do 3-fenilpropan-1-ol.....	76
Figura 57 - Espectro de massas do 3-fenilpropanal.....	76
Figura 58 - Espectro de massas do 1-indanol.	77
Figura 59 - Espectro de massas da benzamida.	77
Figura 60 - Cromatograma de íons totais dos ésteres metílicos obtidos de ácidos graxos da <i>Sinapis alba</i>	79
Figura 61 - Éster metílico do ácido palmítico.....	80
Figura 62 - Éster metílico do ácido linoléico.....	80
Figura 63 - Éster metílico do ácido esteárico.....	80
Figura 64 - Éster metílico do ácido oléico.	80
Figura 65 - Éster metílico do ácido linolênico.....	80
Figura 66 - Éster metílico do ácido eicosanóico.....	81
Figura 67 - Éster metílico do ácido erúcico.	81
Figura 68 - Éster metílico do ácido lignocérico.....	81
Figura 69 - Fotografia da CCD da biorredução da acetofenona.....	83

Figura 70 - Fotografia do Cromátografo Líquido de Alta Eficiência utilizado nas análises de biorredução.	84
Figura 71 - Fotografia do espectrofotômetro modelo Spectronic 20 Genesys.	86
Figura 72 - Fotografia do CG-EM modelo QP2010 da SHIMADZU.	86
Figura 73 - Fotografia das reações de biorredução utilizando as sementes de Sinapis alba L.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificacao das enzimas.	20
Tabela 2 - Ácidos graxos saturados mais comuns.	24
Tabela 3 - Ácidos graxos insaturados mais comuns.	25
Tabela 4 - Resultados de biorredução da acetofenona utilizando 5 g, 10 g, 15 g, 20 g e 25 g de sementes <i>Sinapis alba</i> L.	33
Tabela 5 - Resultados de biorredução da acetofenona realizada em 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h, 96 h e 120 h utilizando sementes <i>Sinapis alba</i> L como biocatalisador.	36
Tabela 6 - Resultados de biorredução da acetofenona em rotações de 150 rpm, 175 rpm, 200 rpm e 225 rpm utilizando sementes <i>Sinapis alba</i> L como biocatalisador.	39
Tabela 7 - Resultados de biorredução da acetofenona em temperaturas de 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C e 50 °C utilizando sementes <i>Sinapis alba</i> L como biocatalisador.	41
Tabela 8 - Resultados de biorredução da acetofenona em solução tampão pH 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0 utilizando sementes <i>Sinapis alba</i> L como biocatalisador.	43
Tabela 9 - Resultados de biorredução da acetofenona em presença de 1%, 2%, 5%, 10% e 15% de co-solvente isopropanol utilizando sementes <i>Sinapis alba</i> L como biocatalisador.	46
Tabela 10 - Resultados de biorredução da acetofenona em presença de 1g, 2g, 5g e 10g de polivinilpirrolidona (PVP) utilizando sementes <i>Sinapis alba</i> L como biocatalisador.	49
Tabela 11 - Resultados de biorredução dos derivados da acetofenona utilizando sementes <i>Sinapis alba</i> L como biocatalisador.	53
Tabela 12 - Resultados da biotransformação da 4-nitro-acetofenona com sementes de <i>Sinapis alba</i> L.	54
Tabela 13 - Resultados da biotransformação da 4-bromo-acetofenona com sementes de <i>Sinapis alba</i> L.	57
Tabela 14 - Resultados da biotransformação da 4-fluoro-acetofenona com sementes de <i>Sinapis alba</i> L.	59
Tabela 15 - Resultados da biotransformação da 3-metóxi-acetofenona com sementes de <i>Sinapis alba</i> L.	63
Tabela 16 - Resultados da biotransformação da 3-nitro-acetofenona com sementes de <i>Sinapis alba</i> L.	65

Tabela 17 - Resultados da biotransformação da 2-metóxi-acetofenona com sementes de <i>Sinapis alba</i> L.....	68
Tabela 18 - Resultados da biotransformação da 2-metil-acetofenona com sementes de <i>Sinapis alba</i> L.....	70
Tabela 19 - Resultados da biotransformação de aldeídos e outros compostos carbonilados utilizando <i>Sinapis alba</i> como biocatalisador.	75
Tabela 20 - Ácidos graxos identificados como ésteres metílicos.....	79
Tabela 21 - Parâmetros de análise por CLAE dos substratos utilizados nas reações de biocatálise.	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
BSA	Albumina Bovina
CC	Coluna Cromatográfica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CENAUREMN	Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<i>Ee</i>	Excesso Enantiomérico
IV	Infravermelho
IPA	Isopropanol
NADH/NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADP/NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótideo Fosfato
pH	Potencial Hidrogeniônico
r.p.m	Rotação por minuto
Tr	Tempo de retenção
UV-Vis	Ultravioleta Visível
Φ	Diâmetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	<i>CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS: SINAPIS ALBA L.....</i>	<i>14</i>
2.2	<i>CONSIDERAÇÕES GERAIS: SINAPIS ALBA L.</i>	<i>15</i>
2.3	<i>BIOCATÁLISE.....</i>	<i>16</i>
2.4	<i>ENZIMAS E BIOCATALISADORES.....</i>	<i>18</i>
2.5	<i>POLIVINILPIRROLIDONA (PVP).....</i>	<i>22</i>
2.6	<i>ÁCIDOS GRAXOS.....</i>	<i>23</i>
2.7	<i>SAPONIFICAÇÃO E METILAÇÃO.....</i>	<i>26</i>
3	OBJETIVOS	28
3.1	<i>GERAL.....</i>	<i>28</i>
3.2	<i>ESPECÍFICOS.....</i>	<i>28</i>
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1	<i>DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS NAS SEMENTES DE SINAPIS ALBA L.</i>	<i>29</i>
4.1.1	<i>Método de Bradford.....</i>	<i>29</i>
4.2	<i>OBTENÇÃO DO ÁLCOOL PADRÃO POR VIA QUÍMICA.....</i>	<i>31</i>
4.3	<i>PROCESSOS BIOCATALÍTICOS.....</i>	<i>32</i>
4.3.1	<i>Quantidade de biocatalisador</i>	<i>32</i>
4.3.2	<i>Tempo reacional.....</i>	<i>35</i>
4.4.3	<i>Velocidade de agitação</i>	<i>38</i>
4.4.4	<i>Temperatura</i>	<i>40</i>
4.4.5	<i>Meio tamponante.....</i>	<i>43</i>
4.4.6	<i>Uso de co-solvente.....</i>	<i>45</i>
4.4.7	<i>Uso de Polivinilpirrolidona (PVP).....</i>	<i>48</i>
4.4.8	<i>Reações de biorredução utilizando derivados da acetofenona.....</i>	<i>51</i>
4.4.8.1	<i>Derivados para-substituídos</i>	<i>53</i>
4.4.8.2	<i>Derivados -meta substituídos.....</i>	<i>61</i>
4.4.8.3	<i>Derivados -orto substituídos.....</i>	<i>67</i>
4.4.9	<i>Reações de biorredução com outros compostos carbonilados</i>	<i>73</i>

4.5	<i>IDENTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS ATRAVÉS DOS DERIVADOS METILADOS POR CG/EM</i>	78
4	<i>METODOLOGIA EXPERIMENTAL</i>	82
4.1	<i>BIOCATALISADOR</i>	82
4.2	<i>MATERIAL UTILIZADO</i>	82
4.3	<i>MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO E ANÁLISE</i>	82
4.3.1	<i>Cromatografia em camada delgada (CCD)</i>	83
4.3.2	<i>Cromatografia de adsorção em coluna (CC)</i>	83
4.3.3	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</i>	84
4.3.4	<i>Espectroscopia na Região do UV/VIS</i>	85
4.3.5	<i>Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM)</i>	86
4.4	<i>DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS</i>	87
4.4.1	<i>Método de Bradford</i>	87
4.5	<i>PROCESSOS BIOCATALÍTICOS</i>	88
4.5.1	<i>Procedimento experimental geral utilizando as sementes de Sinapis alba L.</i>	88
4.5.1.1	<i>Quantidade de biocatalisador</i>	88
4.5.1.2	<i>Tempo reacional</i>	89
4.5.1.3	<i>Temperatura</i>	89
4.5.1.4	<i>Uso de co-solvente: Isopropanol</i>	90
4.5.1.5	<i>Meio tamponante: pH 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0</i>	90
4.5.1.6	<i>Uso de Polivinilpirrolidona (PVP)</i>	91
5	<i>CONSIDERAÇÕES FINAIS</i>	92
	<i>REFERÊNCIAS</i>	93

1 INTRODUÇÃO

A química orgânica é um tema em rápida mutação, cuja intensa atividade é atestada pelos inúmeros trabalhos de pesquisas que aparecem em periódicos antigos e recentes, assim como, pela proliferação de monografias e trabalhos de revisão em todos os aspectos. A síntese orgânica tradicional é vastamente aplicada na indústria química na produção de inúmeros compostos orgânicos na forma de produtos químicos finos, como: farmacêuticos, agroquímicos e cosméticos, entre outros. Muitas reações químicas praticadas nessas indústrias na produção de novos e conhecidos compostos utilizam um grande número de etapas e uma grande variedade de reagentes tóxicos (ISENMANN, 2013) que poluem drasticamente o meio ambiente (BANERJEE, 2017), e liberar grandes volumes de resíduos (SANSEVERINO, 1999), freqüentemente, nocivos.

Nos últimos anos as empresas buscam alternativas visando diminuir a poluição causada pelos processos orgânicos sintéticos. O desafio fundamental para as novas metodologistas é a produção desses compostos através de métodos que substituam o uso de reagentes, catalisadores e solventes tóxicos (FERREIRA, 2012; BANERJEE, 2017), ou seja, em condições ambientalmente saudáveis e sustentáveis. Como resultado, as reações de biocatálise passaram a ser muito utilizadas em substituição as metodologias tradicionais (WANG; SI; ZAHO, 2012), reconhecendo que a desejada sustentabilidade tem como base a inovação e o uso apropriado de matérias primas derivadas de fontes biológicas.

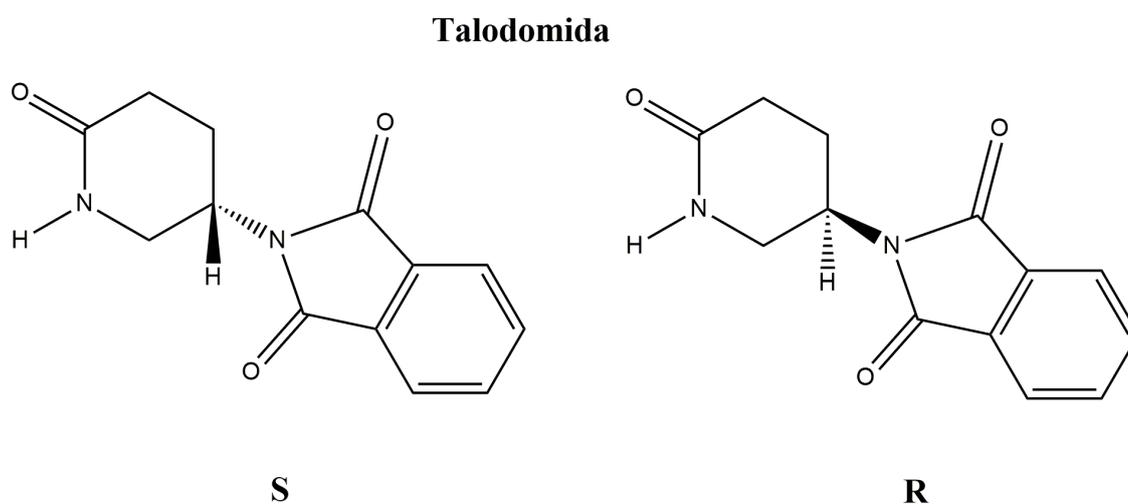
A biocatálise, em uma de suas vertentes, se notabiliza pela aplicação de enzimas para catalisar reações químicas específicas e se caracteriza por transformações químicas regioseletivas, quimiosseletivas e esterosseletivas (CARVALHO, 2012; BARNEJEE; SINGH; RAHMAN, 2012) e, também, por ocorrerem em meio aquoso gerando produtos biodegradáveis. Esses fatores, aliados a abundância de material vegetal ainda disponível, representam uma alternativa sintética bastante viável do ponto de vista econômico e ecológico (SOUZA, 2012; BIZERRA, 2012). Vale acrescentar que a grande maioria dos fármacos produzidos tem compostos quirais como princípios ativos e que é conhecida há muito anos a competência de fontes naturais em induzir quiralidade.

Assim, o crescente interesse no vasto potencial biotecnológico das reações enzimáticas, motiva e permite expandir o conhecimento acerca desses biocatalisadores

estimulando a aplicação da biocatálise através de metodologias adequadas para a solução de problemas, possibilitando planejar e projetar os produtos e processos de modo mais sustentável. Tal conhecimento é extremamente vantajoso para a produção de compostos quirais, enantiomericamente enriquecidos, principalmente nas indústrias farmacêutica e agroquímica, que buscam novas fontes de biocatalisadores para uma vasta gama de reações químicas (WEI *et al.*, 2016; CARVALHO, 2012; RODRIGUEZ *et al.*, 2011; SILVA, 2009; MARSAIOLI; PORTO, 2010).

Os estudos sobre a atividade biológica de enantiômeros podem ter se iniciado com a descoberta dos problemas na má formação congênita provocado pela utilização do enantiômero *S* da talidomida (Figura 1), fármaco usado no tratamento de náuseas em mulheres no início de gestação, que impulsionou a pesquisa e conhecimento acerca dos efeitos de compostos que apresentam estereocentros (COELHO, 2001).

Figura 1 - Estrutura dos isômeros da talidomida.



Fonte: Próprio autor.

Outros fármacos que tem atividade diferenciada para cada enantiômero (SILVA, 2015), podem ser citados: O propranolol possui o enantiômero *S*-(-) que atua como anti-hipertensivo mais eficientemente que o *R*-(+); o cloranfenicol apresenta o enantiômero *R,R*-(-), usado no tratamento antibacteriano, enquanto que o isômero *S,S*-(+) é inativo; o etambutol em que o *S,S*-(+) tem atividade tuberculástica e o enantiômero *R,R*-(-) causa cegueira.

Conforme demonstrado no caso da talidomida, enantiômeros podem atuar de forma específica no organismo a medida que, enquanto um enantiômero exibe ação favorável o outro pode ser inofensivo ou danoso, e causar efeitos danosos ou de toxicidade. Assim, devido suas estruturas espaciais diferentes (estereoisômeros), freqüentemente provocam respostas biológicas diferentes, o que explicaria a razão pela qual alguns fármacos têm efeitos colaterais. Conseqüentemente, a produção de compostos enantiomericamente puros é de suma importância e se estende a vários segmentos produtivos, principalmente, das indústrias farmacêutica, agroquímica e de perfumaria. (SILVA, 2015; CLAYDEN, GREEVES, WARREN, 2012; CROSBY, 1991).

Os álcoois quirais são utilizados como intermediários em várias sínteses quirais, como: na produção de agroquímicos, aromas, compostos bioativos e produtos farmacêuticos (TAN *et al*, 2016; WEI *et al*, 2016). Muitos compostos podem ser obtidos através de reações de redução de cetonas pró-quirais utilizando microorganismos, cultura de células, enzimas isoladas ou sistemas intactos de plantas como biocatalisadores (SOUZA, 2012). As oxidoreduções, especialmente as álcooldesidrogenases ou ADHs, estão presentes em muitos organismos biológicos e são enzimas que podem ser aplicadas na obtenção de álcoois quirais enantiomericamente puros a partir de compostos carbonílicos pró-quirais (TAN *et al*, 2016; WEI *et al*, 2016; ALVES, 2013; SOUZA, 2012; YANG *et al.*, 2006).

O emprego de enzimas puras em reações de biocatálise pode ser dispendioso e inviável economicamente quando comparado ao uso de células íntegras. Além disso, o processo de recuperação do meio reacional é difícil em muitos casos (FABER, 2000).

As álcooldesidrogenases, por exemplo, são enzimas dependentes de cofatores (NADH, NADPH), os quais são consumidos durante a reação de redução de compostos carbonílicos.

Sistemas integrais de plantas possuem cofatores próprios e órgão de regeneração intracelular evitando gastos adicionais com a adição de cofatores (BIZERRA, 2012). Logo, o alto custo relacionado à obtenção desses cofatores direciona as investigações para o uso de células íntegras nas reações de biorredução: baixo custo, estabilidade e de fácil obtenção (SOUZA, 2012; KURBANOGLU *et al.*, 2010).

Com base nessas considerações, o presente trabalho teve como objetivo dar continuidade aos estudos iniciados no nosso grupo de pesquisa relacionados à biocatálise, investigando a espécie *Sinapis alba* L., como fonte vegetal com potencial

promissor na biorredução de compostos carbonílicos. Em adição, foi realizado o estudo da composição dos ácidos graxos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS: *Sinapis alba* L.

Sinapis alba L. (mostarda amarela) pertence ao grupo das *Brassicaceae*, família composta por 338 gêneros (AL-QUDAH, 2011; SIMPSON, 2010) onde estão distribuídos 3.700 espécies. É caracterizada por ser uma planta herbácea com caule ereto, folhas alongadas, profundamente recortadas, exceto aquelas da parte superior dos caules, com lobos mais ou menos arredondados, penatipartidas; as flores são hermafroditas, amareladas; o fruto é do tipo síliqua e apresenta poucas sementes (Figura 2). É originária do Norte da África, da Europa e Ásia Ocidental, mas se adapta bem ao clima semi-árido (BASTANTE *et al*, 2016; APHORTEP, 2016; CARUSO, G. F. 2012; DUKARSKA, 2011; AL-QUDAH, 2011; LEVETIN AND MCMAHON, 2006; SIMPSON, 2010; GARNIER *et al*, 1961; FRANKTON AND MULLIGAN, 1987; DOTHAN, 1978; CLAPHAM AND WARBURG, 1962).

Figura 2 - *Sinapis alba* L.



Fonte: Adaptado (<http://www.cpt.com.br/cursos-horticultura-agricultura/artigos/horta-como-plantar-mostarda-sinapis-alba>).

2.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS: *Sinapis alba* L.

Segundo Dukarska (2011) os maiores produtores de mostarda amarela são o Canadá que em 2009 produziu 208,3 mil toneladas, o Nepal com 135,5 mil toneladas e a Ucrânia com 118,2 mil toneladas. As condições climáticas e agrícolas de processamento, entre outros fatores, podem afetar a constituição das sementes que possuem sabor pungente e odor de sulfureto devido aos derivados de isotiocianato voláteis, obtidos por hidrólise de glucosinolatos (HASHEM, 1999; LIN, PRESTON, WEI, 2000; AFSHARYPUOR AND BALAM, 2005; AL-QUDAH, 2010). Quando empregada como cultura secundária, aumenta a atividade biológica do solo e em virtude de seu efeito fitossanitário, reduz o risco de muitas doenças e pragas de cereais (NETO, 2014; ALCÁNTARA, C.; PUJADAS, A.; SAAVEDRA, M., 2011). As sementes de mostarda amarela são utilizadas na indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica (DUKARSKA, 2011). A importância medicinal deve-se às suas atividades antineoplásicas, antimicrobianas e inseticidas.

A forragem verde, cortada antes da floração, tem alto valor nutritivo e pode ser aproveitada como alimento para o gado e aves de capoeira. A folha da mostarda também é usada na forma de refogados, saladas, em sanduíches, tortas e conservas. É uma verdura com alto valor nutritivo, rica em minerais como cálcio, ferro, fósforo e em vitaminas A, B1, B2 e B5, além de fibras. As sementes são usadas para a produção de mostarda (BASTANTE *et al*, 2016; APHORTEP, 2016; BROWN *et al*, 1999; MANESH AND KUTTAN, 2003). A mostardeira possui algumas vantagens que facilitam a sua utilização como um substituto da madeira na fabricação de painéis (DUKARSKA, 2011; BENDIMERAD AND BENDIAB, 2007).

Uma vantagem da mostardeira é sua taxa de crescimento rápido e curto período de vegetação (80-125 dias), com produtividade de 600 a 1200 quilos por hectare. As folhas são colhidas de 45 a 50 dias, após a semeadura é comercializada. É uma planta muito resistente às diferentes condições atmosféricas e do solo, podendo também, melhorar a rentabilidade do cultivo (APHORTEP, 2016; CARUSO, G. F. 2012; PAUNERO, 2012; DUKARSKA, 2011; ALCÁNTARA, C.; PUJADAS, A.; SAAVEDRA, M., 2011).

Nos últimos anos, aumentou o interesse na produção de biodiesel como um combustível alternativo a partir de fontes renováveis, como óleos vegetais e gorduras animais. Nesse sentido, as sementes da mostarda amarela apresenta uma fonte promissora, pois, seu óleo atende aos parâmetros exigidos para a produção de biodiesel (BASTANTE *et al*, 2016; CARUSO, G. F. 2012). São mais tolerantes à seca, à umidade, ao calor e à geada do que algumas sementes utilizadas na produção de biodiesel como, por exemplo, a colza (canola) (KISZTER, 2011).

O óleo de mostarda bruto, segundo a literatura, tem alto teor energético, sendo constituído por 20 à 38% de óleo e 28 à 36% de proteínas. Tem uma composição química especial em ácidos gordos: os óleos de mostarda amarela contêm aproximadamente 20 e 28% em peso de ácido oleico, 10 e 12% em peso de ácido linoleico, 9,0 e 9,5% em peso de ácido linolênico e 30 e 40% de ácido erúico (BASTANTE *et al*, 2016; DAMIAN, 2014; ROSIE *et al*, 2013; CARUSO, G. F. 2012; DUKARSKA, 2011; SEFIDKON *et al*, 2002) Os ácidos monoinsaturados de cadeia longa, gadoleico e erúico, são um dos principais componentes dos triacilgliceróis encontrados na maioria das sementes crucíferas. Entretanto, não são encontrados em sementes de colza e nabo. A fim de diminuir o preço da matéria-prima, é preferível que se utilize óleos não comestíveis para seres humanos. Em muitos países, o óleo de mostarda não é considerado adequado para consumo humano (MUKHERJEE, 1983).

A planta, principalmente as sementes, contém compostos característicos chamados de glucosinolatos que são responsáveis pelo sabor picante da mostarda. Estes compostos caracterizam a família. O principal glucosinolato em *Sinapis alba* é o sinalbin e também estão presentes a sinigrina e a glucobrassicina (CLEMENTE *et al.*, 2016; WU, 2016; DAMIAN, 2014; ROSIE *et al*, 2013; KISZTER, 2011. É rico em tocoferóis, o que lhe confere propriedade antioxidante. Estudo recente (CLEMENTE *et al.*, 2016) indica atividade antimicrobiana do óleo fixo dessa semente.

2.3 BIOCATÁLISE

Estudos, relativamente recentes, indicaram que muitos vegetais que são facilmente acessíveis em muitos países, podem constituir um caminho para conduzir transformações químicas sintéticas na obtenção de produtos de importância tecnológica

obedecendo parâmetros fundamentais, como os aspectos econômico e ecológico. Neste contexto, insere-se o uso de plantas como biocatalisadores, particularmente, o uso de materiais intactos de plantas.

Diversas reações orgânicas na obtenção de inúmeros produtos são aceleradas por substâncias catalisadoras, geralmente, tóxicas e não biodegradáveis, acarretando graves problemas ambientais. Contrariamente, os catalisadores biológicos (enzimas) que permitem as transformações químicas no corpo humano (metabolismo), além de alta eficiência, são biodegradáveis e catalisam reações altamente seletivas (FONSECA, 2013; BARNEJEE, SINGH, RAHMAN, 2012; ASSUNÇÃO, 2008; LILJEBLAD, KANERVA, 2006).

As plantas contêm enzimas com diferentes propriedades (BIROLI, 2015), despertando um crescente interesse devido ao amplo potencial biotecnológico das reações enzimáticas. A utilização de partes de plantas nas transformações biocatalíticas vem crescendo nos últimos anos nas mais diversas áreas do conhecimento, com destaque nas indústrias farmacêutica, cosmética, alimentícia e agroquímica. O estudo das enzimas sob o ponto de vista reacional permite um melhor entendimento de seu comportamento, norteador as várias aplicações de enzimas proteases, acilases, oxirredutases, amilase, glicosidase, celulasas e lipases (BARON, 2008).

As reações biocatalisadas surgiram como uma alternativa eficaz para a chamada química verde, através das quais, muitos processos industriais podem ocorrer de forma a minimizar os impactos ambientais (VIEIRA *et al.*, 2010; SOUZA, 2012). Um grande número de compostos utilizados como princípios ativos em produtos acabados nas indústrias de perfumaria, agroquímica e, sobretudo, farmacêutica, possuem moléculas quirais, com um ou mais centros quirais. Muitos fármacos apresentam moléculas quirais em sua composição no qual um dos enantiômeros exerce o efeito fisiológico desejado, enquanto o outro, é inativo ou com efeito indesejado. Um exemplo conhecido há muitos anos é o caso da talidomida, tratado como marco inicial para os estudos da enantioseletividade de compostos orgânicos, em que o enantiômero *S* está relacionado com os efeitos teratogênicos enquanto o enantiômero *R* é responsável pelas propriedades sedativas (SILVA, STAMBUK, NASCIMENTO, 2010; GARRITZ e CHAMIZO, 1994).

Assim, a quiralidade, obtida por indução assimétrica em reações químicas, tornou-se imprescindível na produção de substâncias portadoras de alguma atividade biológica. É conhecida há muito tempo, a habilidade de enzimas em induzir quiralidade. As reações catalisadas por enzimas apresentam no aspecto reacional três tipos de

seletividade: quimioseletividade, regioseletividade e enantioseletividade. A grande maioria das enzimas atuam como catalisadores quirais e, conseqüentemente, alguma forma pró-quiral ou quiral no substrato é reconhecido pela enzima, o que permite reações com elevados excessos enantioméricos, levando ao enantiômero de interesse (a atividade biológica depende da pureza enantiomérica).

Em síntese, tendo em vista diminuir custos, energia, tempo e poluição ambiental, a biocatálise utiliza catalisadores naturais (microorganismos, vegetais, entre outros) como uma alternativa ecologicamente viável para em alternativa aos processos químicos tradicionais na produção dos mais diversos compostos via síntese orgânica. A área da biocatálise desenvolve transformações orgânicas para a produção de substâncias bioativas com alto grau de pureza (FONSECA, 2013; WANG; SI; ZAHO, 2012; RODRIGUEZ *et al.*, 2011).

Devido a variedade de aplicações supracitadas e ao elevado valor percentual de proteínas (de 28 a 36%) presentes nas sementes de *Sinapis alba* L., optou-se por estudar a potencial aplicabilidade das sementes como fonte biocatalisadora. A quantidade de proteína presente nessa semente é um indicativo de seu potencial biocatalítico (CLEMENTE *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2016).

O uso de plantas em biotransformações é conduzido de modo geral através de três sistemas distintos: a) cultura de células; b) enzimas isoladas; c) partes integrais.

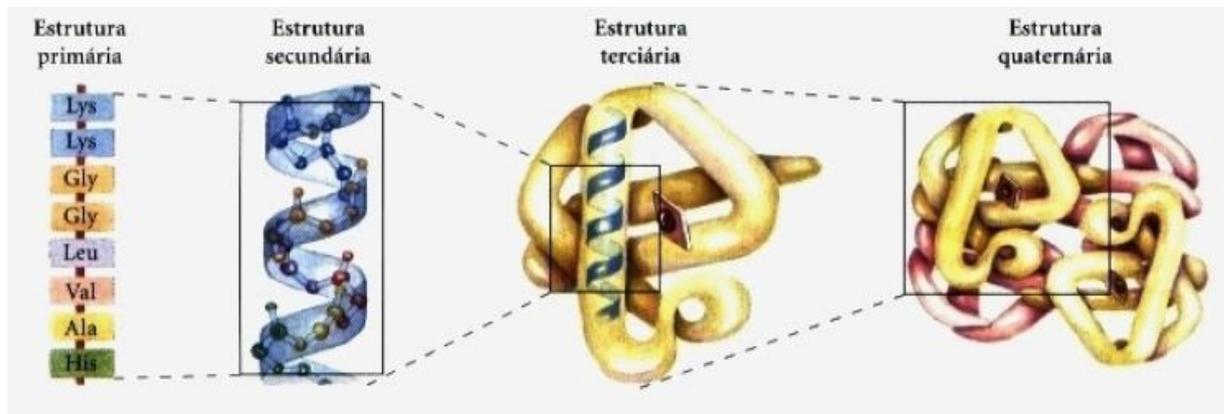
2.4 ENZIMAS E BIOCATALISADORES

Os processos biocatalíticos utilizam enzimas para promover reações químicas, enzimas essas, obtidas a partir de fontes vegetais, fúngicas, microbianas e animais (CARVALHO, 2012; NAKAMURA *et al.*, 2003).

