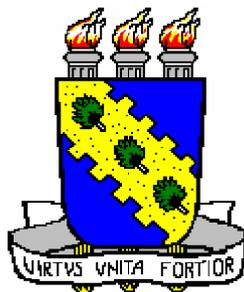


UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA



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

ALÚSIO MARQUES DA FONSECA

FORTALEZA - CEARÁ
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

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

ALUÍSIO MARQUES DA FONSECA

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

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

FORTALEZA - CEARÁ
2009

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

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

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

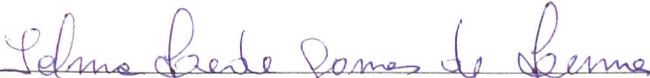
CDD 547

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

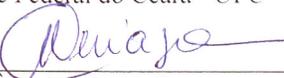
Alúcio Marques da Fonseca

Tese aprovada em: 29 / 01 / 2009

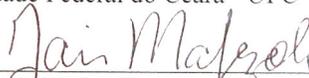
EXAMINADORES:



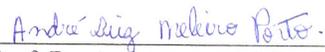
Prof.ª. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
Universidade Federal do Ceará - UFC



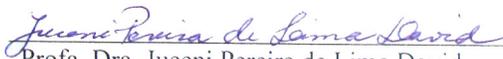
Prof.ª. Dra. Ângela Martha Campos Arriaga
Universidade Federal do Ceará - UFC



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



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



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

A Deus.

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

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

CAPÍTULO 4 – PARTE EXPERIMENTAL

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

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

CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

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

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

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

CAPÍTULO 6 – CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROSCÓPICOS

6.1. Procedimentos Sintéticos na Obtenção dos Álcoois por NaBH ₄	178
6.2. Dados dos Compostos Obtidos na Redução de Cetonas e Aldeídos e Hidrólise de Ésteres e Amidas.....	179

CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES.....194

CAPÍTULO 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....196

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

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

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

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

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

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

LISTA DE TABELAS

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

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

LISTA DE GRÁFICOS

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

LISTA DE FLUXOGRAMAS

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

LISTA DE ESQUEMAS

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

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

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

Capítulo 1



INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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



(1a)



(1b)



(1c)

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

Capítulo 2



CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2.1. ASPECTOS BOTÂNICOS DO COCO DA ESPÉCIE *COCOS NUCIFERA*

O coco é uma drupa monosperma formado por uma epiderme lisa ou epicarpo, que envolve um mesocarpo fibroso, no interior deste encontra-se uma camada muito dura, o endocarpo (PASSOS, 1998; LEBER; FARIA, 2003). A semente, envolvida pelo endocarpo, é constituída por uma camada fina de cor marrom – o tegumento – que fica entre o endocarpo e o albúmem sólido. Este albúmem, é caracterizado como uma amêndoa comestível, branca, muito oleosa, formando uma grande cavidade, no centro da qual está a água-de-coco, ou albúmem líquido (PASSOS, 1998). Ver **Fig. 2, p. 5**.

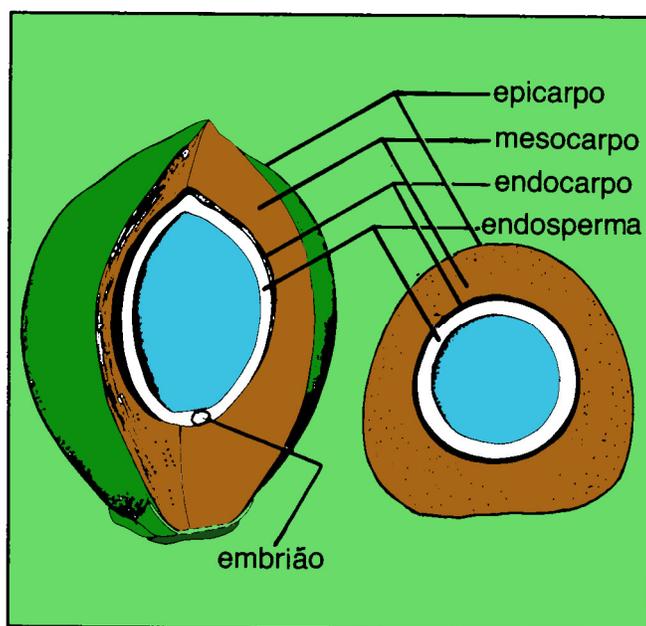


Figura 2: Partes do coco.