Enzimas são proteínas que atuam como catalisadores na maioria das reações químicas que ocorrem no metabolismo celular. São constituídas por aminoácidos unidos através de ligações peptídicas formando estruturas muito complexas. Na estrutura das proteínas estão presentes grupos polares tais como COO^- , OH , NH_3^+ , SH e CONH_2 . A seqüência de aminoácidos conectados formando a cadeia protéica é chamada estrutura primária. A conformação tridimensional dessa seqüência é denominada estrutura secundária e o arranjo dessas estruturas tridimensionais forma a estrutura terciária da

proteína. A junção de duas ou mais estruturas terciárias origina a estrutura quaternária (Figura 3).

Figura 3 - Estrutura protéica.



Fonte: Lehninger, 4a edição.

Ao longo da estrutura terciária existem pequenas regiões denominadas de sítio ativo. O local onde se encontra o sítio ativo pode facilitar ou dificultar a reação da enzima com as moléculas do substrato. Consequentemente, a orientação espacial (conformação) e a estrutura química do sítio ativo da enzima determinam sua especificidade numa reação de biocatálise. As enzimas facilitam as reações químicas por fornecerem caminhos nos quais apresentam menor energia de ativação e, consequentemente, a reação se processa mais rapidamente (ASSUNÇÃO, 2008).

De acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM) as enzimas podem ser classificadas em seis diferentes grupos, subdivididas de acordo com o tipo de reações que catalisam (FABER, 2004) (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação das enzimas.

N úmero	Classes	Tipo de reação catalisada	Subclasses	Utilidade^a
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons ou remoção de hidrogênio	Hidrogenases, oxidases, peroxidases e redutases	25%
2	Transferases	Reações de transferência de grupos	Transaldolases e transcetolases	5%
3	Hidrolases	Reações de hidrólise	Esterases, lipases, peptidases, fosfatases	60%
4	Liasas	Reações de adição de grupos a ligação dupla ou formação de ligações duplas por remoção de grupos	Descarboxilases e fosfatases	7%
5	Isomerasas	Transferência de grupos dentro da molécula para produzir isômeros	Racemases e epimerases	2%
6	Ligases	Formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O, C-N e ésteres de fosfato	Sintetases	1%

^aUtilidade estimada das classes de enzimas em transformações de substratos não naturais. **Fonte:** Próprio autor.

As principais vantagens de usar enzimas em reações biocatalíticas são as condições reacionais: temperaturas ambientes (em torno de 20° a 40°C) e em soluções com pH próximos de 7 (variando de 5 a 8), fatores fundamentais que levam a uma diminuição de produtos resultantes de reações colaterais como decomposição, racemização, eliminação e isomerização. Outra vantagem, na comparação dos biocatalisadores enzimáticos com os catalisadores tradicionais é que estes últimos contêm metais pesados, ao passo que, os primeiros são completamente biodegradáveis (FONSECA, 2013; FABER, 2004).

Pode-se ainda destacar outras importantes vantagens do uso de biocatalisadores em comparação aos catalisadores tradicionais:

- São catalisadores eficientes que aceleram reações com velocidade de 10^6 a 10^{14} vezes mais rápidas que as correspondentes reações não catalisadas;

- São ambientalmente limpos, podendo ser decompostos sem prejudicar o meio ambiente;

- Atuam em condições reacionais brandas, como temperatura ambiente e valores de pH próximos de 7;

- Catalisam reações diversas como redução, oxidação, esterificação, hidrólise, entre outras;

- Catalisam reações com alta:

Quimiosseletividade - a enzima atua em um único grupo funcional, mantendo os outros grupos funcionais presentes na molécula inalterados;

Regiosseletividade: - a enzima distingue grupos funcionais quimicamente semelhantes, em diferentes regiões da molécula;

Estereosseletividade - a enzima atua sobre o substrato pró-quiral transformando-o em um enantiômero específico, possibilitando a obtenção de produtos enantiomericamente puros (ARAÚJO, 2010).

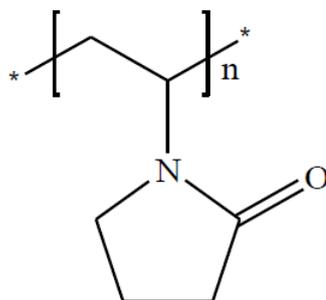
Em adição, as reações utilizando catalisadores biológicos, apresentam outra vantagem muito importante, a possibilidade de atuar não somente em meio aquoso, mas também em solvente orgânico, contrariamente ao que se pensava no passado. Normalmente, utilizam-se para esse fim enzimas imobilizadas em um suporte polimérico adequado, propiciando às enzimas uma maior resistência as variações das condições do meio.

2.5 POLIVINILPIRROLIDONA (PVP)

O uso do polímero polivinilpirrolidona, conhecido como PVP, tem sido relatado em diferenciadas aplicações nos últimos anos. Assim, conforme relatos da literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2011), ele é utilizado na solubilização de fármacos hidrofóbicos nos quais são formados micelas com núcleos hidrofóbicos; pode ser aplicado na gelificação em substituição ao polietilenoglicol e ao gel F127 usado no tratamento de queimaduras (RICARDO *et al.*, 2012); é usado como inibidor de hidrato cinético em soluções salinas e foi relatado que na presença de NaCl prolonga significativamente o tempo de indução (TALAGHAT, 2014; SHARIF *et al.*, 2014; ZHAO *et al.* 2015; KHODAVERDILOO *et al.*, 2016; JOKANDAN *et al.*, 2016); exibe uma excelente estabilidade e um alto desempenho em células de fluxo redox (ZENG *et al.*, 2016) e, melhora a absorção oral e promove maior estabilidade fotoquímica da curcumina (KADOTA *et al.*, 2016).

Quimicamente, o PVP é usado como suporte na síntese de 7-hidroxi-4-metilcumarina através da reação de Pechmann com o catalisador de ácido fosfotúngstico (LI, QI e HUANG, 2016). É um polímero que melhorou as taxas de conversão e excesso enantiomérico para reações de redução com derivados da acetofenona e outros compostos carbonilados de Souza (2012) e de Alves (2013), pois atua como um protetor removendo compostos fenólicos naturais de extratos enzimáticos, tornando o meio livre de possíveis interferentes à reação e/ou inibidores (Figura 4).

Figura 4 - Estrutura monomérica do polímero PVP.



Fonte: Próprio autor.

2.6 ÁCIDOS GRAXOS

As gorduras e óleos comestíveis comuns são em grande parte constituídos por triacilgliceróis, ésteres formados pela ligação de três moléculas de ácidos graxos com o 1,2,3-propanotriol, conhecido como glicerol. Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos de cadeia alifática de natureza hidrofóbica, podendo ter de quatro a vinte e quatro átomos de carbono, em que a grande maioria possui número par de carbonos. O estado físico dos triacilgliceróis é determinado pelas estruturas das cadeias carbônicas dos ácidos graxos (BAYARD, 2017) que podem ser saturadas ou insaturadas. Estão listadas nas Tabelas 2 e 3 os principais ácidos graxos saturados e insaturados presentes na natureza e suas respectivas fontes. Entre os ácidos insaturados, os mais comuns são o oléico, linoléico e linolênico (TOFANINI, 2004; BLOCK, 1992)

Tabela 2 - Ácidos graxos saturados mais comuns.

NOME USUAL	NOME SISTEMÁTICO	Nº DE CARBONOS	FONTE
Butírico	Butanóico	4	Gordura do leite
Capróico	Hexanóico	6	Gordura do leite, babaçu, coco
Caprílico	Octanóico	8	Gordura do leite, babaçu, coco, semente de uva
Cáprico	Decanóico	10	Coco
Láurico	Dodecanóico	12	Gordura do leite, coco
Mirístico	Tetradecanóico	14	Noz moscada, gordura do leite, coco, soja, algodão, oliva, abacate
Palmítico	Hexadecanóico	16	Amendoim, milho, manteiga de cacau, toucinho
Esteárico	Octadecanóico	18	Gordura animal, manteiga de cacau
Araquídico	Eicosanóico	20	Amendoim
Behênico	Docosanóico	22	Mostarda, colza, amendoim
Lignocérico	Tetracosanóico	24	Amendoim, mostarda, colza, gergelim, girassol (pequenas quantidades)

Fonte: Próprio autor.

Os ácidos graxos saturados entram na formação das gorduras (sólidas) de origem animal e vegetal (MOREIRA *et al.*, 2002). Uma dieta rica em ácidos graxos saturados promove o aumento da concentração de colesterol no sangue (SANTOS *et al.*, 2012), e

o consume em excesso está relacionado com o aumento do risco de doenças cardiovasculares (NASCIUTTI, 2015; SANTOS *et al.*, 2013).

Tabela 3 - Ácidos graxos insaturados mais comuns.

NOM E USUAL	NOME SISTEMÁTICO	Nº DE CARBONOS	DUPLAS LIGAÇÕES	FONTE
Capro léico	9-decenóico	10	1	Gordura do leite
Lauro léico	9- dodecenóico	12	1	Gordura do leite
Mirist oléico	9- tetradecenóico	14	1	Gordura animal
Oléic o	9-(Z)- octadecenóico	18	1	Maioria dos óleos e gorduras
Linol éico	9(Z),12(Z)- octadecadien óico	18	2	Maioria dos óleos e gorduras
Linol ênico	9(Z),12(Z),1 5(Z)- octadecatrie nóico	18	3	Soja, linhaça, gérmen de trigo
Gadol éico	9- eicosaenóico	20	1	Óleos de peixes, animais marinhos
Erúci co	13- docosenóico	22	1	Mostarda, colza

Fonte: Próprio autor.

Pesquisa em animais e estudos epidemiológicos e clínicos demonstraram que os ácidos graxos poli-insaturados são importantes para funções biológicas, pois regulam o metabolismo das prostaglandinas e reduzem o nível de triacilgliceróis (MOREIRA, 2001; GREENE E SELIVONCHICK, 1987, SIMOPOULOS, 1991). O ácido eicosapentaenóico (ácido (5Z, 8Z, 11Z, 14Z, 17Z) -eicosa- 5,8,11,14,17-pentenóico) está relacionado com à saúde cardiovascular, pois sua presença nos tecidos permite a regulação das atividades envolvidas no metabolismo dos lipídeos plasmáticos, com a

agregação das plaquetas e o processo de coagulação sanguínea (LEAF AND KANG, 1998).

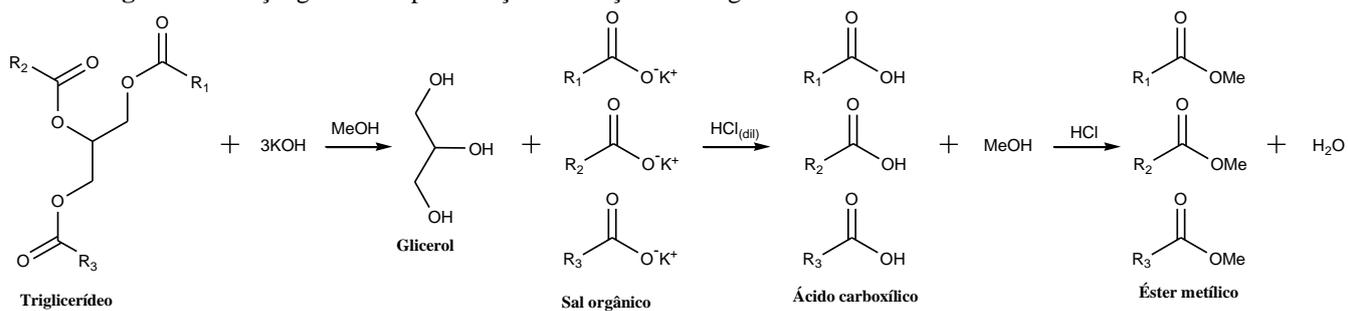
2.7 SAPONIFICAÇÃO E METILAÇÃO

Os óleos vegetais são utilizados para a produção de sabões através de reações de saponificação (Figura 5). Durante o processo reacional, é produzida glicerina que pode ser removida ou mantida na composição final do sabão. A glicerina pode agir como umectante e emoliente ao absorver a umidade do ar e tornar a pele mais suave, respectivamente,

As bases usadas determinam a consistência do sabão obtido; o KOH e NaOH possibilitam a fabricação de um sabão mole e de um sabão duro, respectivamente (BARATA, 2003; VINEYARD e FREITAS, 2013). Ácidos graxos com ligações duplas formam sabões com estruturas menos rígidas, sendo mais fluidos. Também é aceito o fato de que os triglicéridos formados por moléculas muito grandes nos óleos vegetais resultam sabões com maior viscosidade cinemática (TOSCANO *et al.*, 2012; ESTEBAN *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2010; IGWE, 2004).

Uma das reações mais usadas para a produção de ésteres metílicos é a saponificação seguida da metilação dos ácidos graxos (DA SILVA, 2016). O processo reacional saponificação/metilação produz ésteres metílicos de ácidos graxos a partir de ácidos graxos livres e também a partir de lipídios com ligação éster, éter e amina. A reação ocorre em duas etapas, ambas sob temperatura elevada. A primeira, denominada de saponificação é resultante de reação do ácido com uma base forte, usualmente NaOH ou KOH. A segunda, metilação do sal de ácido por reação com metanol catalisada por um ácido mineral, usualmente, HCl ou H₂SO₄.

Figura 5 - Reação geral de saponificação/metilação de um glicerídeo.



Fonte: Da Silva, 2016.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Estudar as sementes da planta sinapis alba tendo em vista: a) Investigar a possibilidade do uso das sementes da espécie *Sinapis alba* L. (mostarda amarela) na forma integral para a redução de cetonas aromáticas visando a obtenção de álcoois quirais como precursores de interesse químico-industrial; b) Investigar a composição química de ácidos graxos presentes na semente.

3.2 ESPECÍFICOS

Obter álcoois quirais utilizando condições de reações simples e de baixo custo.

Determinar as percentagens de conversão de cetonas em álcoois e comparação em reações utilizando outros biocatalisadores vegetais.

Determinar as percentagens de excessos enantioméricos dos álcoois R/S e comparação em reações utilizando outros biocatalisadores vegetais.

Otimizar as reações de modo a permitir a obtenção dos produtos de redução com altas conversão e excesso enantiomérico.

Obter os produtos desejados através de reações em condições ambientais saudáveis: baixa temperatura; meio aquoso (principalmente); menor tempo; isento de catalisadores tóxicos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS NAS SEMENTES DE *Sinapis alba* L.

Inicialmente foi feita a determinação do teor de proteínas nas sementes de *Sinapis alba* L. para avaliar sua potencialidade como fonte biocatalítica em reações de biorredução. A medida do teor de proteínas serve de estimativa da concentração de enzimas no material vegetal.

Algumas metodologias são encontradas na literatura relacionadas com determinação da concentração de proteínas, tais como, Método do Biureto, Método de Lowry e Método de Bradford, entre outros. Alguns se baseiam em reação química com as proteínas, outros, na obtenção de compostos coloridos através da fixação de corantes na superfície da proteína (MIWA, 2003).

No presente trabalho foi utilizado o método de determinação de proteínas proposto por Bradford, que apresenta como principal vantagem, a alta sensibilidade (ZAIA, 1998; LUCARINI; KILIKIAN, 1999).

4.1.1 Método de Bradford

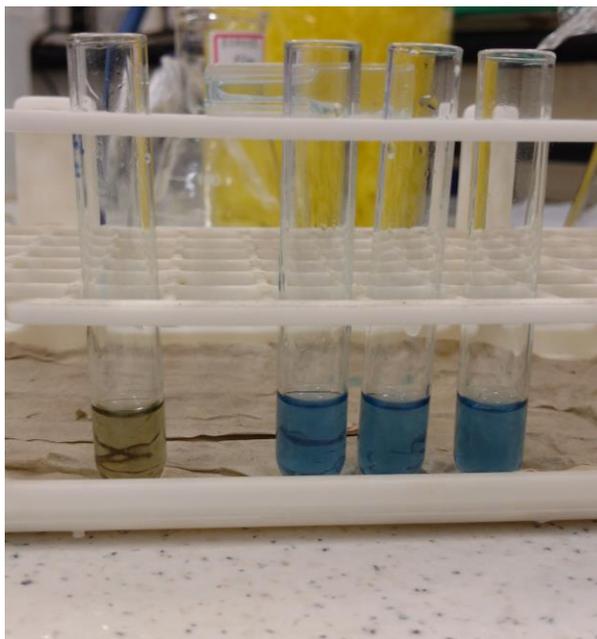
O método de Bradford para a determinação de proteínas totais é bastante utilizado porque os resultados são obtidos rapidamente (FERREIRA, 2012). Além disso, é sensível e está sujeito a um número pequeno de interferentes (ZAIA, 1998), como, uréia, lipídios, cloretos (ASSUNÇÃO, 2008).

O processo tem como base a interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas, como por exemplo, arginina e histidina (SOUZA, 2012). As proteínas de alto peso molecular interagem com o corante BG-250 provocando o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm

(MARTINA; VOJTECH 2015; ASSUNÇÃO, 2008; COMPTON; JONES, 1985; LUCARINI; KILIKIAN, 1999; ZAIA *et al.*, 1998).

A presença do corante BG-250 altera a coloração do extrato enzimático para a cor azul, dando um indicativo da presença de proteínas solúveis, conforme Figura 6, detalhada a seguir.

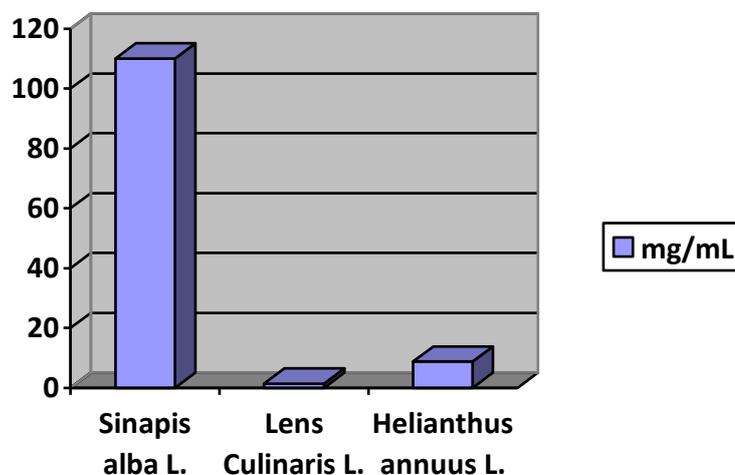
Figura 6 - Detalhe do método de Bradford para determinação de proteínas após a adição do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250.



Fonte: Próprio autor.

O extrato aquoso das sementes de *Sinapis alba* L apresentou um valor considerável de proteínas solúveis de 110,00 mg/mL, em comparação a valores encontrados em outros biocatalisadores como 1,38 mg/mL em *Lens Culinaris* L. (FERREIRA, 2012) e 8,80 mg/mL em *Helianthus annuus* L. (SOUZA, 2012), revelando a promissora potencialidade deste material como fonte biocatalítica. O Gráfico 1 (página 32) expõe o estudo comparativo do teor de proteínas presentes nos materiais vegetais supracitados.

Gráfico 1 - Estudo comparativo do teor de proteínas utilizando o método de Bradford para a determinação de proteínas solúveis totais.

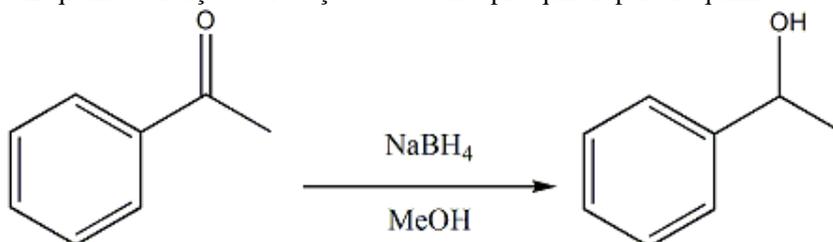


Fonte: Próprio autor

4.2 OBTENÇÃO DO ÁLCOOL PADRÃO POR VIA QUÍMICA

A acetofenona, uma cetona pró-quiral utilizada como substrato modelo nas reações de biocatálise, foi reduzida mediante reação química clássica, utilizando $\text{NaBH}_4/\text{MeOH}$ (Figura 7). O álcool, após purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica, foi obtido com ótimo rendimento (89%). A finalidade foi a obtenção do álcool 1-feniletanol para padrão de comparação.

Figura 7 - Esquema da reação de redução das cetonas pró-quirais por via química.

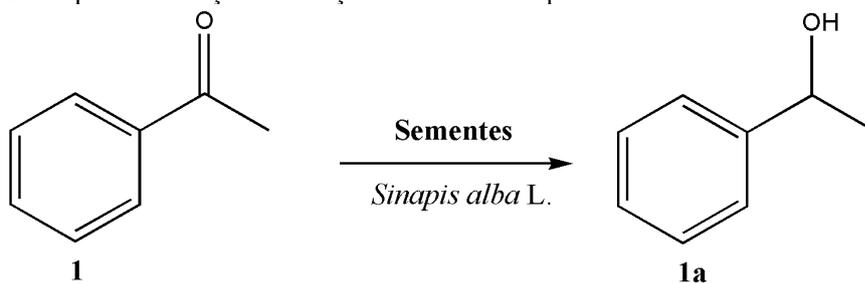


Fonte: Próprio autor.

4.3 PROCESSOS BIOCATALÍTICOS

Tendo em vista verificar a presença de enzimas redutases nas sementes de *Sinapis alba* L., a acetofenona (Figura 8), como substrato de referência, foi submetida a reação com o material vegetal para avaliar seu potencial biocatalítico em reação de redução. Numa primeira reação, foram utilizadas 0,05 g de substrato, 5,0 g do biocatalisador, 50,0 mL de água, agitação a 150 rpm e temperatura ambiente (30 °C) por 72 horas. Em seguida, foram realizados processos em diferentes condições reacionais objetivando melhores rendimentos (% de conversão) e excessos enantioméricos (% de *ee*), variando determinados parâmetros, tais como: quantidade de biocatalisador, velocidade de agitação, tempo de reação, temperatura, uso de co-solvente, meio tamponante (pH) e reação em presença de polivinilpirrolidona (PVP). Os resultados obtidos foram apresentados e discutidos nos itens a seguir.

Figura 8 - Esquema da reação de redução da acetofenona por via enzimática.



Fonte: Próprio autor.

4.3.1 Quantidade de biocatalisador

O estudo iniciou com a variação da quantidade do biocatalisador (sementes de *Sinapis alba* L.) com o objetivo de investigar a melhor relação substrato/biocatalisador e seu potencial biocatalítico frente à reação de biorredução da acetofenona. O material vegetal (sementes) foi previamente submetida à assepsia, utilizando-se solução de hipoclorito de sódio (5%), em seguida lavada com água destilada e seca. Em seguida foram efetuados vários experimentos, utilizando 0,05 g de substrato (quantidade fixada para todos os experimentos), 50 mL de água de destilada, com variação da quantidade

de biocatalisador de 5,0 g a 25,0 g em acréscimos de 5,0 g (Tabela 4, página 34). As reações foram realizadas sob agitação de 150 r.p.m., a temperatura ambiente por 72 horas. No geral, moderados valores de conversão (%) e de excesso enantiomérico (e.e.) foram observados (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados de biorredução da acetofenona utilizando 5 g, 10 g, 15 g, 20 g e 25 g de sementes *Sinapis alba* L.

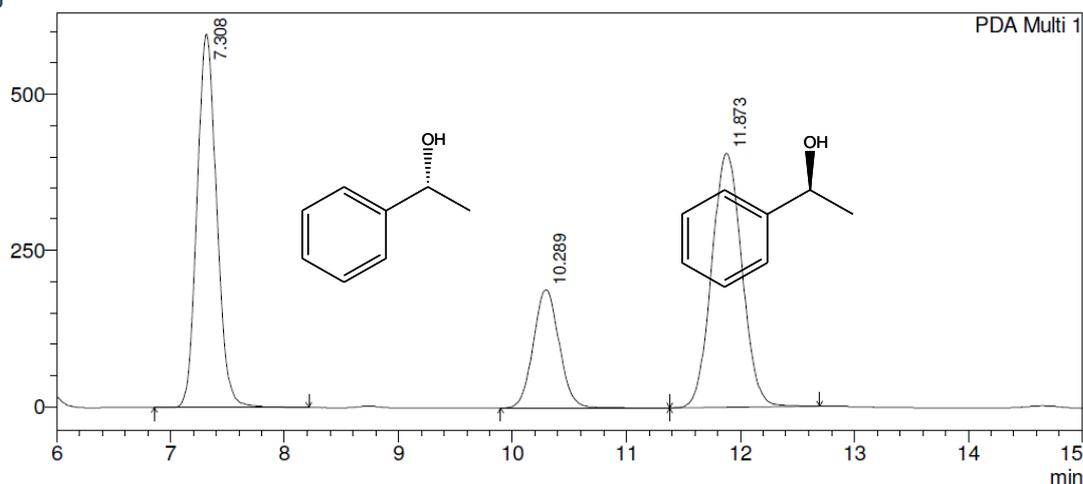
Quantidade de sementes de <i>Sinapis alba</i> L.	Conversão	ee (%)
5 g	37,01	35,05
10 g	44,08	37,15
15 g	52,43	43,22
20 g	51,74	36,42
25 g	43,63	48,43

Fonte: Próprio autor

Foi observado que o rendimento reacional aumenta gradativamente quando a quantidade do biocatalisador vai de 5,0 a 15,0 g, passando a decrescer um pouco a partir de 20,0 g a 25,0 g.

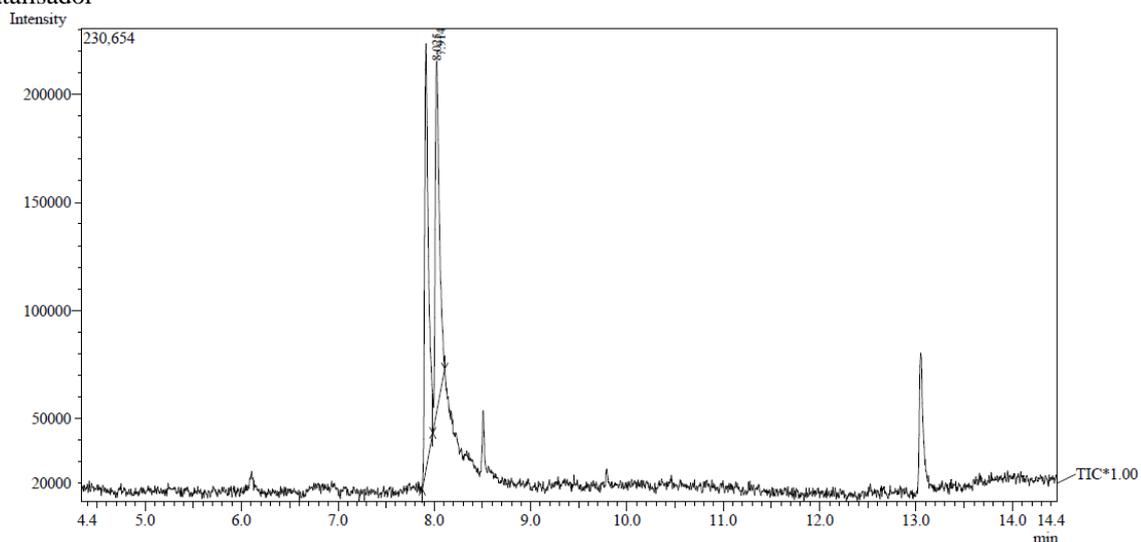
A melhor conversão foi obtida utilizando 15,0 g do biocatalisador com 52,43% de rendimento do 1-feniletanol. O excesso enantiomérico de 43,2 % do isômero (*S*) foi considerado o melhor, em termos relativos. Os cromatogramas obtidos para cada análise, indicativos da conversão e do excesso enantiomérico são apresentados nas Figura 9 e Figura 10, respectivamente. O espectro de massas do produto reacional [álcool-(*R,S*)] é apresentado na Figura 11. O Gráfico 2 mostra um comparativo dos resultados obtidos em função da relação substrato/biocatalisador.

Figura 9 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução da acetofenona utilizando 15 g de biocatalisador.



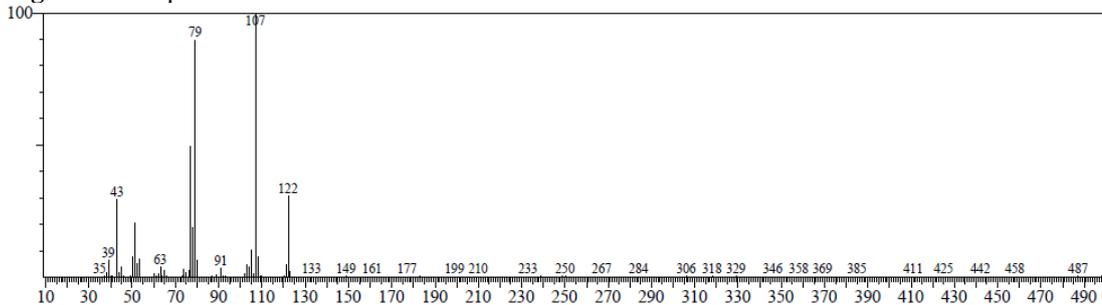
Fonte: Próprio autor

Figura 10 - Cromatograma (CG-EM) do produto da biorredução da acetofenona utilizando 15 g de biocatalisador



Fonte: Próprio autor

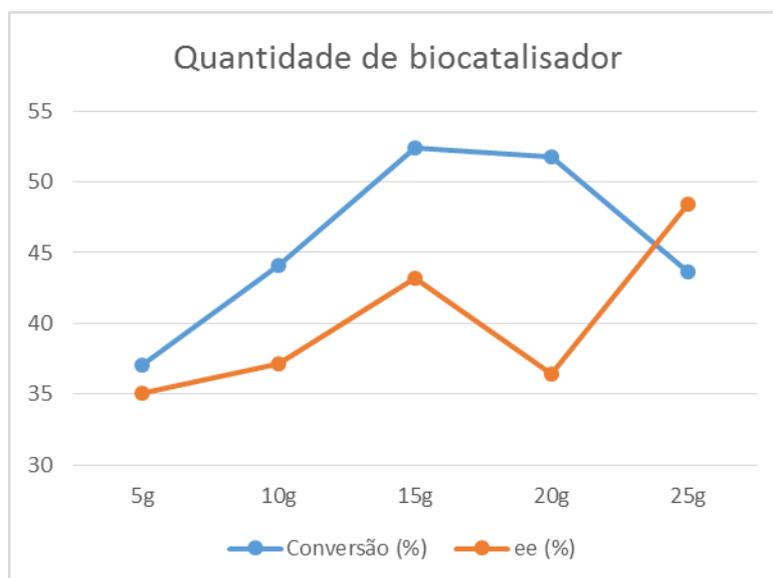
Figura 11 - Espectro de massas do 1-feniletanol



Fonte: Próprio autor

O espectro de massa (Figura 11) do produto com íon molecular em m/z 122 e pico base em m/z 107 ($M - 15$) está em acordo com a estrutura do 1-feniletanol.

Gráfico 2 - Perfil de conversão da biorredução da acetofenona e do excesso enantiomérico utilizando diferentes proporções de biocatalisador.



Fonte: Próprio autor.

A partir dos resultados acima, os demais parâmetros de reação, foram analisados utilizando 15,0 g das sementes de *Sinapis alba* (biocatalisador).

4.3.2 Tempo reacional

Estabelecida a relação substrato/enzima (0,05 g/15 g), foram iniciados os ensaios para a otimização do tempo reacional. Os rendimentos reacionais foram calculados entre 12 e 120 horas em intervalos de 12 horas, nas seguintes condições: 0,05 g de acetofenona e 15,0 g de biocatalisador em 50,0 mL de água a 150 r.p.m. A Tabela 5 (página 37) mostra os resultados obtidos para a conversão e o excesso enantiomérico. O Gráfico 3 (página 38) mostra o perfil dos resultados obtidos pela biorredução da acetofenona utilizando sementes de *Sinapis alba* L. como biocatalisador.

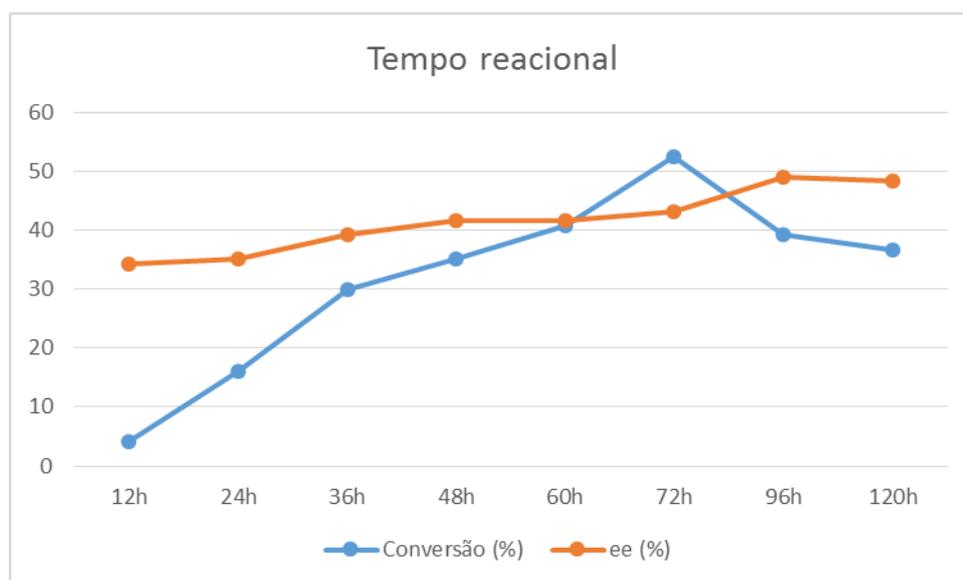
Tabela 5 - Resultados de biorredução da acetofenona realizada em 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h, 96 h e 120 h utilizando sementes *Sinapis alba* L como biocatalisador.

Tempo de reação	Conversão	ee (%)
12 h	4,11	34,22
24 h	16,15	35,19
36 h	29,95	39,21
48 h	35,16	41,65
60 h	40,68	41,54
72 h	52,43	43,22
96 h	39,18	49,09
120 h	36,73	48,25

Fonte: Próprio autor

Os resultados demonstraram que a conversão se eleva gradativamente até 72 horas quando atinge valor máximo com 52,43% de 1-feniletanol produzido, diminuindo a conversão após este tempo. Os valores de *ee* encontrados não foram satisfatórios, porém, em face de melhor conversão em 72 horas com o *ee* de 43,2 %, este foi o tempo tomado como padrão para as demais reações de biorredução. Embora em 96 e 120 horas tenham ocorrido melhores enantioseletividades, os tempos de reações foram considerados demasiadamente longos.

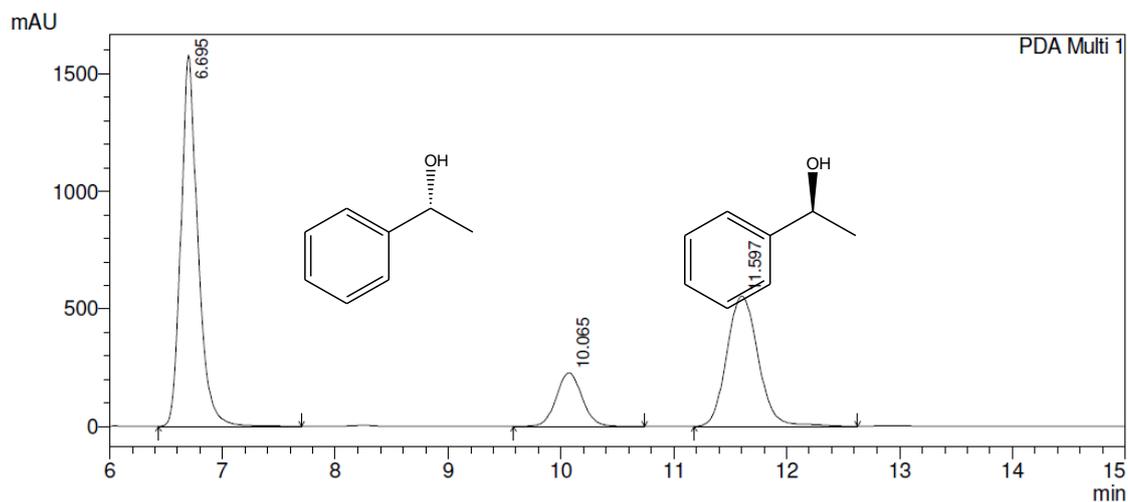
Gráfico 3 - Perfil de conversão da biorredução da acetofenona e do excesso enantiomérico em 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h, 96 h e 120 h utilizando sementes *Sinapis alba* L como biocatalisador.



Fonte: Próprio autor

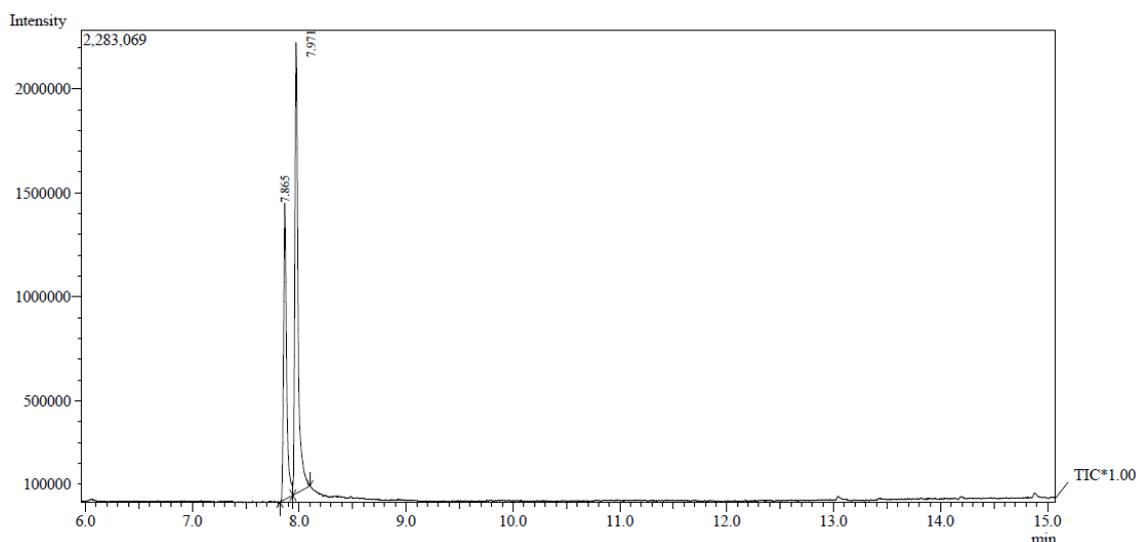
Os cromatogramas obtidos para cada análise, indicativos da conversão e do excesso enantiomérico são apresentados nas Figura 12 e Figura 13, respectivamente.

Figura 12 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução da acetofenona em 96 horas de reação



Fonte: Próprio autor

Figura 13 - Cromatograma (CG-EM) do produto da biorredução da acetofenona em 96 horas de reação



Fonte: Próprio autor

4.4.3 Velocidade de agitação

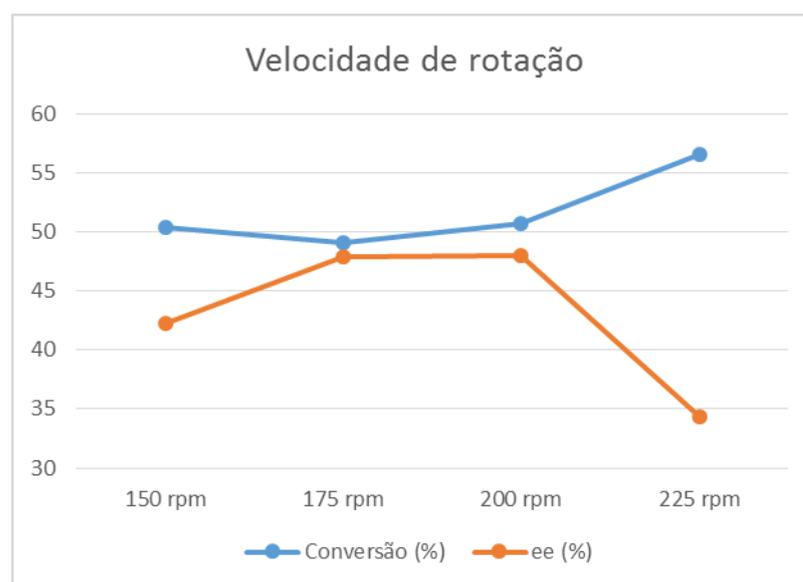
A velocidade de agitação do sistema que variou de 150 a 225 r.p.m., com acréscimos de 25 r.p.m., teve pouca influencia na conversão da acetofenona, mostrando melhor rendimento (56,5 %) a 225 r.p.m. Porém, com diminuição considerável do excesso enantiomérico (*ee* 34,4 %). Os demais parâmetros foram: 0,05 g de acetofenona e 15,0 g de biocatalisador em 50,0 mL de água durante 72 horas. Considerando conversão (50,7 %) e enantioseletividade (48,0%), o melhor resultado geral ocorreu com agitação a 200 r.p.m., conforme valores tabelados (Tabela 6, página 40), e assim, tomado como parâmetro ideal de velocidade de agitação. O Gráfico 4 (página 40) evidencia os resultados de conversão e *ee*.

Tabela 6 - Resultados de biorredução da acetofenona em rotações de 150 rpm, 175 rpm, 200 rpm e 225 rpm utilizando sementes *Sinapis alba* L como biocatalisador.

Rotação	Conversão	ee (%)
150 rpm	50,43	42,22
175 rpm	49,03	47,84
200 rpm	50,75	48,04
225 rpm	56,54	34,38

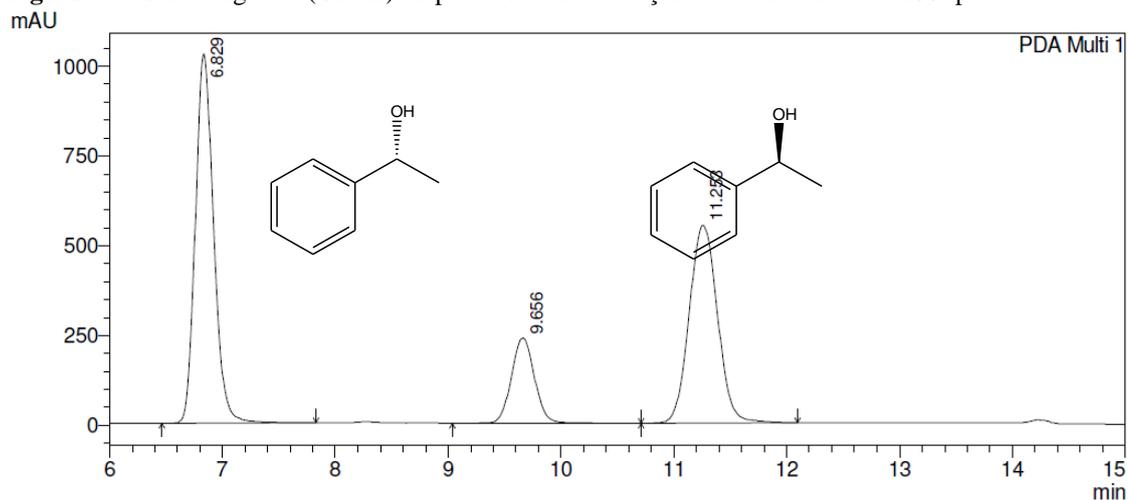
Fonte: Próprio autor.

Gráfico 4 - Perfil de conversão da biorredução da acetofenona e do excesso enantiomérico em rotações de 150 rpm, 175 rpm, 200 rpm e 225 rpm utilizando sementes *Sinapis alba* L como biocatalisador.

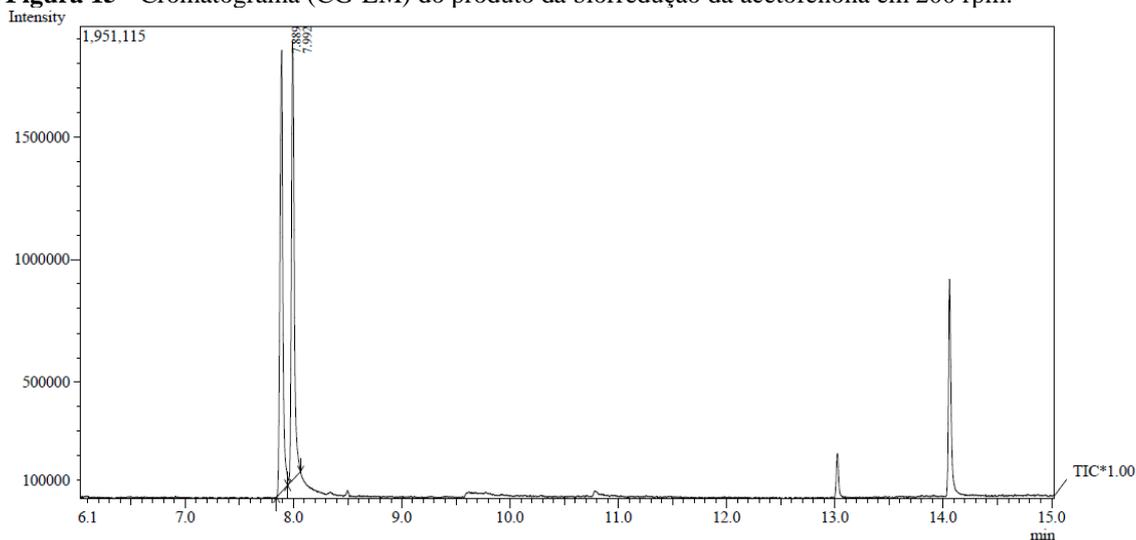


Fonte: Próprio autor

Os cromatogramas obtidos para cada análise, indicativos da conversão e do excesso enantiomérico são vistos nas Figura 14 e Figura 15, respectivamente.

Figura 14 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução da acetofenona em 200 rpm.

Fonte: Próprio autor.

Figura 15 - Cromatograma (CG-EM) do produto da biorredução da acetofenona em 200 rpm.

Fonte: Próprio autor.

4.4.4 Temperatura

Existem diversos trabalhos que demonstram a sensibilidade de enzimas sob ação de temperaturas elevadas, causando dentro de certos limites, a inativação irreversível em meio aquoso (LIMA; AGNES, 1999).

Objetivando otimizar o rendimento da reação de biorredução da acetofenona e avaliar a estabilidade térmica das enzimas presentes nas sementes de *Sinapis alba* L.,

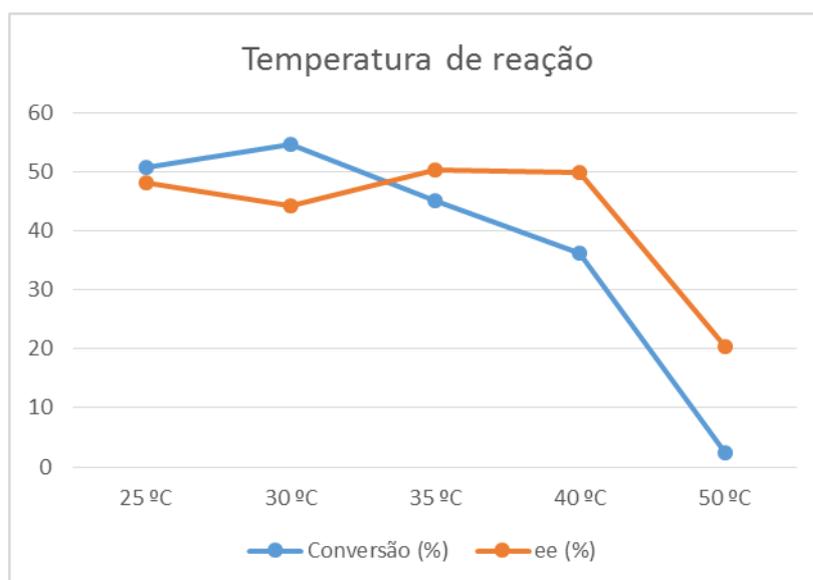
foram realizados experimentos em diferentes temperaturas (25, 30, 35, 40 e 50 °C) (Tabela 7, página 42), empregando 0,05 g de acetofenona e 15,0 g de biocatalisador em 50,0 mL de água e agitação a 200 r.p.m por 72 horas. Observou-se que acima de 30 °C houve diminuição de conversão da acetofenona no álcool, ao passo que, o *ee* manteve-se, praticamente, constante até 40 °C. Assim, considerando o rendimento e o excesso enantiomérico, as reações foram conduzidas a temperatura ambiente (25 °C) O Gráfico 5 mostra a influência da temperatura na reação de redução enzimática da acetofenona.

Tabela 7 - Resultados de biorredução da acetofenona em temperaturas de 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C e 50 °C utilizando sementes *Sinapis alba* L como biocatalisador.

Temperatura	Conversão	<i>ee</i> (%)
25 °C	50,75	48,04
30 °C	54,63	44,26
35 °C	45,17	50,35
40 °C	36,22	49,93
50 °C	2,39	20,47

Fonte: Próprio autor.

Gráfico 5 - Perfil de conversão da biorredução da acetofenona e do excesso enantiomérico em temperaturas de 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C e 50 °C utilizando sementes *Sinapis alba* L como biocatalisador.



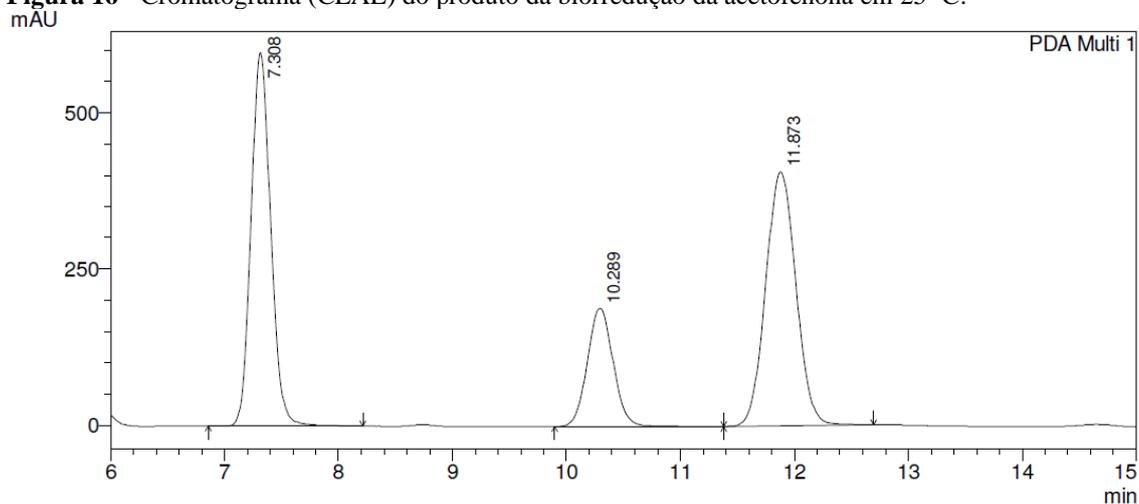
Fonte: Próprio autor

A diminuição de conversão da acetofenona no seu respectivo álcool pode ser explicado porque as enzimas quando submetidas a temperaturas elevadas por um longo período de tempo, sofrem um desenrolamento (desnaturação) e esse processo provoca modificações químicas irreversíveis, conduzindo a um estado de desordenamento molecular da enzima (LIMA; AGNES, 1999). Esse desenrolamento expõe os grupos reativos e as áreas hidrofóbicas mais internas, podendo ocorrer determinação dos resíduos de aspargina e glutamina, hidrólise de ligações peptídicas nos resíduos de ácido aspártico, permuta dissulfeto-tiol, destruição de ligações dissulfeto, oxidação de cisteína, isomerização de proteínas e outros processos, que acarretam à inativação da enzima (ASSUNÇÃO, 2008; VOLKIN; KLIBANOV, 1989).

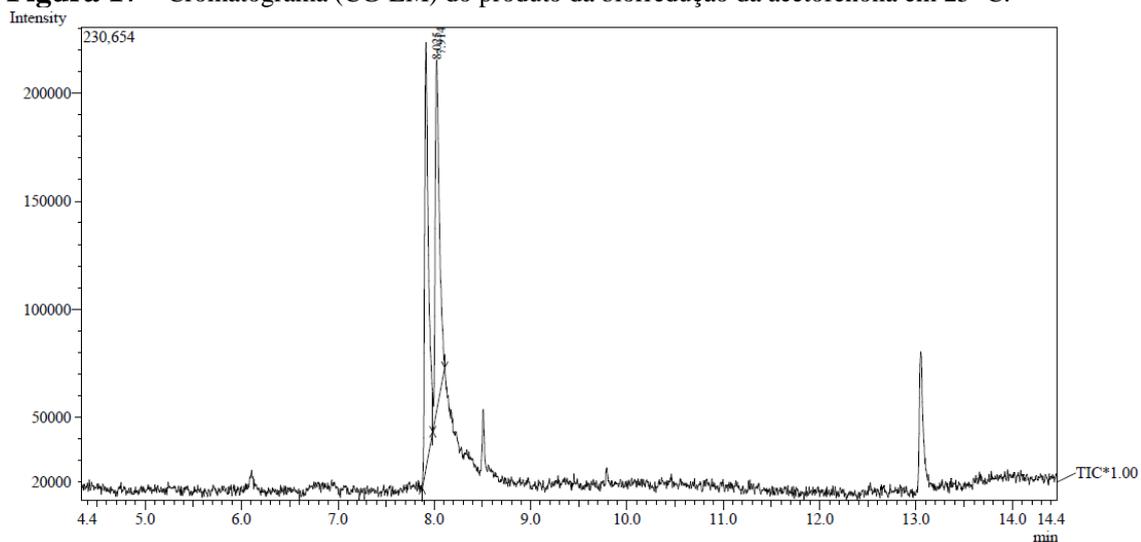
Segundo Assunção (2008) as moléculas de água que se encontram em torno da molécula enzimática, exercem um importante papel na estabilidade térmica da proteína. Entretanto, a água é a principal responsável pelas reações que provocam terminativação irreversível de enzimas.

Os cromatogramas obtidos para cada análise, indicativos da conversão e do excesso enantiomérico são vistos nas Figura 16 e Figura 17, respectivamente.

Figura 16 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução da acetofenona em 25 °C.



Fonte: Próprio autor.

Figura 17 - Cromatograma (CG-EM) do produto da biorredução da acetofenona em 25 °C.

Fonte: Próprio autor.

4.4.5 Meio tamponante

As reações utilizando as sementes de *Sinapis alba* L., também foram avaliadas em meios tamponantes para constatar a influência do pH na atuação enzimática, buscando melhores valores de conversão e excesso enantiomérico. Foram testadas soluções tampão fosfato com os respectivos valores de pH 5,0, 6,0, 7,0, e 8,0, empregando 0,05 g de acetofenona e 15,0 g de biocatalisador em 50,0 mL de água e agitação a 200 r.p.m por 72 horas. A Tabela 8 a seguir mostra os resultados obtidos nos ensaios.

Tabela 8 - Resultados de biorredução da acetofenona em solução tampão pH 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0 utilizando sementes *Sinapis alba* L como biocatalisador.