A água-de-coco representa um importante papel no amadurecimento e germinação do fruto e sua composição varia acentuadamente durante o processo de maturação (SREBERNICH, 1998). Começa a se formar mais ou menos um mês e meio após a polinização da flor feminina (ARAGÃO, 2001) e quando se destina ao consumo *in natura*, o coco deve ser colhido entre seis a oito meses

após o florescimento, momento em que a quantidade de água e a concentração de açúcares aumenta (BRASIL, 2000), diminuindo posteriormente durante os estágios de maturação (LEBER; FARIA, 2003). O ponto ideal da colheita do fruto verde está associado a uma série de indicadores relacionados à planta, ao fruto às características químicas e sensoriais da água, ligadas aos aspectos nutritivos, alimentares e de saúde humana (ARAGÃO et al., 2001). A determinação do ponto de colheita é feita pela associação de indicadores morfológicos relacionados à idade ou ao tamanho do fruto, ou ainda à contagem de folhas na planta e de químicos relacionados à água (RESENDE et al., 2002). Os frutos devem ser colhidos com o máximo cuidado, para evitar injúrias mecânicas provocadas pela queda. Os cocos são apanhados com a mão e descidos em cestos ou sacos presos a uma corda, para evitar a sua ruptura com a queda.

Capítulo 3



LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

3. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

3.1. A IMPORTÂNCIA DA UTILIZAÇÃO DA ÁGUA-DE-COCO EM ASPECTOS MEDICINAIS E TECNOLÓGICOS

A água-de-coco de um fruto corresponde em aproximadamente 25% do peso total do fruto, e sua composição básica apresenta cerca de 93% de água, 5% de açúcares, além de proteínas, vitaminas e sais minerais, sendo uma bebida leve, refrescante e pouco calórica, apresentando em média 20 calorias/100 mL (ARAGÃO et al. 2001). Ela tem sido usada desde muito tempo nos mais variados tipos de usos populares e na terapia medicinal (ARAGÃO et al. 2001). Por ser estéril e estar dentro do fruto, a água extraída de frutos jovens apresenta composição química próxima à do soro glicosado isotônico empregado em hospitais, o que possibilita o seu uso na esfera médica (WOSIACKI et al, 1996).

A água-de-coco verde pode ser utilizada em situações emergenciais, onde não há possibilidade de atendimento hospitalar, como fluido de hidratação intravenosa (PETROIANU et al., 2004). Campbell-Falck e seus colaboradores (2000), em um estudo de caso, observaram que a água-de-coco pode ser utilizada por via intravenosa sem efeitos adversos, em pequenas quantidades e em curtos períodos de tempo. Os autores também afirmam que por ser fonte de potássio e cálcio a água-de-coco pode ser indicada em situações em que estes componentes precisam ser repostos no organismo com urgência. Petroianu e colaboradores (2004) avaliando os elementos traços (manganês, zinco, cobre e cromo) presentes na água-de-coco, afirmaram que embora a composição da água-de-coco não seja completamente equivalente às soluções utilizadas para pacientes com alimentação totalmente parenteral, pode prover a reposição de alguns destes elementos por via intravenosa.

Em alguns países onde a deficiência nutricional na população é alta, a água-de-coco é utilizada como substituta de produtos protéicos. A água-de-coco apresenta na sua composição aminoácidos semelhantes aos do leite, porém com maior porcentagem de arginina, alanina, cistina e serina e em menores proporções de outros aminoácidos. O coco tem a vantagem de existir naturalmente em grandes quantidades em países onde a desnutrição é prevalente (ARAGÃO, 2001).