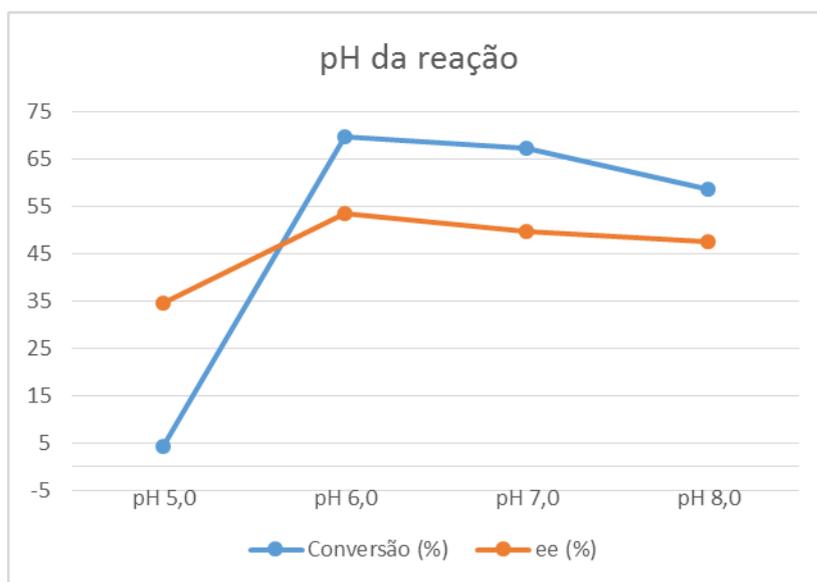
pH	Conversão	ee (%)
5,0	4,31	34,58
6,0	69,78	53,39
7,0	67,22	49,68
8,0	58,47	47,51

Fonte: Próprio autor

O pH do meio é um fator importante que influencia o mecanismo e a cinética do processo de biotransformação. Por este motivo soluções tampão são usadas com a finalidade de fornecer um ambiente mais favorável durante a biorredução. As soluções tampão constituem em soluções aquosas compostas por uma mistura de um ácido fraco e a sua base conjugada ou vice-versa. Elas são utilizadas com o objetivo de evitar alterações no pH de uma solução, quando uma pequena quantidade de ácido forte ou base é adicionada (KRUSZKOWSKA, 2016).

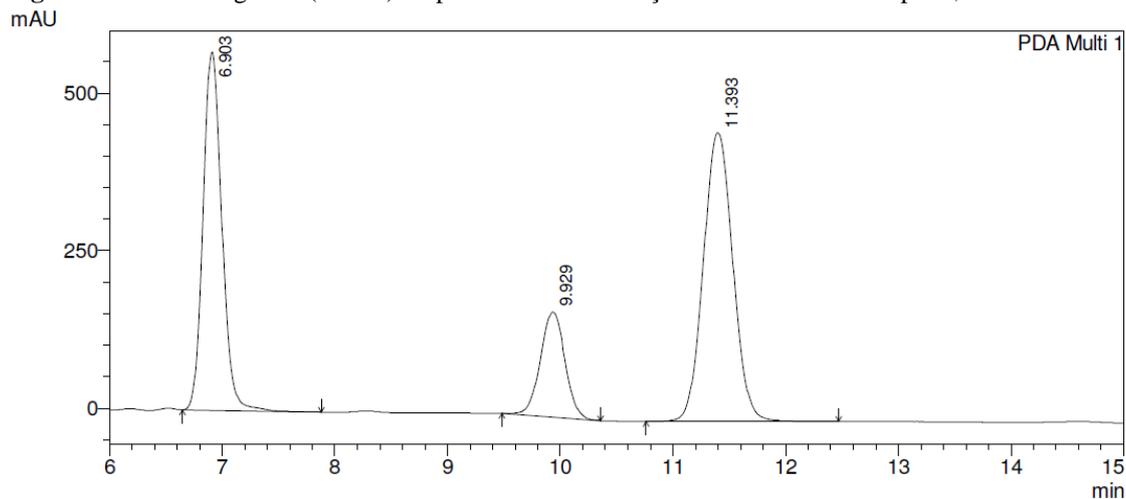
No presente caso, o aumento da conversão (69,78 %) e do excesso enantiomérico (53,39 %) do enantiômero *S* ocorreram em meio reacional com pH 6,0. Em todos os caso foram obtidos os isômeros de configuração *S*. O Gráfico 6 mostra o perfil de conversão e excesso enantiomérico conduzindo as reações em diferentes valores de pH.

Gráfico 6 - Perfil de conversão da biorredução da acetofenona e do excesso enantiomérico em solução tampão pH 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0 utilizando sementes *Sinapis alba* L como biocatalisador.

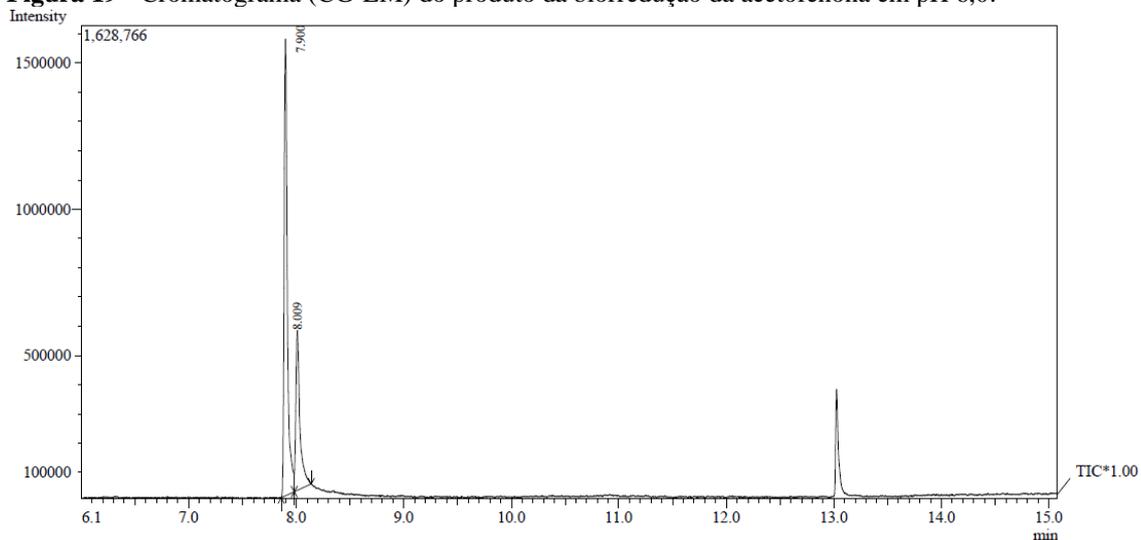


Fonte: Próprio autor.

Os cromatogramas obtidos para cada análise, indicativos da conversão e do excesso enantiomérico são vistos nas Figura 18 e Figura 19, respectivamente.

Figura 18 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução da acetofenona em pH 6,0.

Fonte: Próprio autor.

Figura 19 - Cromatograma (CG-EM) do produto da biorredução da acetofenona em pH 6,0.

Fonte: Próprio autor.

4.4.6 Uso de co-solvente

As reações de biorredução estudadas nesse trabalho são realizadas por uma classe de enzimas denominadas oxirredutases. Essas enzimas dependem de um cofator (NAD^+/NADH ou $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$) para que possam desenvolver seus processos adequadamente. Cofatores são pequenas substâncias que na sua ausência provocam a inativação da enzima (SOUZA, 2012). O co-solvente utilizado nesse trabalho foi o isopropanol.

O isopropanol atua no meio reacional reciclando o cofator e concomitantemente, aumentando a solubilidade do substrato da reação principal em água, facilitando a interação substrato/enzima (SOUZA, 2012; BON *et al.*, 2008). Nesse contexto foram testados meios reacionais com diferentes proporções de isopropanol 1%, 2%, 5%, 10% e 15% (v/v), para observação do comportamento da enzima visando obtenção de melhores resultados de conversão e excessos enantioméricos.

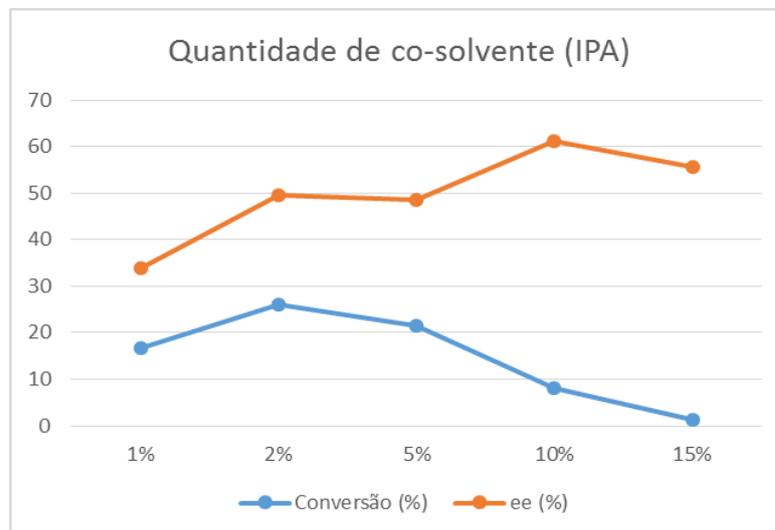
Os resultados encontram-se na Tabela 9, e estão conforme os resultados obtidos por Souza (2012), em que também ocorreu uma diminuição nos valores de conversão, mas divergem em relação aos valores de excesso enantiomérico. O Gráfico 7 (página 48) mostra o perfil de conversão e excesso enantiomérico conduzindo as reações em diferentes proporções (v/v) do co-solvente isopropanol.

Tabela 9 - Resultados de biorredução da acetofenona em presença de 1%, 2%, 5%, 10% e 15% de co-solvente isopropanol utilizando sementes *Sinapis alba* L como biocatalisador.

Quantidade de isopropanol (IPA)	Conversão	ee (%)
1%	16,72	33,85
2%	26,01	49,53
5%	21,59	48,49
10%	8,05	61,18
15%	1,37	55,55

Fonte: Próprio autor.

Gráfico 7 - Perfil de conversão da biorredução da acetofenona e do excesso enantiomérico em presença de 1%, 2%, 5%, 10% e 15% de co-solvente isopropanol utilizando sementes *Sinapis alba* L como biocatalisador.

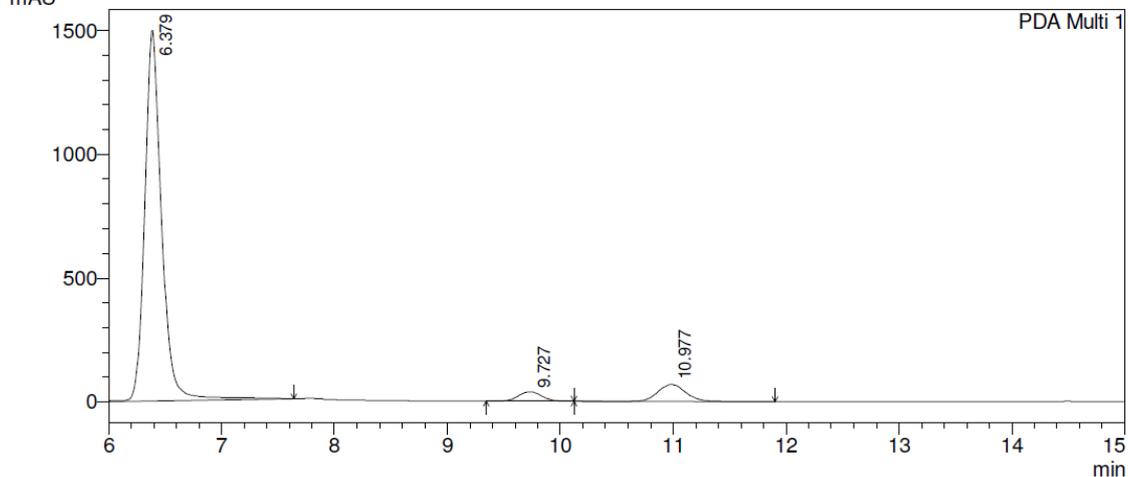


Fonte: Próprio autor.

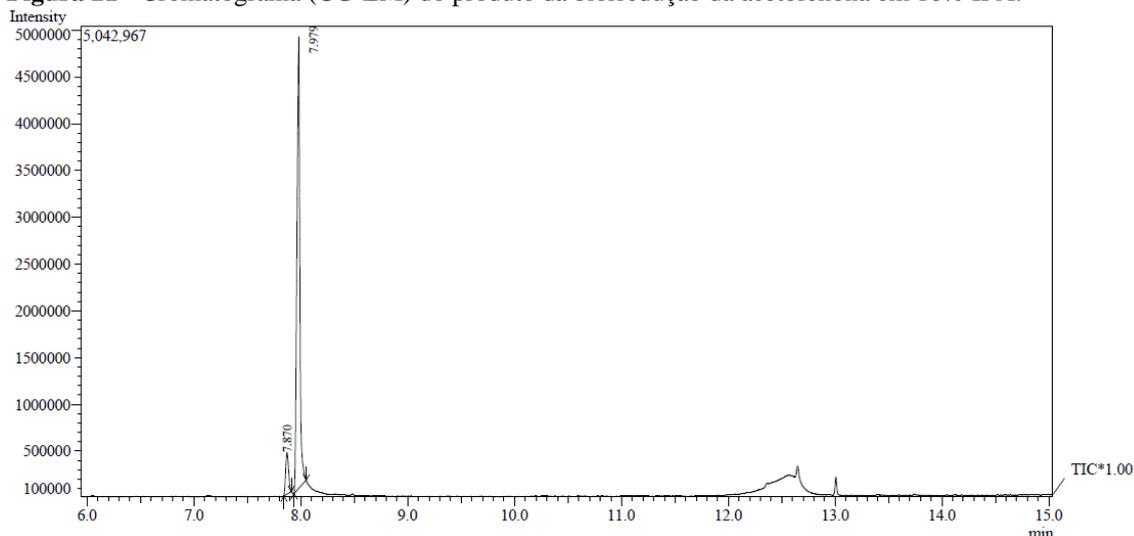
O uso do co-solvente, isopropanol, provocou uma diminuição considerável da conversão. Entretanto, os valores de excesso enantiomérico aumentaram à medida que aumentava a quantidade de isopropanol e atingiu um máximo de 61,18 % do enantiômero (*S*). Os melhores resultados para a otimização com este parâmetro foram obtidos quando utilizou-se uma proporção (v/v) de 10 % de isopropanol, com maior excesso enantiomérico, embora, com baixa conversão.

Os cromatogramas das análises realizadas para as biorreduções com o uso de co-solvente nas proporções estudadas são apresentados nas Figura 20 e Figura 21.

Figura 20 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução da acetofenona em 10% IPA.



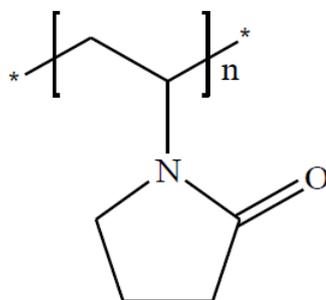
Fonte: Próprio autor.

Figura 21 - Cromatograma (CG-EM) do produto da biorredução da acetofenona em 10% IPA.

Fonte: Próprio autor.

4.4.7 Uso de Polivinilpirrolidona (PVP)

Segundo Zeraik *et al.* (2008), o papel do polímero polivinilpirrolidona (PVP) é agir como um protetor, removendo compostos fenólicos naturais dos extratos enzimáticos, evitando oxidações pelas enzimas peroxidases. O bom desempenho deste agente protetor é atribuído à sua baixa solubilidade em meio aquoso e à formação de ligação de hidrogênio entre os substratos naturais e o polímero PVP (Figura 22). Várias experiências mostraram que o PVP pode melhorar o rendimento de reação juntamente com o aumento do excesso enantiomérico.

Figura 22 - Estrutura monomérica do polímero PVP.

Fonte: Próprio autor.

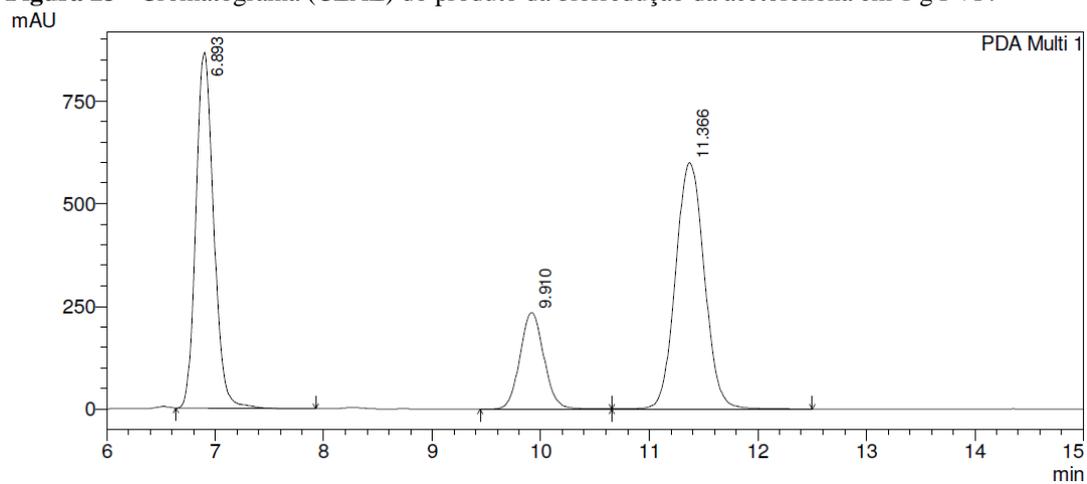
A metodologia foi a utilizada por Souza (2012) que consistiu em adicionar 1,0 g de polivinilpirrolidona (PVP), variando a quantidade de PVP para verificar a influência deste polímero no meio reacional. A quantidade de PVP foi variada em 1,0, 2,0, 5,0 e 10,0 g, empregando 0,05 g de acetofenona e 15,0 g de biocatalisador em 50,0 mL de água e agitação a 200 r.p.m por 72 horas. Para 1,0 g de PVP adicionado foi observado um valor apreciável de conversão (67,49%) acompanhado de um excesso enantiomérico (51,12%) moderado do isômero (*S*) (Tabela 10, página 51). Com aumentos para 2,0 5,0 e 10,0 g ocorreram decréscimos acentuados para os valores de conversão e decréscimos menos acentuados para os dos excessos enantioméricos. O Gráfico 8 (página 52) mostra o perfil de conversão e excesso enantiomérico conduzindo as reações em presença de massas variadas de PVP, onde o melhor resultado ocorreu na presença de 1,0 g do polímero. Foram obtidos os cromatogramas (

Figura 23 Figura 24) para a reação que resultou em melhores conversão e excesso enantiomérico,

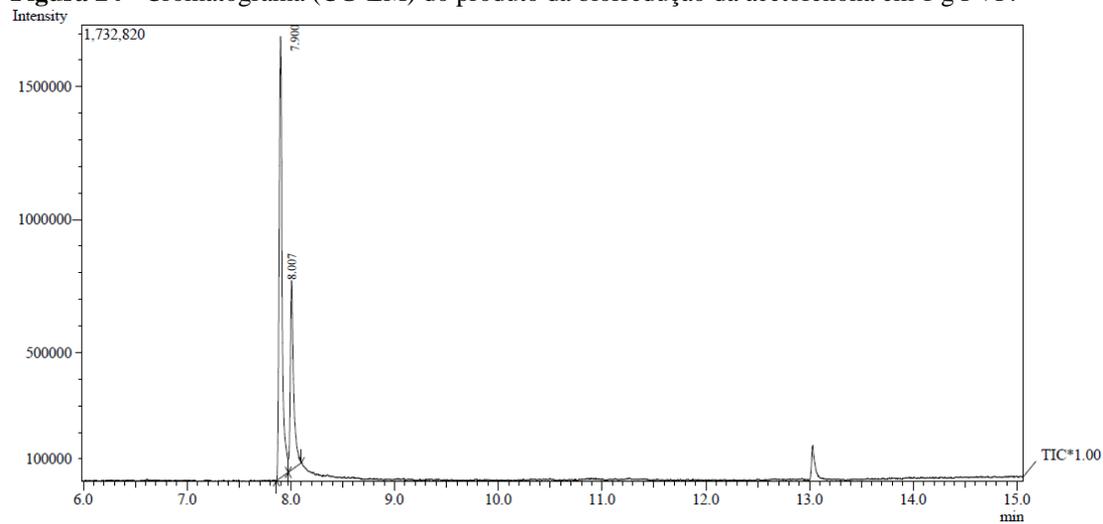
Tabela 10 - Resultados de biorredução da acetofenona em presença de 1g, 2g, 5g e 10g de polivinilpirrolidona (PVP) utilizando sementes *Sinapis alba* L como biocatalisador.

Quantidade de polivinilpirrolidona (PVP)	Conversão	ee (%)
1 g	67,49	53,12
2 g	24,35	33,83
5 g	23,91	39,28
10 g	17,24	41,88

Fonte: Próprio autor.

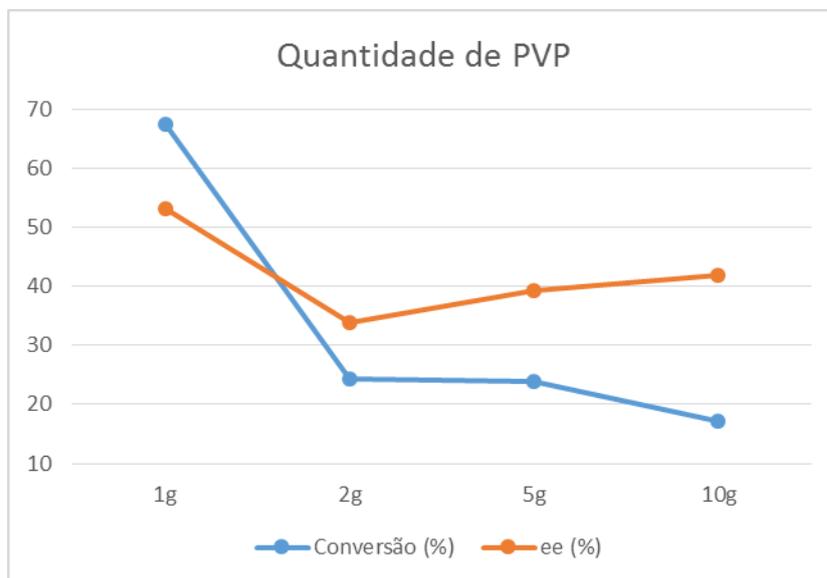
Figura 23 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução da acetofenona em 1 g PVP.

Fonte: Próprio autor.

Figura 24 - Cromatograma (CG-EM) do produto da biorredução da acetofenona em 1 g PVP.

Fonte: Próprio autor.

Gráfico 8 - Perfil de conversão da biorredução da acetofenona e do excesso enantiomérico em presença de 1g, 2g, 5g e 10g de polivinilpirrolidona (PVP) utilizando sementes *Sinapis alba* L como biocatalisador.

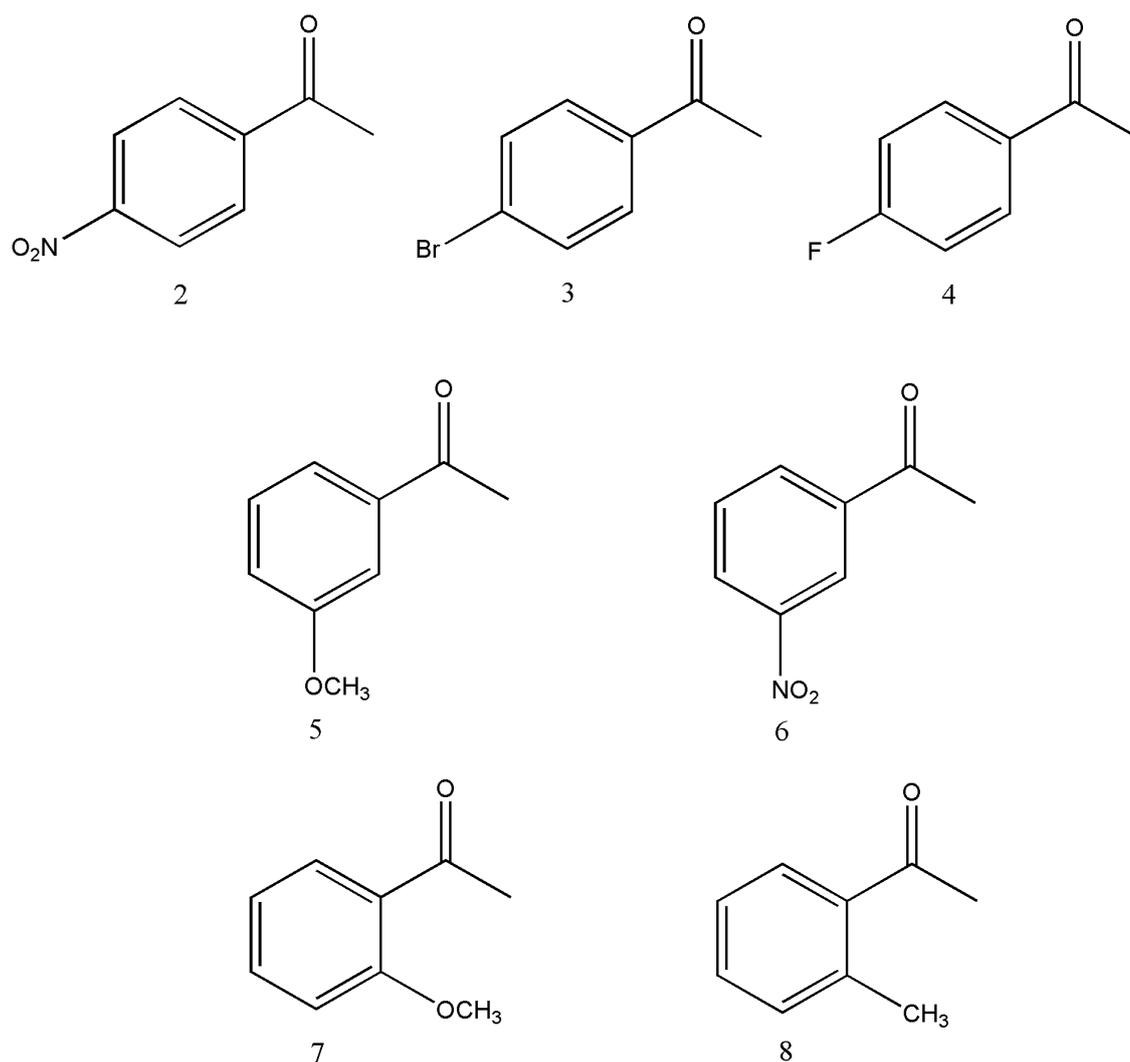


Fonte: Próprio autor.

4.4.8 Reações de biorredução utilizando derivados da acetofenona

Em síntese, diante dos resultados obtidos na redução da acetofenona, a reação de redução via biocatálise, com as sementes de *Sinapis alba*, foi estendida a outros substratos correlacionados à acetofenona (derivados), empregando os parâmetros determinados na otimização da reação de redução do substrato padrão: 0,05 g de substrato, 15,0 g de biocatalisador, meio reacional com pH 6,0/PVP, velocidade de agitação de 200 rpm a temperatura ambiente (25 °C) por 72 horas. Nas reações em presença de PVP, 1,0 g de massa foi adicionada. Os novos substratos foram: 4-nitro-acetofenona (**2**), 4-bromo-acetofenona (**3**), 4-fluor-acetofenona (**4**), 3-metóxi-acetofenona (**5**), 3-nitro-acetofenona (**6**), 2-metóxi-acetofenona (**7**), 2-metil-acetofenona (**8**). As estruturas químicas dos substratos encontram-se apresentadas na Figura 25.

Figura 25 - Derivados da acetofenona selecionados para a reação com as sementes de *Sinapis alba* L.



Fonte: Próprio autor.

Os resultados obtidos (Tabela 11, página 55) a partir dos derivados foram apresentados em função dos grupos substituintes, considerando suas diferentes posições (-*para*, -*meta* e -*orto*) e suas influências eletrônicas no anel aromático.

Tabela 11 - Resultados de biorredução dos derivados da acetofenona utilizando sementes *Sinapis alba* L como biocatalisador.

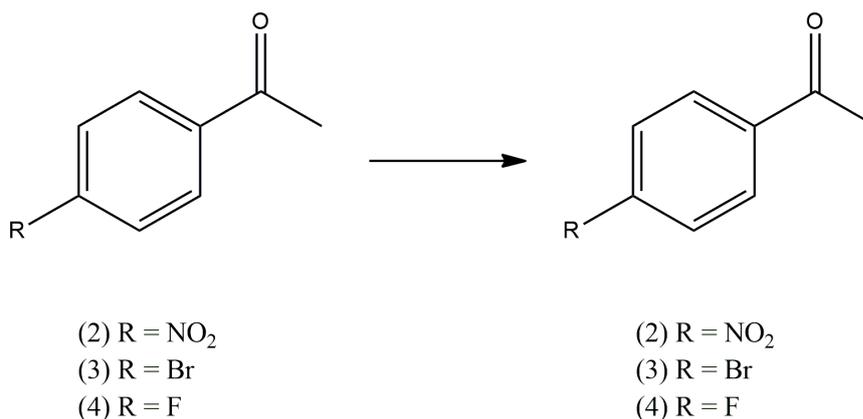
Derivados da acetofenona	PVP		pH 6,0	
	Conversão (%)	ee (%)	Conversão (%)	ee (%)
Acetofenona (1)	67,49	53,12 (S)	69,78	53,39 (S)
4-nitro-acetofenona (2)	81,10	72,38 (S)	78,86	56,60 (S)
4-bromo-acetofenona (3)	41,57	93,68 (S)	18,44	62,10 (S)
4-fluor-acetofenona (4)	15,40	98,26 (S)	15,09	96,49 (S)
3-metóxi-acetofenona (5)	3,18	76,06 (R)	5,03	>99 (S)
3-nitro-acetofenona(6)	39,00	10,26 (R)	42,27	0,63 (S)
2-metóxi-acetofenona (7)	29,87	93,20 (S)	6,95	96,26 (S)
2-metil-acetofenona (8)	5,27	91,99 (S)	25,99	>99 (S)

Fonte: Próprio autor.

4.4.8.1 Derivados para-substituídos

Foram estudados, inicialmente, os derivados com substituintes na posição *para*, 4-nitro-acetofenona (2), 4-bromo-acetofenona (3), 4-fluoro-acetofenona (4), considerando, sempre, os fatores conversão e excesso enantiomérico. A Figura 26 apresenta os produtos de redução (2a, 3a e 4a) esperados dos derivados em questão (2, 3 e 4), utilizando as duas metodologias (pH 6,0 e PVP).

Figura 26 - Produtos esperados da reação das cetonas -para substituídas utilizando as condições da reação otimizada.



Fonte: Próprio autor.

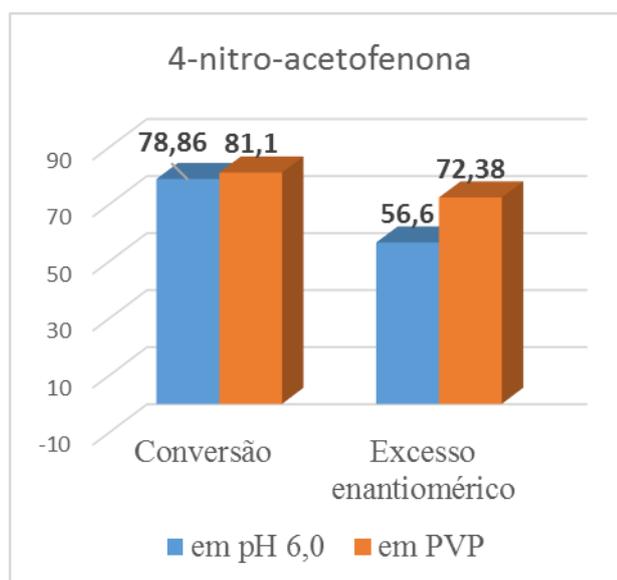
A reação em pH 6,0 para o 4-nitro-acetofenona (**2**) apresentou resultado de excesso enantiomérico (56,60%) ligeiramente melhor ao obtido com a acetofenona (**1**), mas com valor de conversão (78,86%) um pouco menor. Com a adição de PVP, foram observados ótimos valores de conversão (81,10%) e excesso enantiomérico (72,38%), ambos os casos com produção do isômero de configuração *S* (seletividade conforme Prelog), (tabela 12). Vale ressaltar que, na metodologia em presença de PVP, foi observado a redução do grupo nitro em amina (rendimento de 4,04%). O Gráfico 9 apresenta o perfil de redução biocatalítica de o 4-nitro-acetofenona (**2**), utilizando as duas metodologias.

Tabela 12 - Resultados da biotransformação da 4-nitro-acetofenona com sementes de *Sinapis alba* L.

<i>Sinapis alba</i> L. 4-nitro- acetofenona	Conversão (%)	<i>ee</i> (%)
em pH 6,0	78,86	56,60 (<i>S</i>)
em PVP	81,10	72,38 (<i>S</i>)

Fonte: Próprio autor.

Gráfico 9: Perfil de biotransformação do 4-nitro-acetofenona utilizando *Sinapis alba* como biocatalisador.



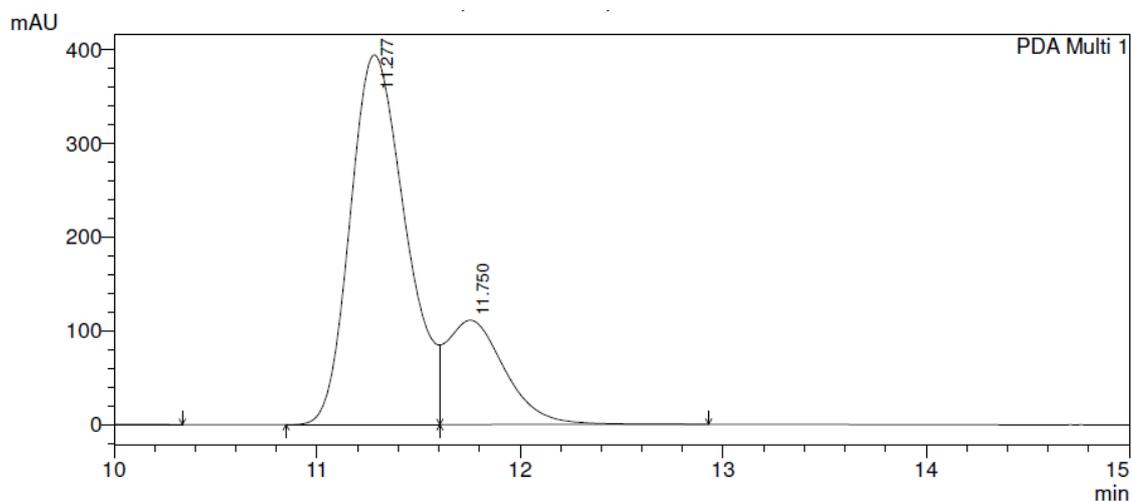
Fonte: Próprio autor.

Foi realizada a análise em Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massa (CG/EM) para confirmação da estrutura do produto formado, 1-(4'-nitro)-feniletanol. Os cromatogramas para determinação do excesso enantiomérico se encontram nas Figura 27 (em pH 6,0) e Figura 28 (em PVP).

O espectro de massas (

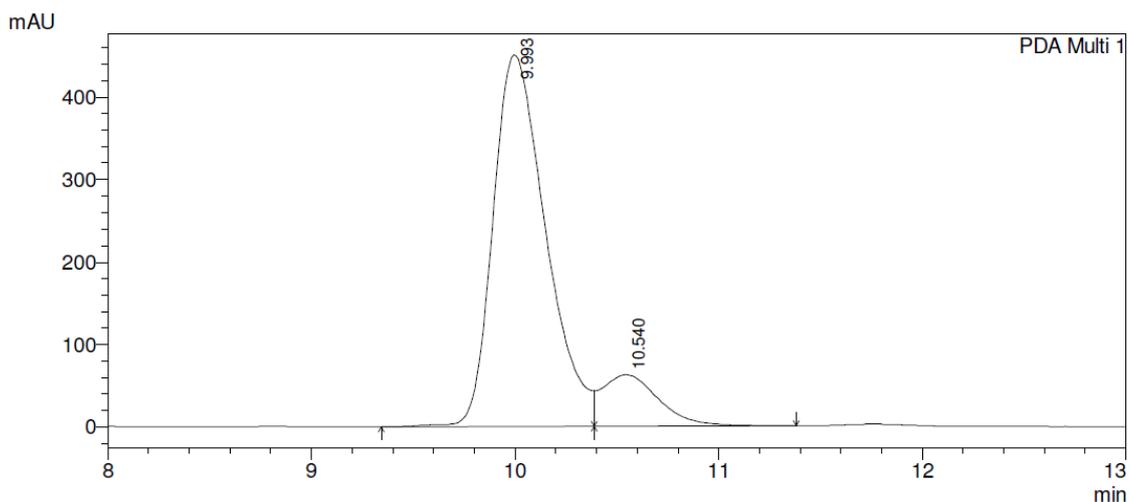
Figura 29) exibe pico base em m/z 152 ($M - 15$), e m/z 122 ($M - 45$), compatíveis com uma fragmentação esperada para o 1-(4'-nitro)-feniletanol.

Figura 27 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(4'-nitro)-feniletanol em pH 6,0.



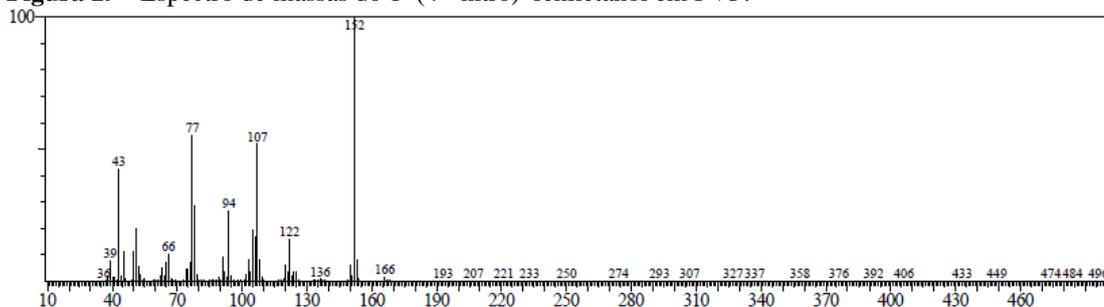
Fonte: Próprio autor.

Figura 28 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(4'-nitro)-feniletanol em PVP.



Fonte: Próprio autor.

Figura 29 - Espectro de massas do 1-(4'-nitro)-feniletanol em PVP.



Fonte: Próprio autor.

A reação com o derivado 4-bromo-acetofenona (**3**) mostrou melhores valores de conversão e de excesso enantiomérico com a adição de PVP (Tabela 13). Em comparação ao substrato padrão (**1**), houve uma acentuada menor conversão (41,57 %), porém, um considerável aumento de enantioseletividade com obtenção do isômero *S* com *e.e.* de 93,68 %.

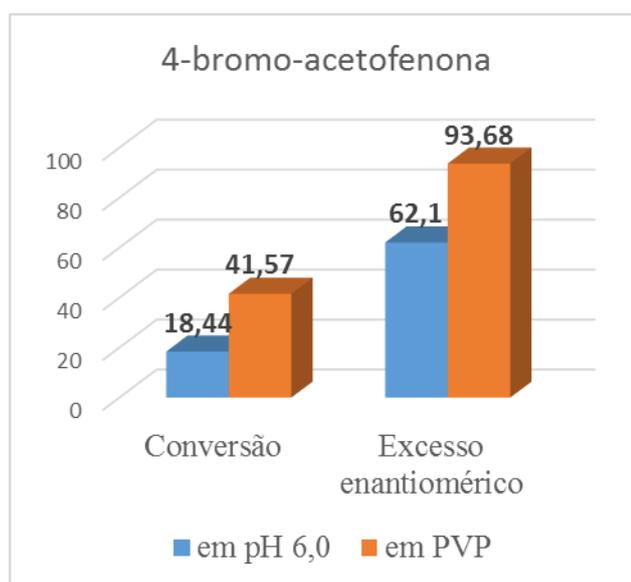
O Gráfico 10 (página 59) apresenta o perfil do ensaio biocatalítico utilizando as duas metodologias para o 4-bromo-acetofenona.

Tabela 13 - Resultados da biotransformação da 4-bromo-acetofenona com sementes de *Sinapis alba* L.

<i>Sinapis alba</i> L. 4-bromo- acetofenona	Conversão (%)	ee (%)
em pH 6,0	18,44	62,10 (S)
em PVP	41,57	93,68 (S)

Fonte: Próprio autor.

Gráfico 10 - Perfil de biotransformação do 4-bromo-acetofenona utilizando *Sinapis alba* como biocatalisador.

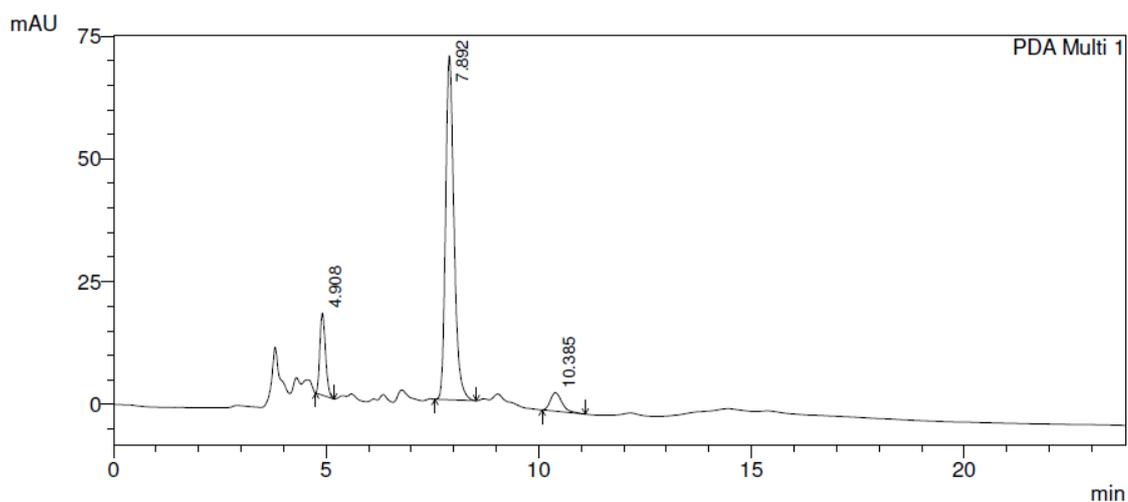


Fonte: Próprio autor.

Os respectivos cromatogramas para obtenção do excesso enantiomérico da reação de mostarda amarela com 4-bromo-acetofenona nas duas metodologias utilizadas encontram-se dispostos nas Figura 30 (em pH 6,0) e Figura 31 (em PVP).

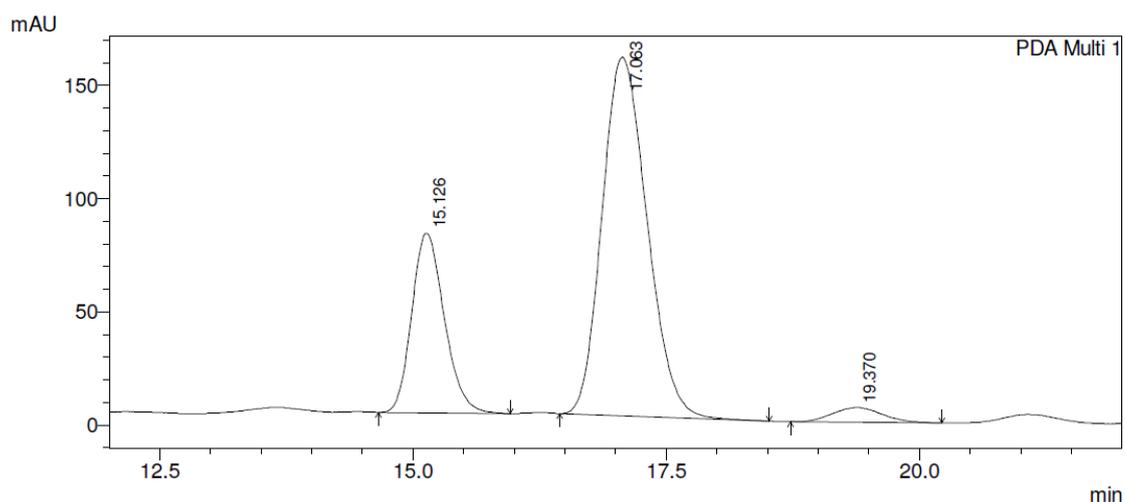
O espectro de massas do 1-(4'-bromo)-feniletanol (Figura 32) exibiu picos relativos aos íons moleculares em m/z 198 (M) e 200 (M + 2) devidos aos pesos moleculares dos compostos contendo os isótopos de ^{79}Br e ^{81}Br .

Figura 30 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(4'-bromo)-feniletanol em pH 6,0.



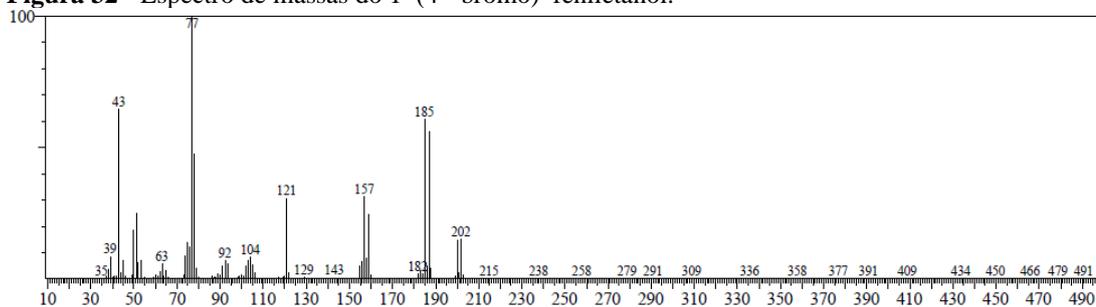
Fonte: Próprio autor.

Figura 31 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(4'-bromo)-feniletanol PVP.



Fonte: Próprio autor.

Figura 32 - Espectro de massas do 1-(4'-bromo)-feniletanol.



Fonte: Próprio autor.

Na reação com o derivado 4-fluoro-acetofenona (**4**) foram obtidos baixos valores de conversão, tanto em pH 6,0 (15,09%) quanto em presença de PVP (15,40%),

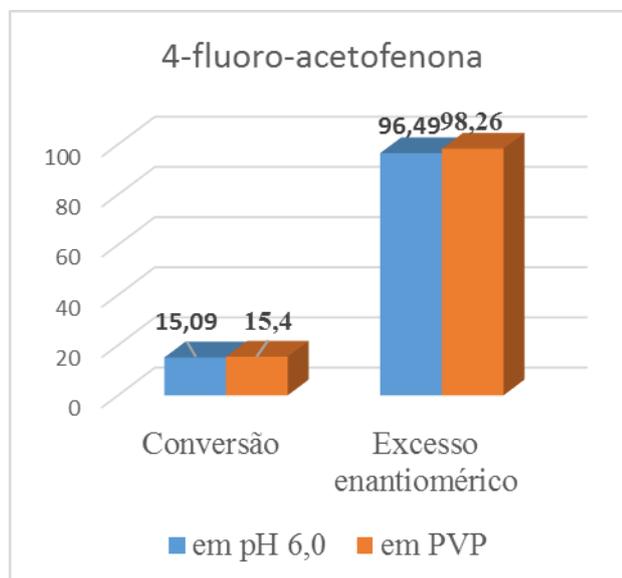
relativamente a **1**. Entretanto, excelentes valores de *ee*, foram obtidos em ambos os experimentos (96,5 % e 98,3 %, respectivamente) (Tabela 14, página 61). Vale observar que, em reações de bio-redução a partir de 4-fluoro-acetofenona em trabalhos anteriores, resultados discrepantes foram obtidos com baixo (da Silva, 2016) e excelente (Yadav, 2002) valores de conversão. O Gráfico 11 apresenta o perfil do ensaio biocatalítico utilizando as duas metodologias de redução do 4-fluoro-acetofenona.

Tabela 14 - Resultados da biotransformação da 4-fluoro-acetofenona com sementes de *Sinapis alba* L.

<i>Sinapis alba</i> L. 4-fluoro- acetofenona	Conversão (%)	<i>ee</i> (%)
em pH 6,0	15,09	96,49 (S)
em PVP	15,40	98,26 (S)

Fonte: Próprio autor.

Gráfico 11 - Perfil de biotransformação do 4-fluoro-acetofenona utilizando *Sinapis alba* como biocatalisador.



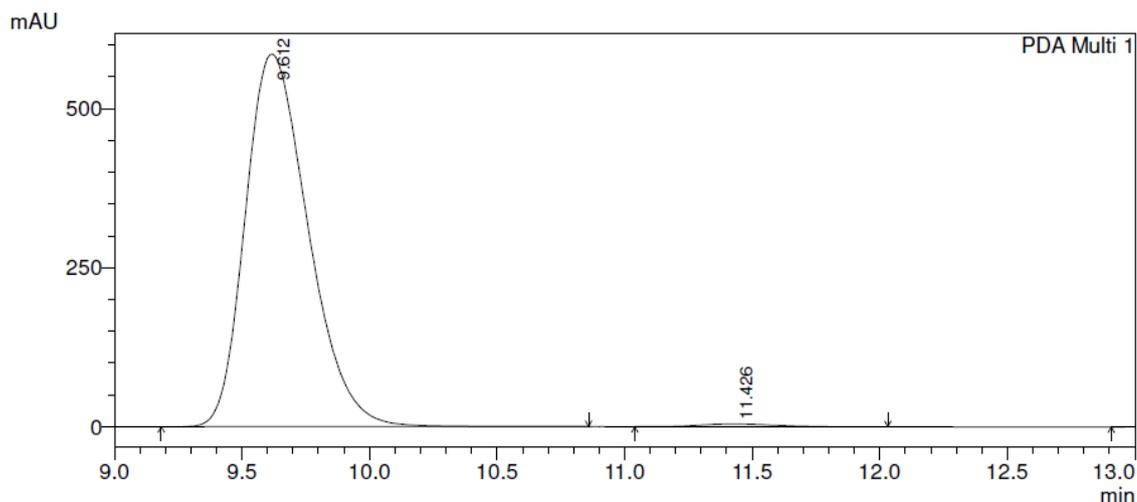
Fonte: Próprio autor.

Os respectivos cromatogramas da reação de mostarda amarela com 4-fluoro-acetofenona nas duas metodologias utilizadas encontram-se dispostos nas Figura 33 (em

pH 6,0) e Figura 34 (em PVP). E o espectro de massas para o produto formado, 1-(4'-fluoro)-feniletanol na Figura 37 (página 62).

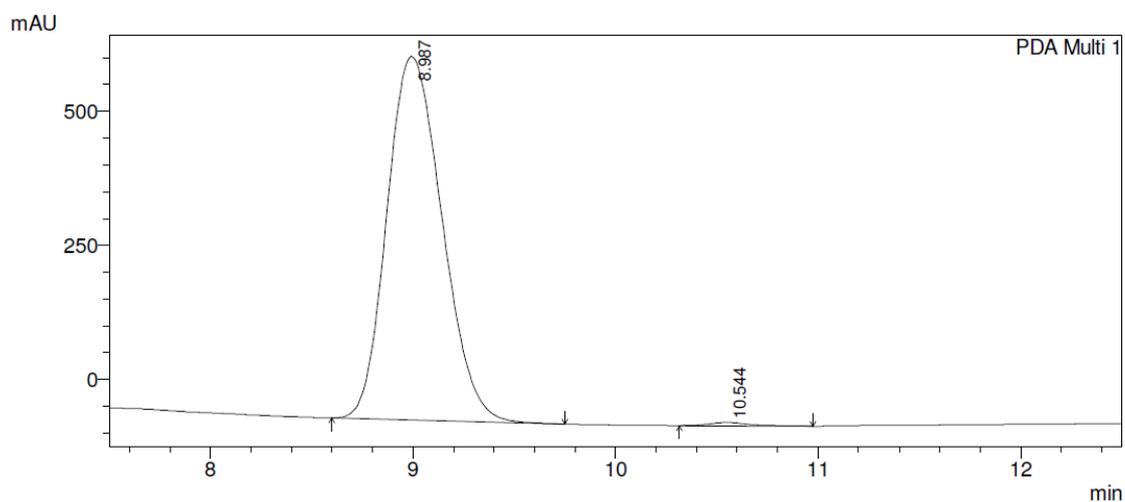
O espectro de massa (Figura 35) com íon molecular em M^+ 140 e fragmentos em m/z 125 ($M - 15$) e 97 ($M - 43$) estão em acordo a estrutura do produto 1-(4'-fluor)-feniletanol (**4a**).

Figura 33 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(4'-fluoro)-feniletanol em pH 6,0.

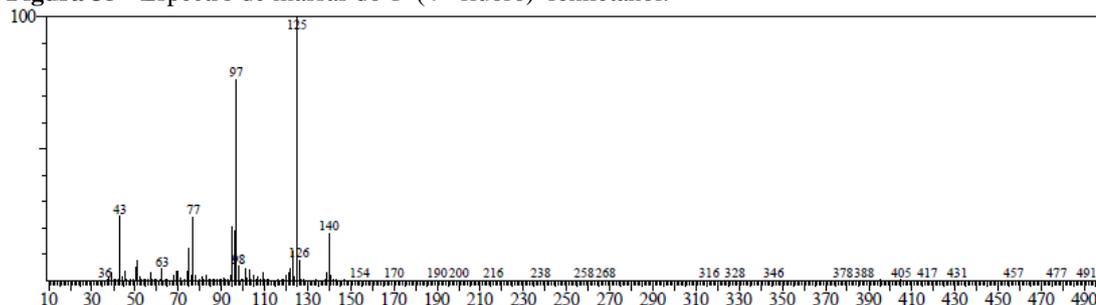


Fonte: Próprio autor.

Figura 34 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(4'-fluoro)-feniletanol em PVP.



Fonte: Próprio autor.

Figura 35 - Espectro de massas do 1-(4'-fluoro)-feniletanol.

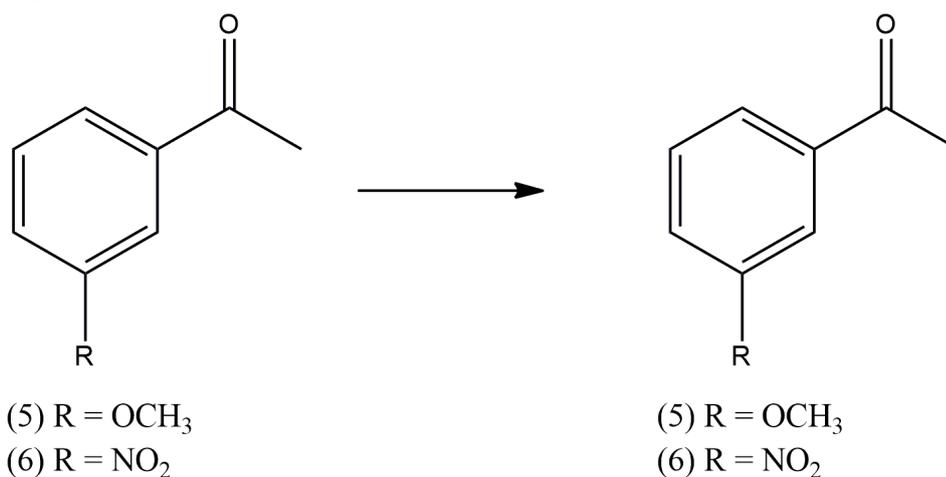
Fonte: Próprio autor.

Observa-se que o uso do PVP tende a tornar o meio reacional mais eficiente ao melhorar o excesso enantiomérico, relativamente à acetofenona. O enantiômero de configuração S, foi formado em todos os derivados *para*-substituídos. O maior valor de conversão obtido para a 4-nitro-acetofenona, relativo a acetofenona (na presença de PVP), sugere a influência de um grupo fortemente retirador de elétrons que aumenta a reatividade da molécula. No caso de 4-fluoro-acetofenona foram obtido baixos valores de conversão, porém, ótimos valores de excessos enantioméricos. Os resultados de excessos enantioméricos dos derivados estudados em reações com PVP, comparados com o valor obtido para a acetofenona, revelaram a influência positiva do uso do polímero no acoplamento enzima-substrato frente a derivados *para*-substituídos.

4.4.8.2 Derivados *-meta* substituídos

A redução de derivados da acetofenona *-meta* substituídos também foi avaliada, no caso, a 3-metóxi-acetofenona (**5**) e a 3-nitro-acetofenona (**6**). A Figura 36 apresenta os produtos esperados dos derivados em questão para as duas metodologias empregadas (em pH 6,0 e em PVP).

Figura 36 - Produtos esperados da reação das cetonas -meta substituídas utilizando as condições da reação otimizada.



Fonte: Próprio autor.