A água-de-coco também é usada com êxito como um diurético. Onde tem sido testada como auxiliar no tratamento de litíase renal em hospitais de Manila segundo MAGAT et. al. 1997.

ANURAG e RAJAMOAH (2003) estudaram os efeitos do consumo de água-de-coco contra a toxicidade induzida por isoproterenol na atividade mitocondrial do coração de ratos. Os resultados indicaram que a ingestão de água-de-coco tem um efeito benéfico significativo na atividade mitocondrial, podendo prevenir o enfarte do miocárdio.

A água-de-coco também apresenta propriedades antioxidantes, segundo MANTENA e colaboradores (2003). A atividade protetora da água-de-coco pode ser em parte atribuída à presença da vitamina C em sua composição, embora mais de um princípio ativo possa estar envolvido. LOKI et al. (2003), estudaram os efeitos hepatoprotetores e antioxidantes da água-de-coco, encontrando resultados positivos do tratamento da água-de-coco contra o *stress* oxidativo, além do comprovado efeito hepatoprotetor.

A água-de-coco mostra ainda outras utilizações em áreas como a biotecnologia. Vem sendo utilizada como um diluente e conservante de sêmen, extraíndo-se uma substância ativa da água-de-coco que atualmente está protegida sob patente (GYR), que aumenta a vida útil e a motilidade dos espermatozóides (UCHOA et al., 2002). Estudos vêm sendo utilizados na preservação de sêmen

canino (CARDOSO et al., 2003) e suíno (KOTZIAS-BANDEIRA et al., 1999). A água-de-coco consegue manter a longevidade de células como de córneas humanas para transplante, culturas de tecido, meio de culturas para vírus e bactérias, e para obtenção de vacinas contra febre aftosa, raiva e leishmaniose.

A água-de-coco também, fornece um bom fertilizante, contendo hormônios de crescimento principalmente para orquídeas em particular (MAGAT et. al., 1997).

3.2. A UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS ÍNTEGRAS DE VEGETAIS NAS REAÇÕES DE BIOCATÁLISE

É bem estabelecido que preparações cruas de certos legumes comuns podem ser seletivos, e atuam como agentes redutores de compostos carbonílicos para síntese orgânica (CORDELL et. al. 2007). Outros trabalhos já mostraram a efetividade de manihot (mandioca) em servir como um poderoso reagente de enantioseletividade para a redução de uma ordem diversa de aldeídos e cetonas (MACHADO et. al. 2006). Uma investigação foi iniciada para explorar uma gama de raízes, tubérculos, sementes, e frutas do nordeste brasileiro. Então usou-se para propósitos nutricionais e medicinais para seus potenciais como reagentes de biocatálise. Uma série de espécies vegetais selecionadas do nordeste brasileiro que usou acetofenona como o substrato e através de uma metodologia conhecida (MACHADO et. al. 2006; YADAV et. al. 2002; SOUZA, 2003). Células íntegras de vegetais foram analisadas em reações de reduções.

Estudo completo em uma série de compostos inicialmente com a água-de-coco na forma de células íntegras e posteriormente a água-de-coco com suas enzimas presentes na células imobilizadas em alginato de sódio.

3.3. CONSIDERAÇÕES SOBRE ENZIMAS E ENZIMAS IMOBILIZADAS

Por definição, enzimas são catalisadores que se formam nas células vivas dos vegetais, animais e microorganismos, e são agentes essenciais para a realização de reações bioquímicas com alta especificidade (FABER, 1997; MURRAY, 1990).

A eficiência catalítica das enzimas, em geral, é muito maior do que a dos catalisadores sintéticos, devido ao seu alto grau de especificidade tanto para o substrato quanto para as reações que catalisam (FABER, 1997). Enzimas como catalisadores, têm notáveis propriedades, mas uma característica faz delas especialmente valiosas para síntese orgânica, elas são seletivas (MURRAY, 1990).