A 3-metóxi-acetofenona (**5**) foi reduzida ao correspondente álcool na ausência de PVP com baixíssimo valor de conversão (5,03%), porém, com excelente excesso enantiomérico (>99 % do isômero *S*). A partir dos dados da tabela 15, observa-se que a adição de PVP promoveu reação com menor conversão (3,18%) e, com substancial menor e.e. (76,06%). Vale destacar a influência do PVP no curso estérico da reação ao ser obtido o isômero *R*. Este mesmo resultado foi registrado em trabalho semelhante anteriormente relatado na literatura (ALVES, 2013). Os cromatogramas das Figura 37 e

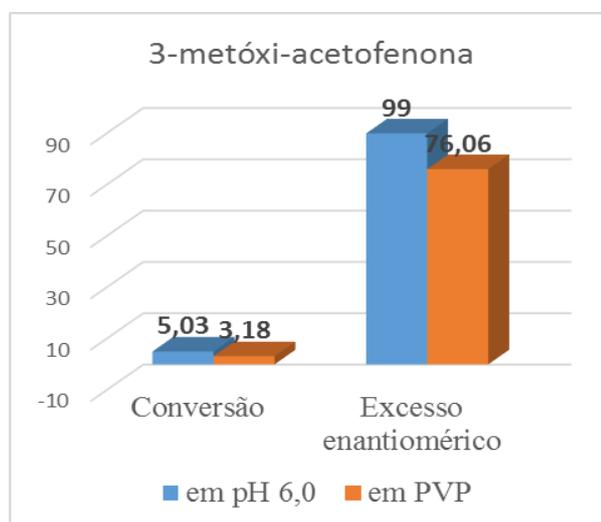
Figura 38 (pH 6,0 e PVP, respectivamente), apresentam o perfil das reações de biocatálise utilizando as sementes de mostarda amarela em ambas as metodologias. A Figura 39 mostra o espectro de massas do produto obtido para o 1-(3'-metoxi)-feniletanol. O Gráfico 12 apresenta o perfil do ensaio biocatalítico utilizando as duas metodologias para o 3-metóxi-acetofenona.

Tabela 15 - Resultados da biotransformação da 3-metóxi-acetofenona com sementes de *Sinapis alba* L.

<i>Sinapis alba</i> L. 3-metóxi- acetofenona	Conversão (%)	ee (%)
em pH 6,0	5,03	>99 (S)
em PVP	3,18	76,06 (R)

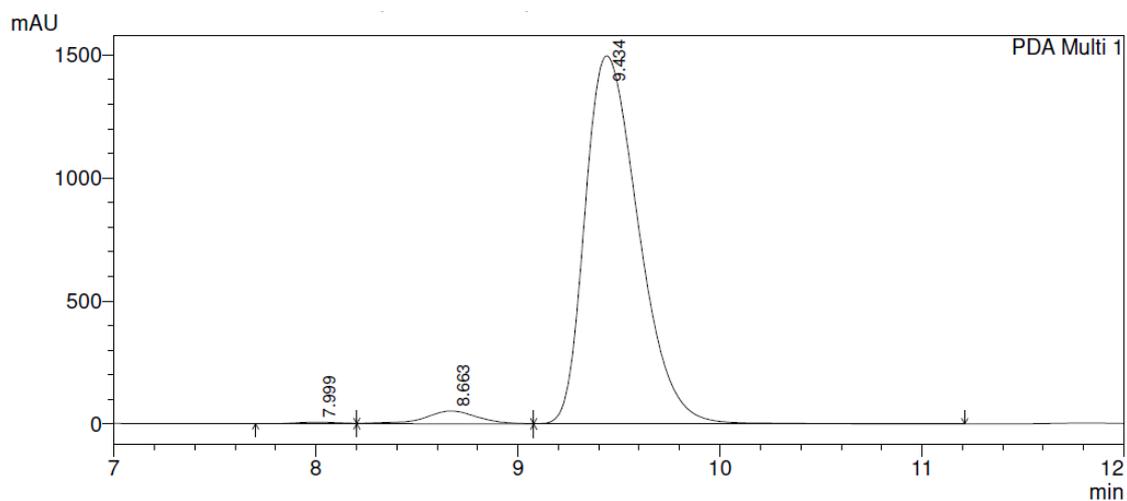
Fonte: Próprio autor.

Gráfico 12 - Perfil de biotransformação do 3-metóxi-acetofenona utilizando *Sinapis alba* como biocatalisador.



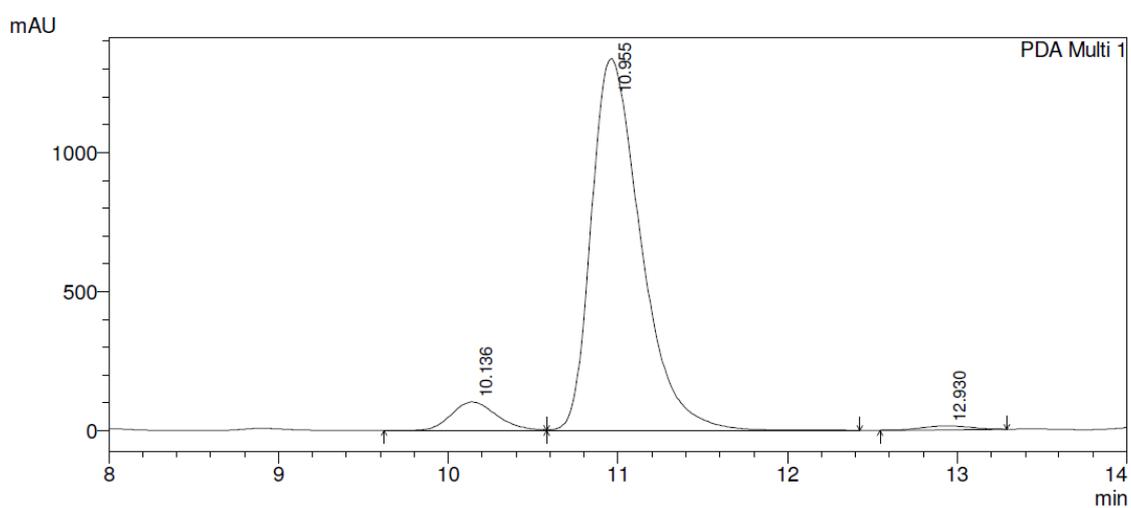
Fonte: Próprio autor.

Figura 37 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(3^o-metóxi)-feniletanol em pH 6,0.



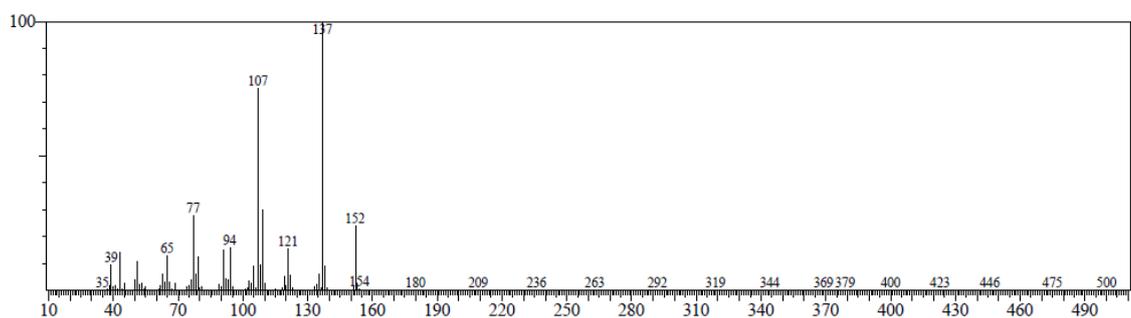
Fonte: Próprio autor.

Figura 38 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(3'-metóxi)-feniletanol em PVP.



Fonte: Próprio autor.

Figura 39 - Espectro de massas do 1-(3'-metóxi)-feniletanol.



Fonte: Próprio autor.

A reação de biorredução da 3-nitro-acetofenona (**6**) foi avaliada frente ao complexo enzimático de *Sinapis alba* L. em pH 6,0 e em PVP, com conversões moderadas em ambos os casos (42,27 e 39,0 %, respectivamente) e excessos

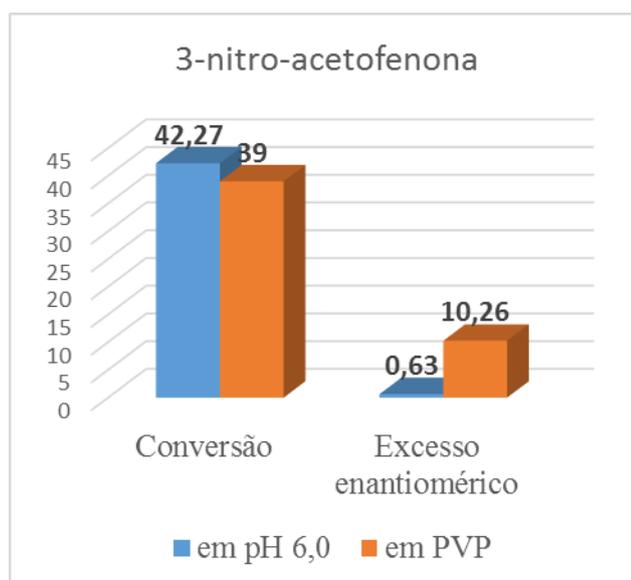
enantioméricos (0,6 e 10,3 %, respectivamente), considerados desprezíveis (Tabela 16). Vale salientar a obtenção do isômero *R*. O Gráfico 13 (página 67) apresenta o perfil do ensaio biocatalítico utilizando as duas metodologias para o derivado **6a**.

Tabela 16 - Resultados da biotransformação da 3-nitro-acetofenona com sementes de *Sinapis alba* L.

<i>Sinapis alba</i> L. 3-nitro- acetofenona	Conversão (%)	<i>ee</i> (%)
em pH 6,0	42,27	0,63 (S)
em PVP	39,00	10,26 (<i>R</i>)

Fonte: Próprio autor.

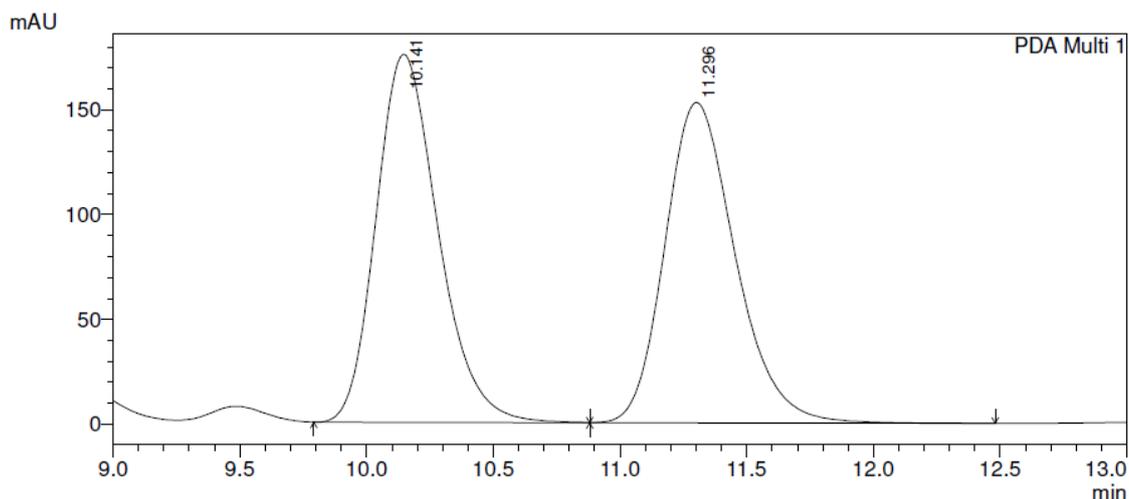
Gráfico 13 - Perfil de biotransformação do 3-nitro-acetofenona utilizando *Sinapis alba* como biocatalisador.



Fonte: Próprio autor.

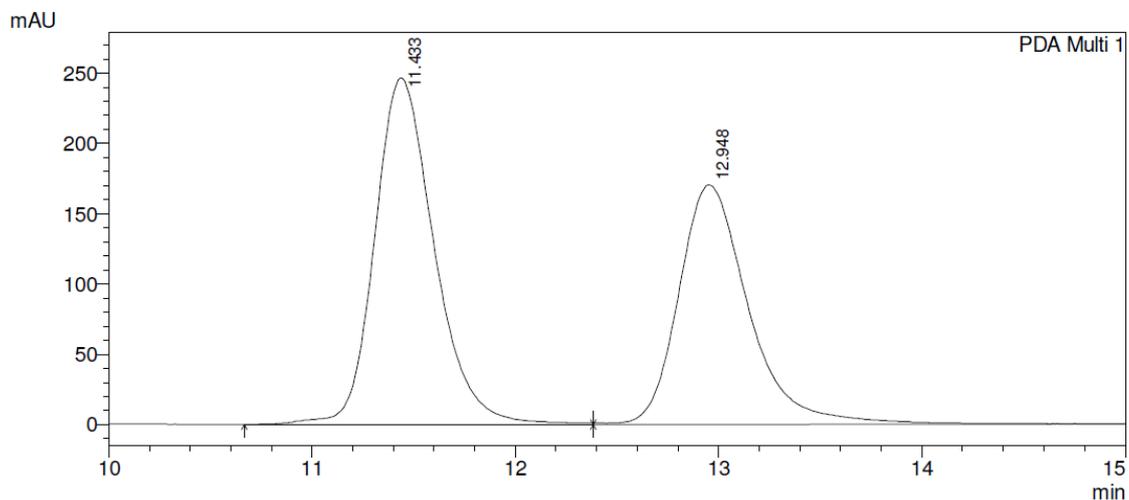
Os cromatogramas das Figura 40 e Figura 41 (em pH6,0 e em PVP), página 67, apresentam o perfil das reações de biocatálise utilizando as sementes de mostarda amarela. A Figura 42 mostra o espectro de massas do produto obtido para o 1-(3'-nitro)-feniletanol, com o pico base em m/z 150 [M - 17 (HO[•])].

Figura 40 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(3'-nitro)-feniletanol em pH 6,0.

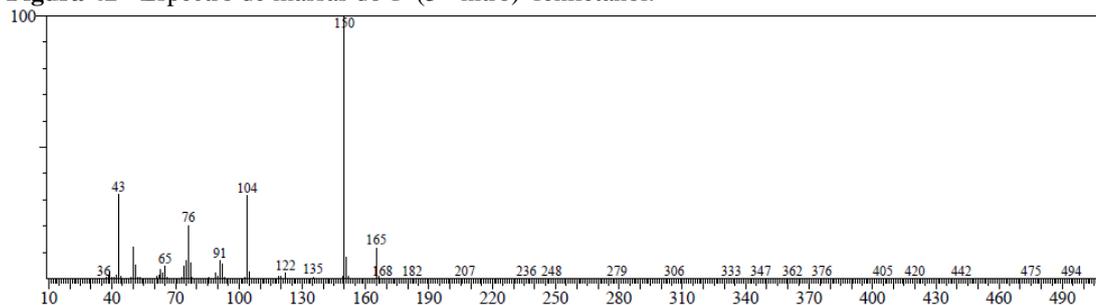


Fonte: Próprio autor.

Figura 41 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(3'-nitro)-feniletanol em PVP.



Fonte: Próprio autor.

Figura 42 - Espectro de massas do 1-(3'-nitro)-feniletanol.

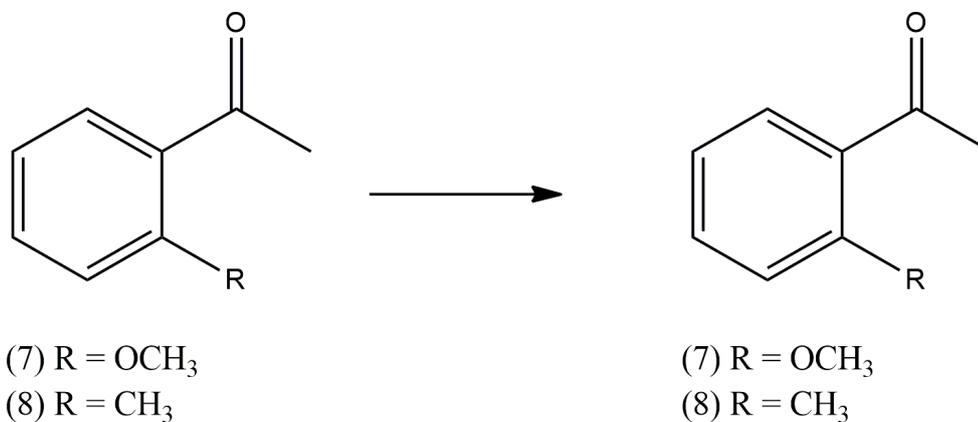
Fonte: Próprio autor.

A partir destes resultados conclui-se que os grupos metoxila e nitro, na posição *meta*, influenciam a estereosseletividade das oxirredutases presentes no complexo enzimático de *Sinapis alba* L., com inversão da configuração do álcool (enantiômero *R*), diferentemente de todos os outros casos em que foram obtidos o isômero *S*.

4.4.8.3 Derivados -orto substituídos

Foi investigada, também, o efeito de grupos substituintes na posição *orto*, tomando como substratos a 2-metóxi-acetofenona (**7**) e 2-metil-acetofenona (**8**), no processo de avaliação em biorredução. A Figura 43 apresenta os produtos esperados para as cetonas *orto* substituídas.

Figura 43 - Produtos esperados da reação das cetonas -orto substituídas utilizando as condições da reação otimizada.



Fonte: Próprio autor.

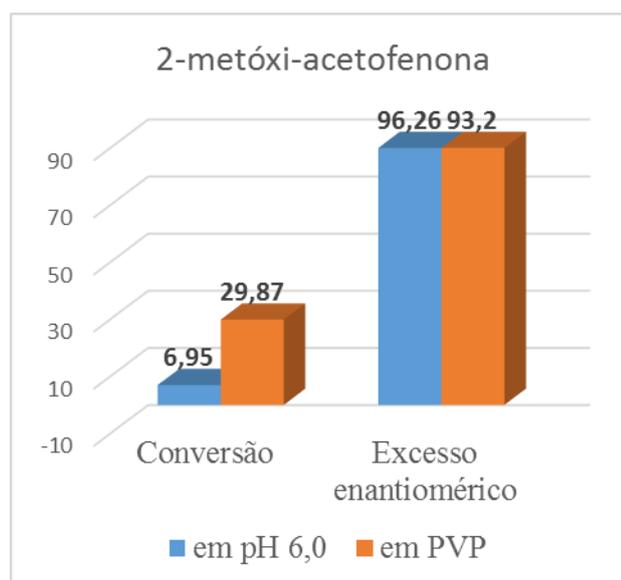
Para o 2-metóxi-acetofenona o valor de conversão foi baixo (6,9 %) na ausência de PVP e moderado (29,9 %) na presença, porém, com ótimos excessos do enantiômero *S* em ambos os meios (96,3 e 93,2 %, respectivamente). Os resultados encontram-se listados na Tabela 17 (página 70) e nas Figura 44 e Figura 45 representam o perfil de *ee* obtido para ambas as metodologias. A Figura 46 mostra o espectro de massas do produto obtido para o 1-(2'-metoxi)-feniletanol.

Tabela 17 - Resultados da biotransformação da 2-metóxi-acetofenona com sementes de *Sinapis alba* L.

<i>Sinapis alba</i> L. 2-metóxi- acetofenona	Conversão (%)	<i>ee</i> (%)
em pH 6,0	6,95	96,26 (S)
em PVP	29,87	93,20 (S)

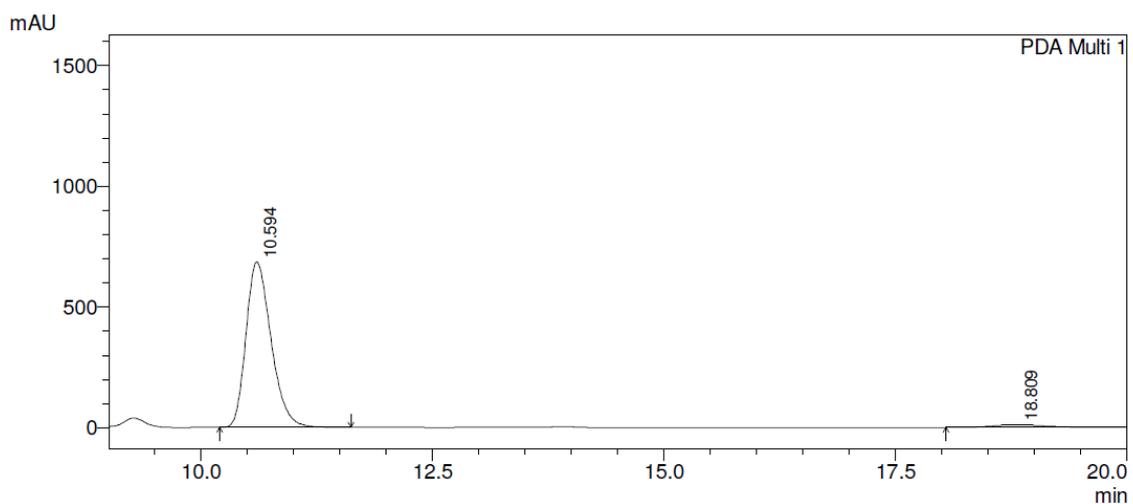
Fonte: Próprio autor.

Gráfico 14 - Perfil de biotransformação do 2-metóxi-acetofenona utilizando *Sinapis alba* como biocatalisador.



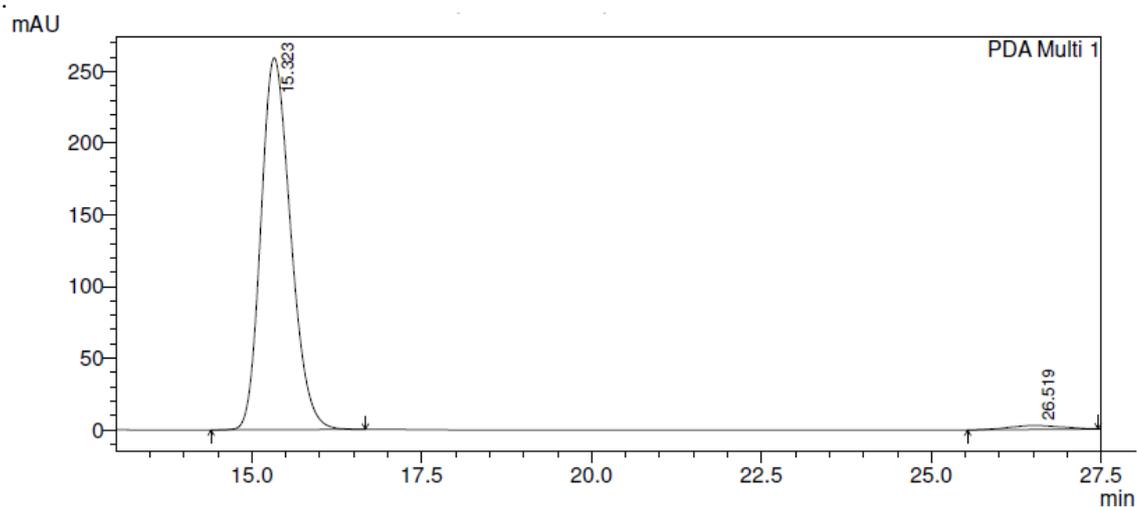
Fonte: Próprio autor.

Figura 44 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(2'-metóxi)-feniletanol em pH 6,0.



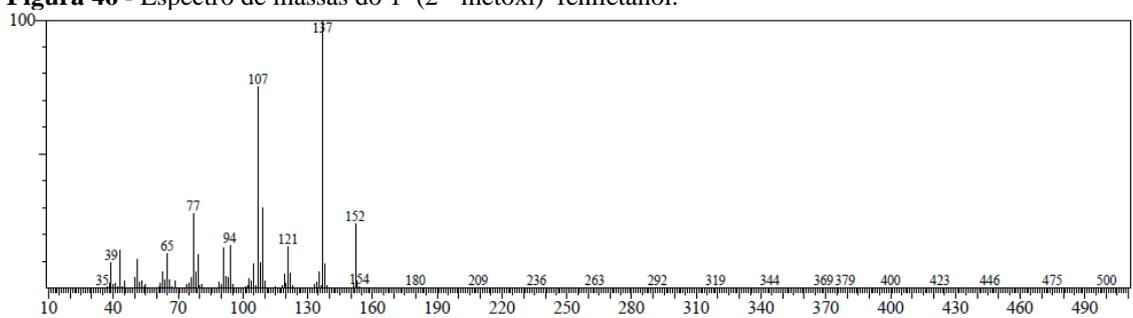
Fonte: Próprio autor.

Figura 45 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(2'-metóxi)-feniletanol em PVP.



Fonte: Próprio autor.

Figura 46 - Espectro de massas do 1-(2'-metóxi)-feniletanol.



Fonte: Próprio autor.

A série de reações para os derivados da acetofenona (**1**) foi finalizada com a reação de 2-metil-acetofenona. Os valores de *ee* são apresentados na Tabela 18 e nas Figura 47 (em pH 6,0) e Figura 48 (em PVP). O Gráfico 15 (página 72) apresenta o perfil do ensaio biocatalítico utilizando as duas metodologias para o derivado em questão.

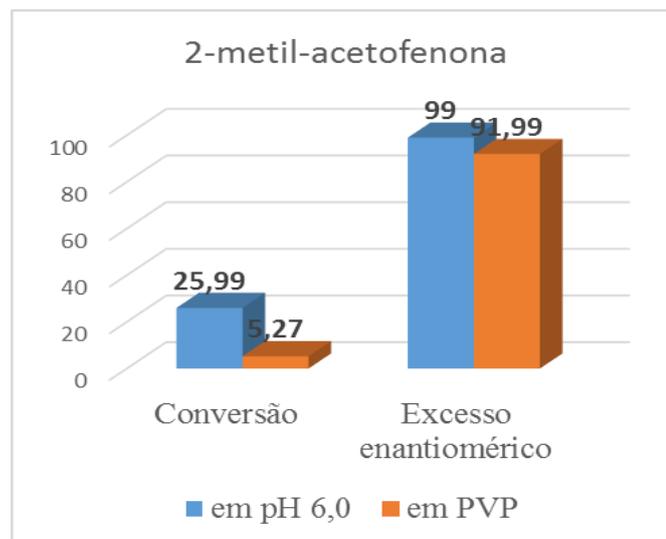
A reação de 2-metil-acetofenona (**8**) também foi investigada com ambas as metodologias adotadas. Em pH 6,0 ocorreu diminuição da conversão (25,99%), entretanto, com excelente valor de excesso enantiomérico (>99 %), em comparação a acetofenona. Na presença de PVP ocorreu drástica diminuição da conversão (5,27 %), mas ainda com ótima enantioseletividade (92,0 %), sempre, com formação do isômero *S*. A Figura 49 mostra o espectro de massas do produto obtido para o 1-(2'-metil)-feniletanol.

Tabela 18 - Resultados da biotransformação da 2-metil-acetofenona com sementes de *Sinapis alba* L.

<i>Sinapis alba</i> L. 2-metil- acetofenona	Conversão (%)	<i>ee</i> (%)
em pH 6,0	25,99	>99
em PVP	5,27	92,0 (<i>S</i>)

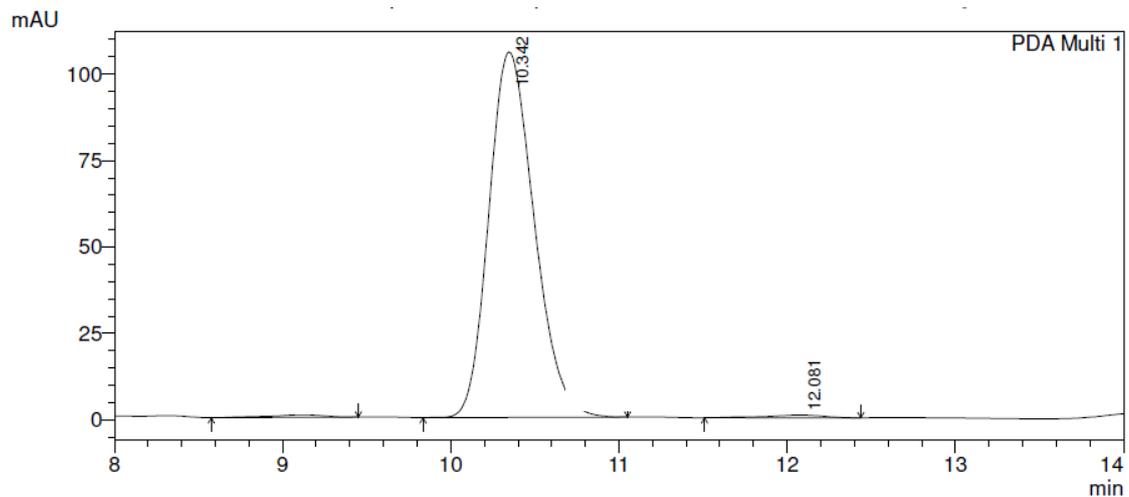
Fonte: Próprio autor.

Gráfico 15 - Perfil de biotransformação do 2-metil-acetofenona utilizando *Sinapis alba* como biocatalisador.



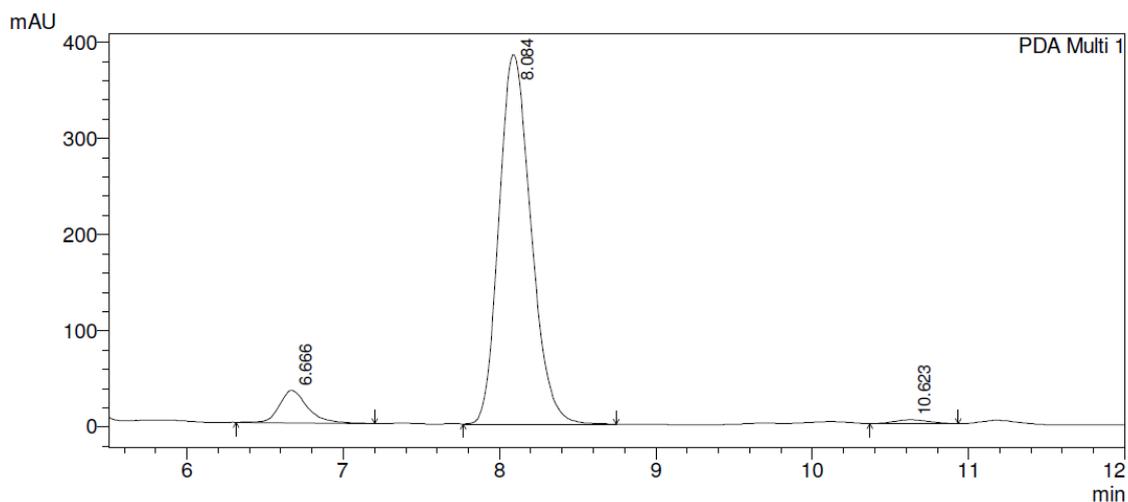
Fonte: Próprio autor.

Figura 47 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(2'-metil)-feniletanol em pH 6,0.



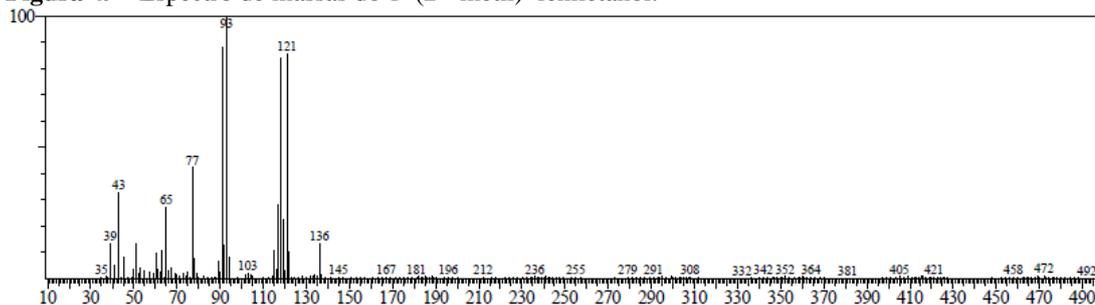
Fonte: Próprio autor.

Figura 48 - Cromatograma (CLAE) do produto da biorredução do 1-(2'-metil)-feniletanol em PVP.



Fonte: Próprio autor.

Figura 49 - Espectro de massas do 1-(2'-metil)-feniletanol.



Fonte: Próprio autor.

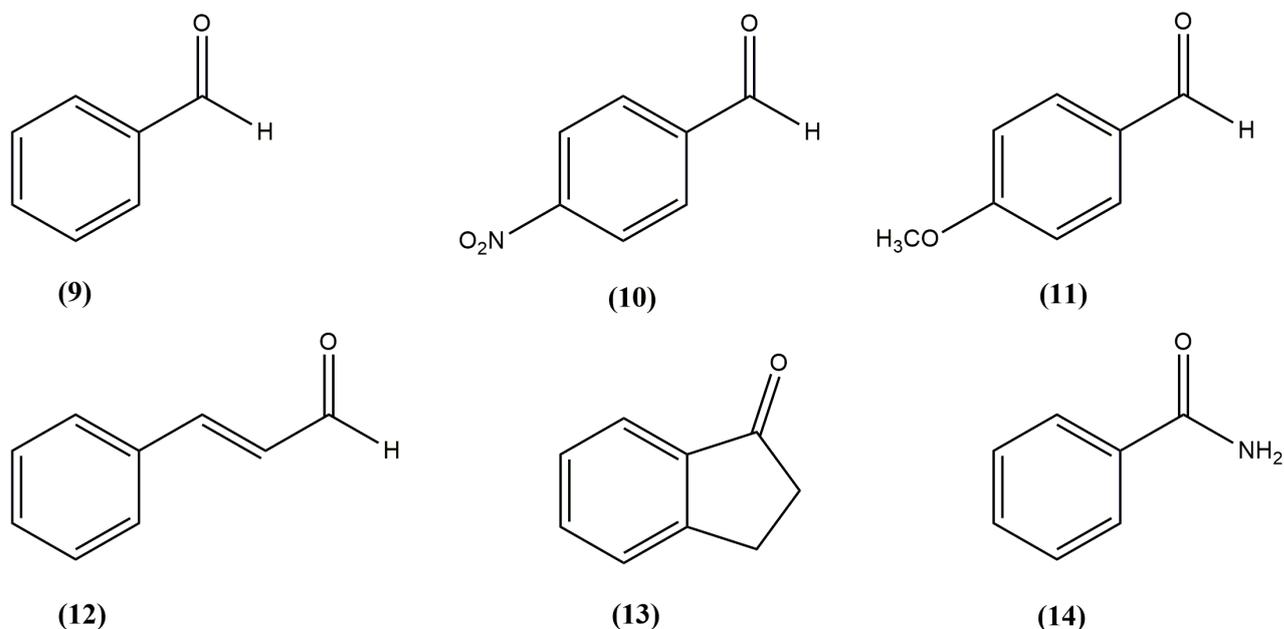
O espectro de massa (Figura 51) de **8a** exibiu M^{+} 136 correspondente ao peso molecular do produto esperado e picos intensos em m/z 121 ($M - 15$) e m/z 93 compatíveis com a estrutura do produto **8a**.

Os baixos valores de rendimento dos produtos **7a** e **8a** podem ser justificados pelos impedimentos estéricos e efeitos doador de elétrons dos substituintes em ambos os casos nos dois sistemas reacionais.

4.4.9 Reações de biorredução com outros compostos carbonilados

As reações de biorredução utilizando as sementes de *Sinapis alba* como fonte de enzimas foram estendidas ao estudo de outros compostos carbonílicos de outras funções orgânicas. Foram investigados os aldeídos benzaldeído (**9**), 4-nitrobenzaldeído (**10**), 4-metóxi-benzaldeído (**11**), cinamaldeído (**12**), a cetona 1-indanona (**13**) e a amida benzamida (**14**), substratos disponíveis no Laboratório de Biotransformações e Produtos Naturais da UFC, Figura 50.

Figura 50 - Outros compostos carbonilados selecionados para a reação com as sementes de *Sinapis alba* L.

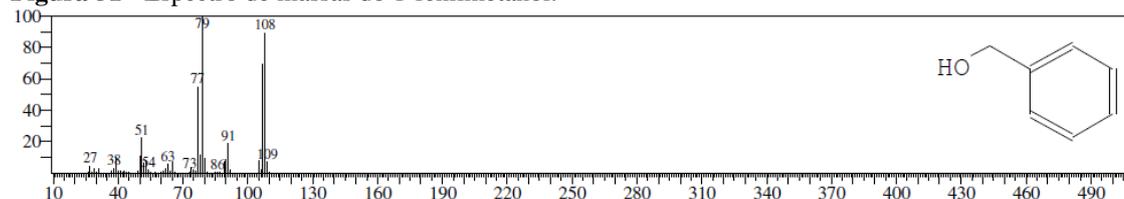


Fonte: Próprio autor.

A redução biocatalítica de aldeídos constitui um meio para obtenção de álcoois, os quais podem ser transformados para a obtenção de vários produtos importantes para a indústria farmacêutica, agroquímica e cosmética (FERREIRA, 2012). Muitos trabalhos (ASSUNÇÃO, 2008; FERREIRA, 2012, ALVES, 2013) já relataram a maior reatividade dos aldeídos em relação às cetonas. Assim, utilizando as condições determinadas para a redução de cetonas (0,05 g de substrato, 15,0 g de biocatalisador, 50,0 mL de tampão pH 6,0/1g de PVP e agitação a 200 r.p.m a 25 °C por 72 h), o

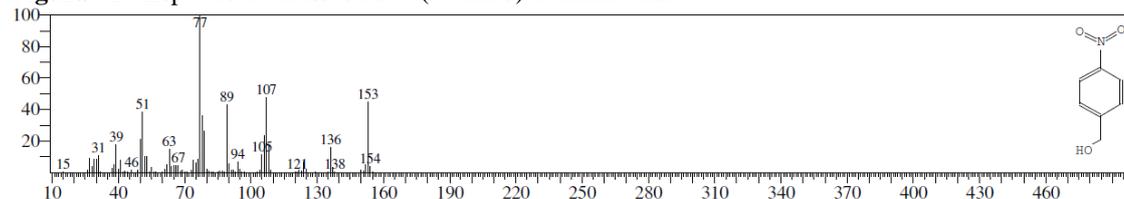
benzaldeído (**9**) foi reduzido ao respectivo álcool com rendimentos excelentes (98,18% em presença de PVP e >99% em pH 6,0). Os substratos 4-nitrobenzaldeído (**10**) e 4-metóxi-benzaldeído (**11**) foram reduzidos aos respectivos álcoois em pH 6,0 com rendimentos de 67,34% e 25,26%, respectivamente, e com PVP, 66,83% e 8,34%, respectivamente. O espectro de massas dos compostos **9a**, **10a** e **11a**, estão representados nas Figura 51, Figura 52 e Figura 53 respectivamente.

Figura 51 - Espectro de massas do 1-fenilmetanol.



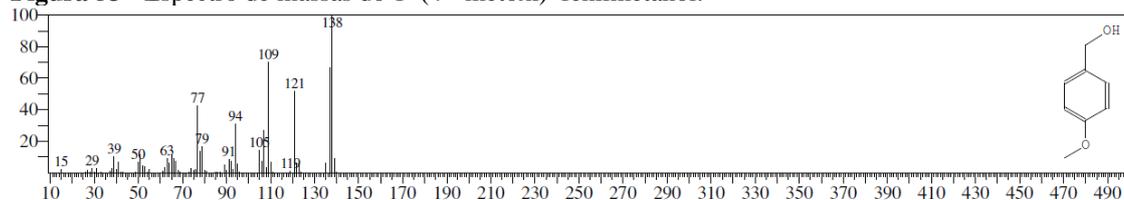
Fonte: Próprio autor.

Figura 52 - Espectro de massas do 1-(4'-nitro)-fenilmetanol.



Fonte: Próprio autor.

Figura 53 - Espectro de massas do 1-(4'-metóxi)-fenilmetanol.



Fonte: Próprio autor.

A adição de PVP provocou uma diminuição na redução do 4-metóxi-benzaldeído, relativamente ao 4-nitrobenzaldeído. A presença dos grupos substituintes interfere na interação enzima substrato e provocou diminuição dos valores de conversão em **10** e **11**, relativamente a **9**. Comparando a reatividade dos aldeídos **10** e **11**, o substrato com o grupo retirador de elétrons forneceu um rendimento bastante superior. Os resultados de conversão para os aldeídos mencionados encontram-se na Tabela 19 (página 76).

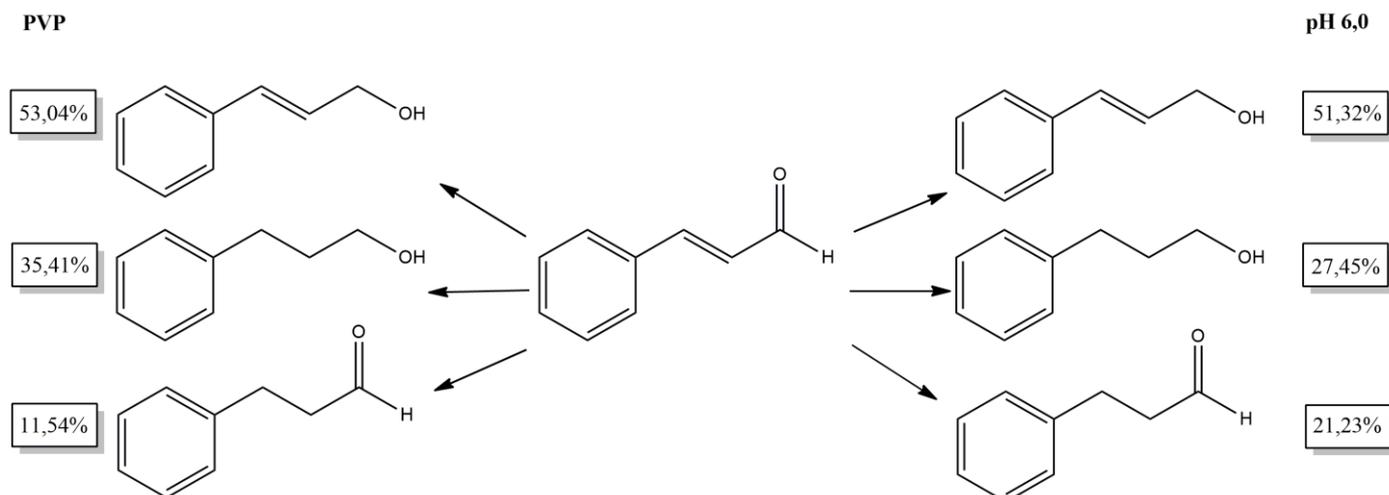
Tabela 19 - Resultados da biotransformação de aldeídos e outros compostos carbonilados utilizando *Sinapis alba* como biocatalisador.

Aldeídos	PVP		pH 6,0	
	Conversão (%)	ee (%)	Conversão (%)	ee (%)
Benzaldeído	98,18		>99	
4-nitro-benzaldeído	66,83		67,34	
4-metóxi-benzaldeído	8,34		25,26	
Cinamaldeído	53,04; 35,41; 11,54		51,32; 27,45; 21,23	
1-indanona benzamida	15,25	>99	3,08	>99
	NR		NR	

Fonte: Próprio autor.

Na reação com o cinamaldeído (**12**) em pH 6,0, a análise do cromatograma CG-EM demonstrou que não houve quimioseletividade com formação de três produtos de redução: o álcool 3-fenilprop-2-en-1-ol (**12a**, 53,00%), resultante de redução do grupo carbonila, o álcool 3-fenilpropan-1-ol (**12b**, 35,41%), resultante de redução dos grupos carbonila e olefina. E o 3-fenilpropanal (**12c**, 11,54%). Resultados semelhantes já haviam sido reportados na literatura (ASSUNÇÃO, 2008 e FERREIRA, 2012). Destaca-se a redução obtida na reação do cinamaldeído com as sementes de *Sinapis alba*, visto que nos trabalhos de Ferreira 2012 e Alves 2013 ocorreu, também, a reação de oxidação do aldeído a ácido carboxílico. A reação com adição de PVP apresentou um leve aumento no rendimento do **12b** e grande diminuição no rendimento da redução do grupo vinila **12c**. A Figura 54 (página 74) apresenta os produtos nas duas reações e os valores de conversão encontram-se representados na Tabela 19.

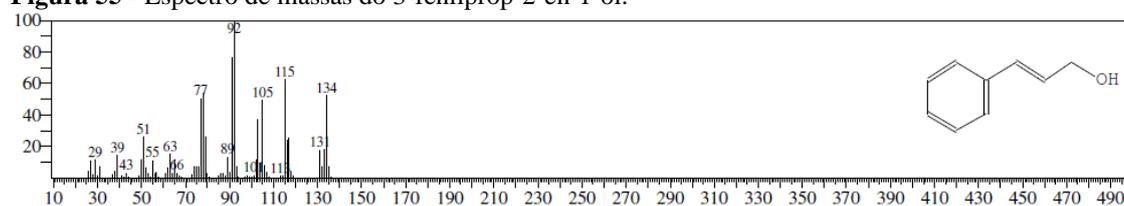
Figura 54 – Produtos da biorredução do cinamaldeído com sementes de *Sinapis alba* L.



Fonte: Próprio autor.

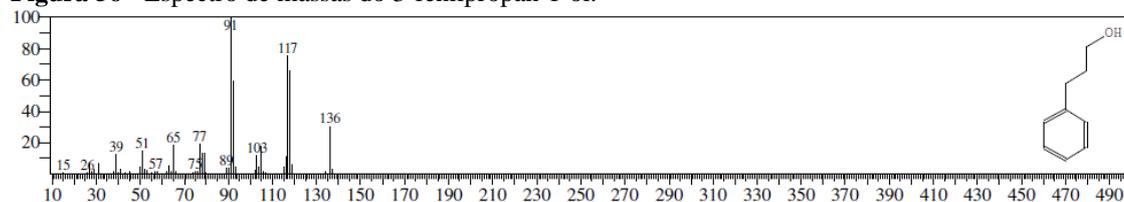
O espectro de massas dos compostos **12a**, **12b** e **12c**, estão representados nas Figura 55, Figura 56 e Figura 57, respectivamente.

Figura 55 - Espectro de massas do 3-fenilprop-2-en-1-ol.



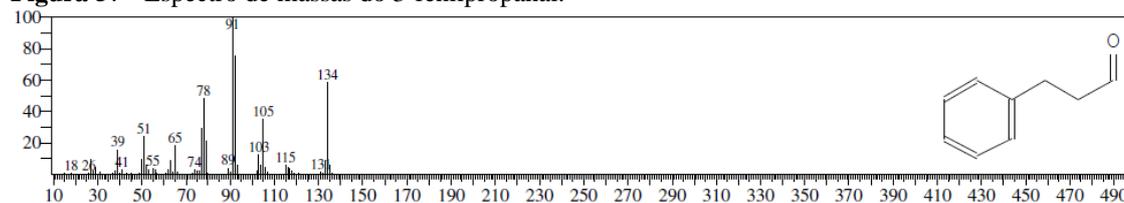
Fonte: Próprio autor.

Figura 56 - Espectro de massas do 3-fenilpropan-1-ol.



Fonte: Próprio autor.

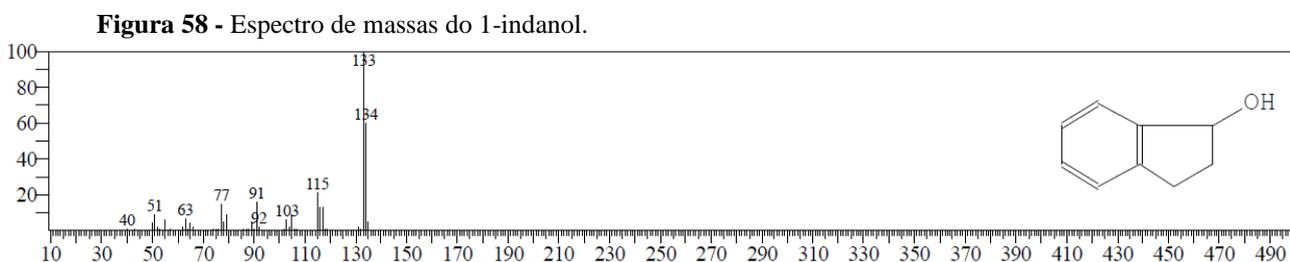
Figura 57 - Espectro de massas do 3-fenilpropanal.



Fonte: Próprio autor.

A redução da α -indanona (**13**) também foi investigada devido sua importância nos produtos farmacêuticos como o Indinavir® (um inibidor da HIV-protease), o Aricept® (utilizado no tratamento do mal de Alzheimer) e a (+)-indacrinona (controle da hipertensão), pois todos esses compostos apresentam o anel indânico (SOUZA, 2012).

Os resultados obtidos na redução da 1-indanona foram considerados excelentes em ambas as metodologias, pois apresentaram excesso enantiomérico de >99 para o isômero *S*. No tocante a conversão, destaca-se a metodologia com PVP (15,25%), enquanto, em pH 6,0 o valor foi de 3,08%. O espectro de massas, Figura 58, para o 1-indanol mostra o produto obtido.

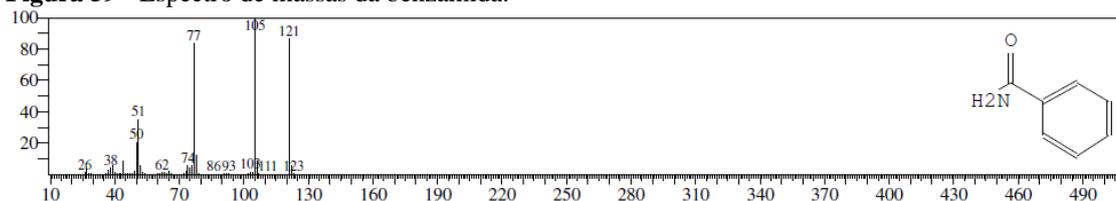


Fonte: Próprio autor.

A reação da benzamida (**14**) com o complexo enzimático também teve sua atividade avaliada devido sua importância na área farmacológica. Segundo Faraco (2007) as amidas vicenistatina apresenta atividade antitumoral; fluvirucinas apresenta atividade contra a influenza A e atividade antiviral; A indolactama-V e benzolactama-V8, ligam-se à proteína quinase C, ativando-a para a promoção de tumores; o cloridrato de metoclopramida (plasil) é usada para distúrbios do gastro intestinal, náuseas e vômitos.

Foram utilizadas as duas metodologias para as reações da benzamida, mas não foi observada nenhuma evidência de reação (Figura 59).

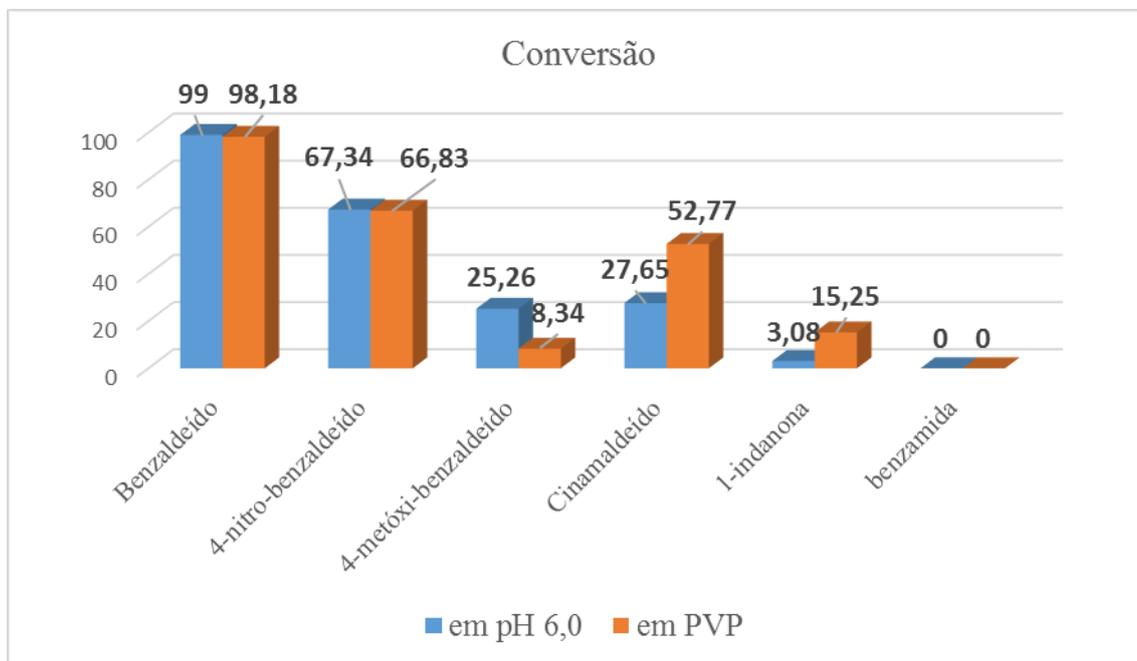
Figura 59 - Espectro de massas da benzamida.



Fonte: Próprio autor.

O Gráfico 16 apresenta o perfil do ensaio biocatalítico utilizando as duas metodologias para os compostos carbonílicos em questão.

Gráfico 16 - Perfil de biotransformação dos compostos carbonilados utilizando *Sinapis alba* como biocatalisador.



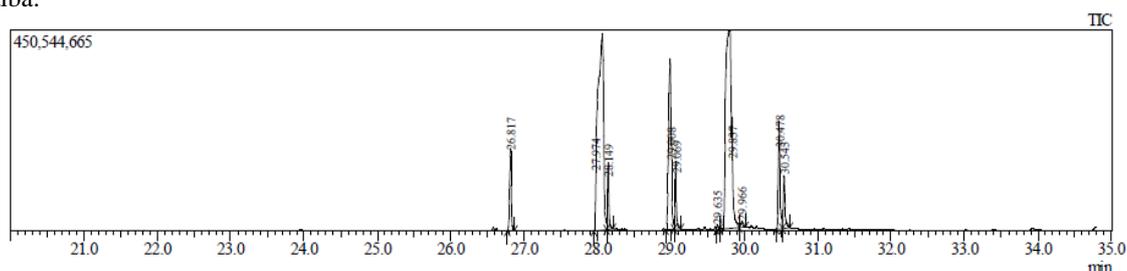
Fonte: Próprio autor

4.5 IDENTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS ATRAVÉS DOS DERIVADOS METILADOS POR CG/EM

O extrato hexânico foi submetido à reação de saponificação (KOH/MeOH) para obtenção dos sais de ácidos graxos livres os quais, após acidificação, foram esterificados (MeOH/HCl) para produzirem os respectivos ésteres metílicos de ácidos graxos.

A análise do cromatograma dos ésteres metílicos mostrou a presença de oito ácidos graxos (Tabela 20, p. 81) 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 60).

Figura 60 – Cromatograma de íons totais dos ésteres metílicos obtidos de ácidos graxos da *Sinapis alba*.



Fonte: Próprio autor.

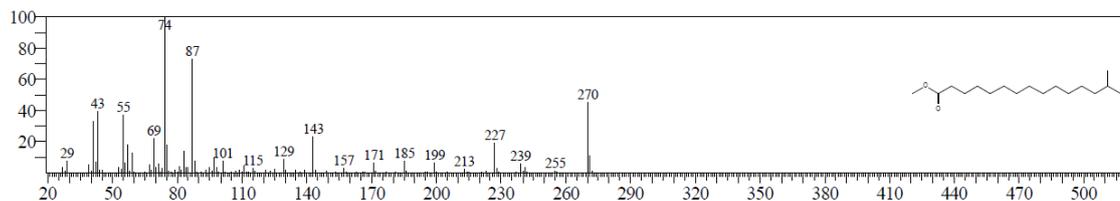
Tabela 20 - Ácidos graxos identificados como ésteres metílicos.

	SUBSTÂNCIA	NOME COMUM	T _R (min)	TEOR (%)	.M	F.M
1	Ácido hexadecanoico	Ácido palmítico	26,87	7,32	56	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
2	Ácido cis-9,cis-12-octadecadienóico	Ácido linoléico	28,12	27,54	80	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
3	Ácido octadecanoico	Ácido esteárico	28,21	4,9	84	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
4	Ácido 9-octadecenoico	Ácido oléico	29,93	14,35	82	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
5	Ácido 6-octadecenóico	Acido linolênico	30,435	7,52	80	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
6	Ácido eicosanóico		29,045	4,64	12	C ₂₀ H ₄₀ O ₂
7	Ácido 13-docosanóico	Ácido erúico	29,665	27,61	38	C ₂₂ H ₄₂ O ₂
8	Ácido tetracosanóico	Ácido lignocérico	30,52	4,97	68	C ₂₄ H ₄₈ O ₂

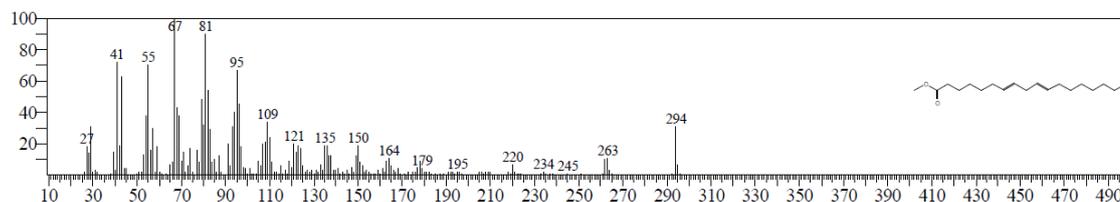
T_R : Tempo de retenção; M.M: Massa molar (g mol⁻¹); F.M : Fórmula molecular; a: nome comum usado neste trabalho; **Fonte:** Próprio autor.

Os espectros de massa dos componentes foram 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 (

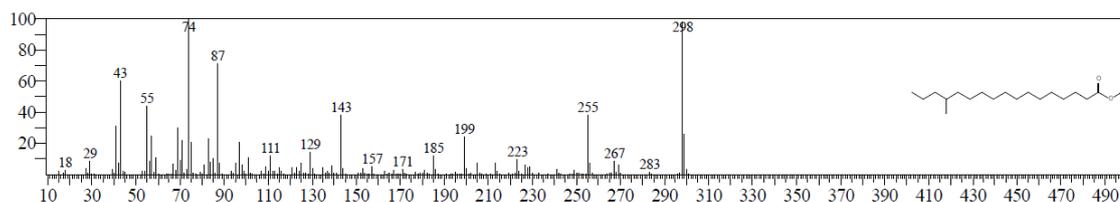
Figura 61**Figura 62****Figura 63****Figura 64****Figura 65**,**Figura 66****Figura 67****Figura 68**).

Figura 61 – Éster metílico do ácido palmítico.

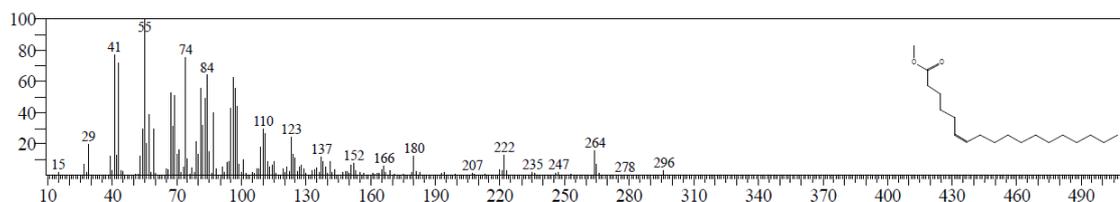
Fonte: Próprio autor.

Figura 62 – Éster metílico do ácido linoléico.

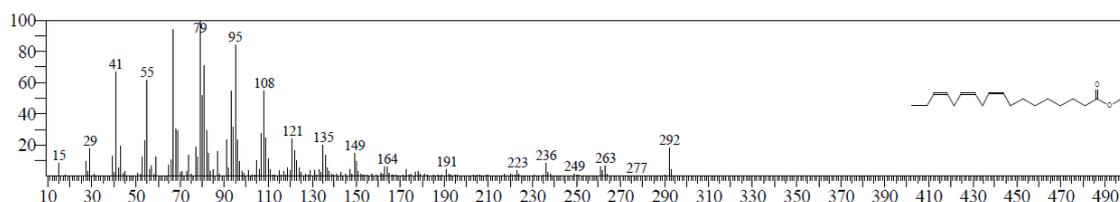
Fonte: Próprio autor.

Figura 63 – Éster metílico do ácido esteárico.

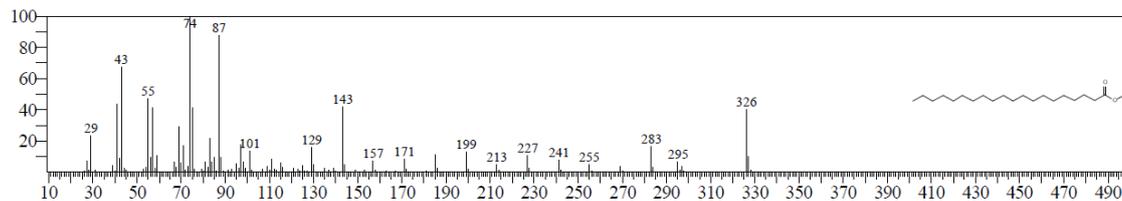
Fonte: Próprio autor.

Figura 64 – Éster metílico do ácido oléico.

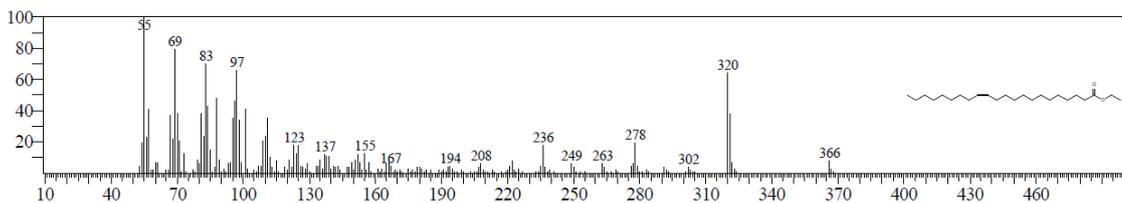
Fonte: Próprio autor.

Figura 65 – Éster metílico do ácido linolênico.

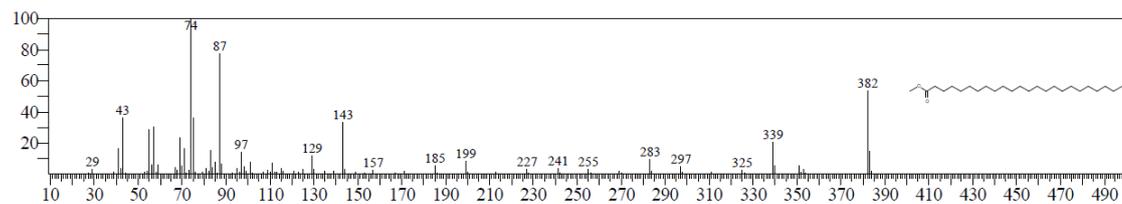
Fonte: Próprio autor.

Figura 66 – Éster metílico do ácido eicosanóico.

Fonte: Próprio autor.

Figura 67 – Éster metílico do ácido erúico.

Fonte: Próprio autor.

Figura 68 – Éster metílico do ácido lignocérico.

Fonte: Próprio autor.

5 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

5.1. BIOCATALISADOR

As sementes de mostarda (*Sinapis alba* L.) foram adquiridas em lojas de produtos alimentícios no comércio de Fortaleza – Ceará.

5.2 MATERIAL UTILIZADO

As reações enzimáticas foram realizadas em mesa agitadora modelo CT-165 da fabricante CIENTEC; as determinações de massas foram realizadas utilizando balança analítica SHIMADZU AUY220.

Os solventes utilizados nas reações e na purificação dos produtos através de colunas cromatográficas foram de qualidade P.A., de procedência comercial da Synth. O reagente de Bradford utilizado na determinação de proteínas foi procedência comercial Sigma Aldrich; o borohidreto de sódio (NaBH_4) para a redução química convencional foi de procedência comercial da PROSYNTH.

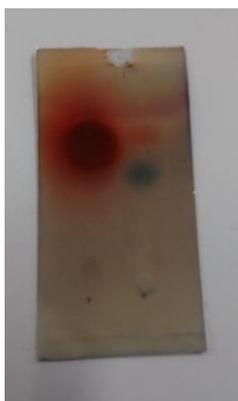
5.3 MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO E ANÁLISE

As análises necessárias para obtenção dos cromatogramas e espectros, incluindo técnicas de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foram realizadas na Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

5.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia de adsorção em camada delgada (CCD) foi realizada utilizando cromatoplasmas de gel de sílica 60 ($\Phi = 2-25\mu\text{m}$) sobre poliéster T-6145 provenientes da marca SIGMA CHEMICAL CO com camada de 250 μm de espessura e dimensões de 10x5 cm. Também foi utilizada placas de vidro revestidas com camada (aproximadamente 0,5 mm de espessura) de sílica gel 60 ($\Phi = 0,004-0,005$ mm), código 1094 da marca VETEC. As cromatoplasmas, após eluição, foram visualizadas através de pulverização com solução de vanilina ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$, 5,0 g) e ácido perclórico (HClO_4 , 0,75 mol/L, 100 mL) em etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$, 100 ml) seguida de aquecimento a 100°C com pistola aquecedora da marca Steinel, modelo HL500, por aproximadamente 1 min (Figura 69).

Figura 69 - Fotografia da CCD da biorredução da acetofenona.



Fonte: Próprio autor.

5.1.2 Cromatografia de adsorção em coluna (CC)

As colunas cromatográficas para purificação dos produtos de reação empregaram gel de sílica 60 ($\Phi = 0,025-0,020\text{mm}$; código 45 337), como fase estacionária, de procedência VETEC. O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades das amostras. Como eluente foi usado diclorometano puro de qualidade PA da marca Synth.

5.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A conversão e o excesso enantiomérico dos produtos de biorredução da acetofenona e de seus derivados foram determinados em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) Shimadzu LC-20AT, equipado com coluna quiral OD-H (150 x 4,6 mm) e detector UV-Vis Shimadzu SPD-M20A (Figura 70). As análises foram realizadas a 30 °C tendo como fase móvel mistura binária de Hexano/Isopropanol e conforme e conforme demais dados registrados na Tabela 21 (página 87).

Figura 70 - Fotografia do Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência utilizado nas análises de biorredução.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 21 - Parâmetros de análise por CLAE dos substratos utilizados nas reações de biocatálise.

Substrato/Produto	Coluna	Temp. °C	Fase móvel Hex:IPA	Fluxo (mL/min)	Tr (min) (Alcoóis)
Acetofenona/ 1-feniletanol	OD-H	30	95:5	0,5	8,97 (R); 11,25 (S)
4-nitro-acetofenona/ 1-(4'-nitro)-feniletanol	OB-H	30	92:8	0,8	10,54 (R); 9,99 (S)
4-bromo-acetofenona/ 1-(4'-bromo)-feniletanol	OB-H	30	95:5	0,5	19,37 (R); 15,12 (S)
4-fluor-acetofenona/ 1-(4'-fluoro)-feniletanol	OB-H	30	95:5	0,5	10,54 (R); 8,98 (S)
3-metóxi-acetofenona/ 1-(3'-metóxi)-feniletanol	OB-H	30	92:8	0,7	10,14 (R); 12,93 (S)
3-nitro-acetofenona/ 1-(3'-nitro)-feniletanol	OB-H	30	92:8	0,7	11,43 (R); 12,95 (S)
2-metóxi-acetofenona/ 1-(2'-metóxi)-feniletanol	OB-H	30	95:5	0,5	18,81 (R); 10,59 (S)
2-metil-acetofenona/ 1-(2'-metil)-feniletanol	OB-H	32	95:5	0,6	10,62 (R); 6,67 (S)

Fonte: Próprio autor.

5.1.4 Espectroscopia na Região do UV/VIS

As medidas de absorvância na região do ultravioleta-visível foram obtidas utilizando-se um espectrofotômetro modelo Spectronic 20 Genesys, Figura 71 (página 85). As leituras foram realizadas nos comprimentos de onda determinado para cada análise, todas em triplicata.

Figura 71 - Fotografia do espectrofotômetro modelo Spectronic 20 Genesys.



Fonte: Próprio autor.

5.1.5 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM)

A análise dos produtos das reações foi realizada em equipamento SHIMADZU XQP2010 (CG/EM), Figura 72, usando coluna capilar RTX-5MS (30,0m x 0,25mm x 0,30mm), utilizando hélio como gás condutor com fluxo de 1,0 mL/min, operando com dois gradientes de temperatura, um de 10°C/min (40-180°C) e de 40°C/min (180°-300°C), com a temperatura de injetor de 250° e do detector de 280 °C.

Figura 72 - Fotografia do CG-EM modelo QP2010 da SHIMADZU.



Fonte: Próprio autor.

6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS

A determinação do teor de proteínas no sistema enzimático do extrato aquoso das sementes de *Sinapis alba L.* Inicialmente, as sementes foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio 5% durante 20 minutos e, posteriormente, com água destilada. Em seguida, 15,0 g de sementes em 50 mL de água destilada em erlenmeyer de 125 mL, foram mantidas sob agitação constante em mesa agitadora a 150 r.p.m por 72 h. O extrato foi filtrado e submetido determinação de proteínas solúveis seguindo metodologia de Bradford.

6.1.1 Método de Bradford

Inicialmente, foi preparado a solução Bradford mediante a dissolução de 50 mg do corante “Comassie Brilliant Blue G 250” (Sigma) em 25 mL de Álcool Etílico. Após agitação desta solução durante 1 h mantendo o erlenmeyer envolto em papel alumínio, foram adicionados 50 mL de ácido fosfórico 85%. O volume foi aferido para 500 mL com água destilada, a solução resultante foi filtrada três vezes em papel de filtro e acondicionada em frasco âmbar a temperatura ambiente.

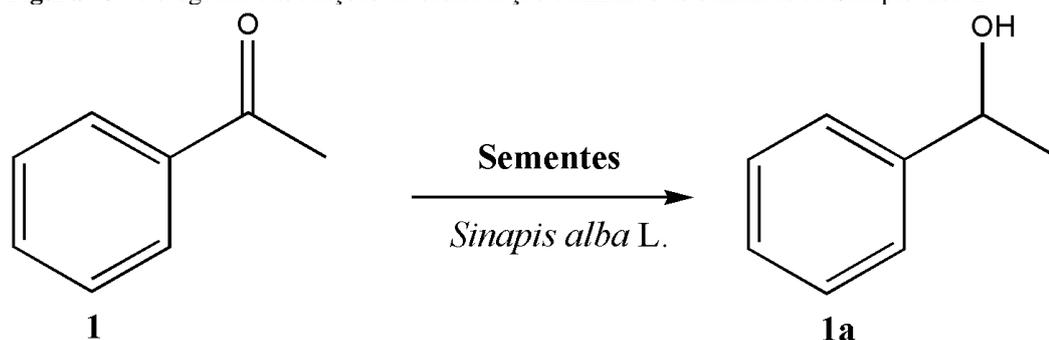
O procedimento a seguir, consistiu em adicionar 2,5 mL do reagente de Bradford a 0,1 mL de amostra de extrato vegetal (diluído em 2,9 mL de água destilada e após 10 minutos foi realizada a leitura de absorção em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e também um “branco” utilizando 0,1 mL de H₂O destilada e 2,5 mL do reagente de Bradford. A quantificação foi realizada utilizando solução aquosa de BSA como padrão da curva de calibração.

7 PROCESSOS BIOCATALÍTICOS

7.1.1 Procedimento experimental geral utilizando as sementes de *Sinapis alba* L.

Nas reações de biocatálise realizadas, usou-se metodologia proposta por FERREIRA (2012), com modificações. O procedimento inicial foi orientado no sentido de otimizar os teores de conversão e de excesso enantiomérico na reação de redução usando acetofenona (Figura 73) como substrato modelo, considerando os parâmetros: quantidade de biocatalisador, tempo reacional, temperatura, uso de co-solvente e solução tamponante.

Figura 73 - Fotografia das reações de biorredução utilizando as sementes de *Sinapis alba* L.



Fonte: Próprio autor.

7.1.1.1 Quantidade de biocatalisador

As sementes de *Sinapis alba* L. foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio 5 % por 20 minutos e em seguida com água destilada. Separadamente, em erlenmeyers de 125 mL foram misturados 5,0 g, 10,0 g, 15,0 g, 20,0 g e 25,0 g com 50 mg de substrato e 50 mL de água destilada. Os recipientes foram lacrados com plástico insulfilm e submetidos à agitação em mesa agitadora a uma velocidade de 150 r.p.m. por 72 h. Todas as reações foram realizadas em duplicata. Em seguida, a mistura resultante foi filtrada e do filtrado fez-se extração do produto com acetato de etila. O

produto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando diclorometano como solvente e submetido a análise por CG-EM para determinação da conversão e CLAE para verificação do excesso enantiomérico.

7.1.1.2 Tempo reacional

As sementes de *Sinapis alba* L. foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio 5 % por 20 minutos e em seguida com água destilada. Em erlenmeyer de 125 mL, foram misturados 15,0 g das sementes com 50 mg de substrato em 50 mL de água destilada. O recipiente foi lacrado e submetido à agitação em mesa agitadora a uma velocidade de 150 r.p.m. durante os períodos de 12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72 h, 96h e 120h. Todas as reações foram realizadas em duplicata. Após os períodos de agitação a mistura resultante foi filtrada e do filtrado fez-se extração do produto com acetato de etila. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando diclorometano como solvente e submetido a análise por CG-EM para determinação da conversão e CLAE para verificação do excesso enantiomérico.

7.1.1.3 Temperatura

As sementes de *Sinapis alba* L. foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio 5 % por 20 minutos e em seguida com água destilada. Foram pesados 15,0 g das sementes de *Sinapis alba* L. em erlenmeyers de 125 mL, juntamente com 50 mg de substrato e 50 mL de água. Os frascos foram lacrados e submetidos à agitação em mesa agitadora a uma velocidade de 150 r.p.m. durante um período de 72 h em temperaturas de 30°C, 35°C, 40°C e 50°C. Todas as reações foram realizadas em duplicata. Posteriormente, a mistura resultante foi filtrada e do filtrado fez-se extração do produto com acetato de etila. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando diclorometano como solvente e submetido a análise por CG-EM para determinação da conversão e CLAE para verificação do excesso enantiomérico.

7.1.1.4 *Uso de co-solvente: Isopropanol*

As sementes de *Sinapis alba* L. foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio 5 % por 20 minutos e em seguida com água destilada. Foram pesados 15,0 g das sementes de *Sinapis alba* L. em erlenmeyers de 125 mL, juntamente com 50 mg de substrato e 50 mL da mistura água e isopropanol nas seguintes proporções (v/v) de isopropanol: 1%, 2%, 5%, 10% e 15%. Os frascos foram lacrados e submetidos à agitação em mesa agitadora a uma velocidade de 150 r.p.m. durante um período de 72 h. Todas as reações foram realizadas em duplicata. Posteriormente, a mistura resultante foi filtrada e do filtrado fez-se extração do produto com acetato de etila. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando diclorometano como solvente e submetido a análise por CG-EM para determinação da conversão e CLAE para verificação do excesso enantiomérico.

7.1.1.5 *Meio tamponante: pH 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0*

As sementes de *Sinapis alba* L. foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio 5 % por 20 minutos e em seguida com água destilada. Foram pesados 15,0 g das sementes de *Sinapis alba* L. em erlenmeyers de 125 mL, juntamente com 50 mg de substrato e adicionado a cada erlenmeyer 50 mL de soluções tampões, previamente preparadas a partir de sais ácidos ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) com os valores de pH 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0. Os frascos foram lacrados e submetidos à agitação em mesa agitadora a uma velocidade de 150 r.p.m. durante um período de 72 h. Todas as reações foram realizadas em duplicata. Posteriormente, a mistura resultante foi filtrada e do filtrado fez-se extração do produto com acetato de etila. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando diclorometano como solvente e submetido a análise por CG-EM para determinação da conversão e CLAE para verificação do excesso enantiomérico.

7.1.1.6 Uso de Polivinilpirrolidona (PVP)

A metodologia de Souza (2012) adotada para esse procedimento foi modificada. As sementes de *Sinapis alba* L. foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio 5 % por 20 minutos e em seguida com água destilada. Foram pesados 15,0 g das sementes de *Sinapis alba* L. em erlenmeyers de 125 mL com quantidades variadas de polivinilpirrolidona (PVP) juntamente com 50 mg de substrato e 50 mL de solução tampão fosfato pH 6,5. A quantidade de PVP adicionado foi de 1g, 2g, 5g e 10g. Os frascos foram lacrados e submetidos à agitação em mesa agitadora a uma velocidade de 150 r.p.m. durante um período de 72 h. Todas as reações foram realizadas em duplicata. Posteriormente, a mistura resultante foi filtrada e do filtrado fez-se extração do produto com acetato de etila. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando diclorometano como solvente e submetido a análise por CG-EM para determinação da conversão e CLAE para verificação do excesso enantiomérico.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As reações biocatalíticas realizadas neste trabalho utilizando as sementes de *Sinapis alba* L. como biocatalisador mostraram resultados satisfatórios.

Na reação a partir de cetonas pró-quirais foram obtidos álcoois com alta pureza enantiomérica [4-bromo (ee = 98%), 4-fluor e 3-metoxi].

No caso dos substratos cetônicos com substituintes na posição *meta* foi observado a formação do isômero S (produto Prelog) em pH 6,0, enquanto o isômero R (produto anti-Prelog) foi obtido na presença de PVP.

Além da redução dos grupos carbonila das funções orgânicas aldeído e cetona, foi observado também a redução do grupo nitro a função amina na presença de PVP. Esta redução é interessante pois compostos contendo grupo nitros são tóxicos e resistentes a biodegradação.

Em resumo as sementes da planta em estudo demonstraram alto potencial para a preparação de intermediários na síntese de produtos das indústrias farmacêutica, agromquímica e cosmética.

REFERÊNCIAS

- ASSUNÇÃO, J. C. C. **Tese de doutorado**. Universidade Federal do Ceará, Brasil, 2008.
- APHORTESP Disponível em: <<http://aphortesp.com.br/index.php/ct-menu-item-11/12-produtos/68-mostarda>>. Acesso em: 8 janeiro 2017.
- BARON, A. C. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2008.
- BIROLI, W. G. Et al. Biocatalysis and biotransformation in Brazil: An overview. **Biotechnology Advances**. v. 33, p. 481-510, 2015.
- BLOCK, J. M; **Dissertação de Mestrado** – Comportamento térmico de gorduras produzidas no Brasil. USFC – Centro de Ciências dos Alimentos, Florianópolis – S.C, 1992.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. **Enzimas em biotecnologia – Produção, aplicações e mercado**. Ed. Interciência. c. 15, p. 359. 2008.
- CLEMENTE, I.; AZNAR, M.; SILVA, F.; NERÍN, C. Antimicrobial properties and mode of action of mustard and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 36, p. 26-33, 2016.
- COMPTON, S. J.; JONES, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical Biochemistry**, v. 151, n. 2, p. 369-374, 1985.
- DA SILVA, R. A. C. **Tese de doutorado**. Universidade Federal do Ceará, Brasil, 2016.
- DAMIAN, C. Physical properties of mustard seeds (*Sinapis alba* L.). *Lucrări Științifice - Seria Zootehnie*. vol. 61, 2014.
- DUKARSKA, D.; ŁECKA, J.; SZAFONI, K. Straw of white mustard (*Sinapis alba*) as an alternative raw material in the production of particle boards resinated with UF resin. **Acta Sci. Pol.** V. 10, n. 1, p. 19-28, 2011.
- FERREIRA, D. A. **Tese de doutorado**. Universidade Federal do Ceará, Brasil, 2012.
- GREENE, D. H. S. AND SELIVONCHICK, D. P. (1987). Lipid metabolism in "sh. **Prog. Fish Res.** 26, 53-85.
- JOKANDAN, E.F., NAEIJI, P., VARAMINIAN, F., 2016. The synergism of the binary and ternary solutions of polyethylene glycol, polyacrylamide and Hydroxyethyl cellulose to methane hydrate kinetic inhibitor. **J. Nat. Gas Sci. Eng.** 29, 15 e 20.

KHODAVERDILOO, K.R., RAD, S.A., NAEIJI, P., PEYVANDI, K., VARAMINIAN, F., 2016. Synergistic effects of nonylphenol ethoxylates and polyethylene glycols on performance of gas hydrate kinetic inhibitor. **J. Mol. Liq.** 216, 268 e 274.

LEAF, A. AND KANG, J. X. (1998). Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. **World Ver. Nutr. Diet.** 83, 24-37.

LIMA, A. W. O.; AGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 229-245, 1999.

LUCARINI, A. C.; KILIKIAN, B. V. Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances. **Biotechnology Techniques.** v. 13, p. 149-154, 1999.

MARTINA, V.; VOJTECH, K., A comparison of Biuret, Lowry and Bradford methods for measuring the egg's proteins. **Mendel Net**, 2015.

MIWA, A. C. P. **Comparação e avaliação dos métodos colorimétricos utilizados na determinação de proteínas em lagoas de estabilização.** Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

MOREIRA, N. X.; CURI, R.; MANCINI FILHO, J. Ácidos graxos: uma revisão. **Revista Nutrire**, V.24, P.105-123, 2002.

OLIVEIRA, C.P.; M.E.N.P. RIBEIRO, N.M.P. S RICARDO, T.V.de P. SOUZA, C.L. MOURA, C. CHAIBUNDIT, S.G. YEATES, K. NIXON, D. ATTWOOD, 2011. The effect of polymeric additives on the solubilisation of a poorly-soluble drug in micellar solutions of Pluronic F127. **Int. J. Pharm.** 421 (2011) 252.

PAUNERO, I. Disponível em:<www.inta.gob.ar/noticias/delfina-inta-la-primera-mostazaargentina/>. Acesso em: 10 de janeiro de 2017.

RODRIGUEZ, P. *et al.* Stereoselective biotransformation of α -alkyl- β -keto esters by endophytic bacteria and yeast. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, v. 71, p.90-94, 2011

SANTOS, R. D.; GAGLIARDI, A. C. M.; XAVIER, H. T.; CASELLA FILHO, A.; ARAÚJO, D. B.; CESENA, F. Y.; ALVES, R. J. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF). **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.99, n.2 ,supl.2, p.1-28, 2012.

SANTOS, R. D.; GAGLIARDI, A. C. M.; XAVIER, H. T.; MAGNONI, C. D.; CASSANI, R.; LOTTENBERG, A. M. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia: I diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.100, supl.3, p.1-40, 2013.

SHARIF, H., RIPMEESTER, J., WALKER, V.K., ENGLEZOS, P., 2014. Kinetic inhibition of natural gas hydrates in saline solutions and heptane. **Fuel** 117, 109 e 117.

SIMOPOULOS, A. P. (1991). Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.* 54, 438-463.

SOUZA, J. M. O. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Ceará, Brasil, 2012.

TALAGHAT, M.R., 2014. Experimental investigation of induction time for double gas hydrate formation in the simultaneous presence of the PVP and L-tyrosine as kinetic inhibitors in a mini flow loop apparatus. *J. Nat. Gas Sci. Eng.* 19, 215 e 220.

VIEIRA, G. B. A.; ARAÚJO, D. M. F.; LEMOS, T. L. G.; MATTOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; MELO, V. M. M.; GONZALO, G.; GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; GOTOR, V. *Candida tropicalis* CE017: a New Brazilian Enzymatic Source for the Bioreduction of Aromatic Prochiral Ketones. *Journal Brazilian Chemistry Society*. v. 21, n. 8, p. 1509-1516, 2010.

VOLKIN, D. B.; KLIBANOV, A. M. In Protein Function, A Pratical Approach. Creighton, T. E., Ed., IRL Press: Oxford, 1989.

WU, Y.; HUI, D.; ESKIN, N.A.M.; CUI, S.W. Water-soluble yellow mustard mucilage: A novel ingredient with potent antioxidant properties. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 91, p. 710-715, 2016.

YADAV, J. S.; NANDA, S.; REDDY, P. T.; A. B. Rao; Efficient enantioselective reduction of ketones with *Daucus carota* root; *Journal of Organic Chemistry*, 67, No 11, 2002.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens de métodos existentes. *Química Nova*. v. 21, p. 787-793, 1998.

ZERAIK, A. E.; SOUZA, F. S.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. *Química Nova*. v. 31, n. 4, p. 731-734, 2008.

ZHAO, X., QIU, Z., ZHOU, G., HUANG, W., 2015. Synergism of thermodynamic hydrate inhibitors on the performance of poly (vinyl pyrrolidone) in deepwater drilling fluid. *J. Nat. Gas Sci. Eng.* 23, 47 e 54.