O uso de enzimas parcialmente purificadas como catalisadores específicos se tornou muito importante para um grande número de indústrias. Na última década, as reações catalisadas por enzimas aumentaram dentro da química orgânica sintética. Estima-se que das 25.000 enzimas presentes na natureza, cerca de 2.800 foram classificadas e perto de 400 são comercializadas de uma forma pura (www.PASTEUR, 2001; FABER, 1997).

3.3.1. Imobilização de Enzimas

As enzimas estão sujeitas a inativação por vários fatores como por exemplo: químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso (VILLENEUVE *et. al.*, 2000) Há assim, uma necessidade de estabilizar a enzima contra sua inativação para utilizá-la em determinados meios orgânicos. Desta forma, faz-se necessário o emprego de um método para que a mesma não perca sua atividade catalítica e quando requer compostos com centros estereogênicos. Frente a este método o qual se deve aplicar para as enzimas e facilitar a sua recuperação e reutilização (KILINC *et. al.*, 2002).

A imobilização de enzimas em diferentes suportes é uma das técnicas mais importantes que vem sendo utilizada na aplicação de catálise enzimática para reações sintéticas em solventes orgânicos. Por razões práticas e econômicas, é muitas vezes vantajoso usar enzimas imobilizadas visto que, com poucas exceções, elas são insolúveis em solventes orgânicos. A imobilização do biocatalisador em um suporte, sem prejuízo de sua atividade por um razoável período de tempo, pode assegurar sua repetida utilização ou mesmo possibilitar o uso em reatores contínuos, resultando em economia nos processos industriais. (KILINC *et. al.*, 2002; NASCIMENTO *et. al.*, 2002a, 2002b; JESUS *et. al.*, 1998).

3.3.1.1. Características gerais dos suportes para imobilização

A natureza do suporte é muito importante para a eficiência da imobilização. Geralmente materiais hidrofóbicos são melhores comparados aos suportes hidrofílicos. A quantidade de enzimas adsorvidas nos suportes hidrofóbicos é maior, e com isso a atividade da enzima é preservada. Suportes hidrofílicos tendem a competir com a enzima pela água que está disponível para a reação. Quando a enzima e o suporte estão totalmente hidratados, o suporte hidrofílico conduz a uma maior concentração de água no ambiente da enzima favorecendo reações hidrolíticas (VILLENEUVE *et. al.*, 2000).

O suporte para a imobilização pode ser dividido em duas regiões, a de macroporos (> 100 nm) e a de microporos (< 100 nm). Na região de microporos a adsorção é considerada reduzida (VILLENEUVE et. al., 2000). Morfologicamente, as matrizes para imobilização podem ser classificadas em porosas e não porosas.

A **Tabela 1, p. 12**, compara as vantagens e desvantagens dos suportes, quanto a porosidade.

Tabela 1. Comparação de suportes para a imobilização de biocatalisadores quanto à porosidade (KILINC et. al., 2002;TAVARES, 1998).

Classificação Morfológica	Vantagens	Desvantagens
Matrizes não-porosas	Pequenas limitações difusionais	Pequena área de superfície; Baixo teor em biocatalisadores; Uso de partículas finas: -Dificuldade para remover; -Dificuldade para uso contínuo; -Elevada pressão osmótica; -Velocidade de fluxo limitada;
Matrizes porosas	Elevada área de superfície; Elevado teor em biocatalisadores; Proteção ao ambiente externo.	Elevada área de superfície interna; Elevadas limitações difusionais; Elevada pressão osmótica (géis); Pequena área de superfície útil;

3.3.1.2. Classificação dos métodos de imobilização

A **Figura 3, p. 13**, pode nos ilustrar com os diversos métodos de imobilização enzimática (VILLENEUVE et. al., 2000; PEREIRA et. al., 1985).

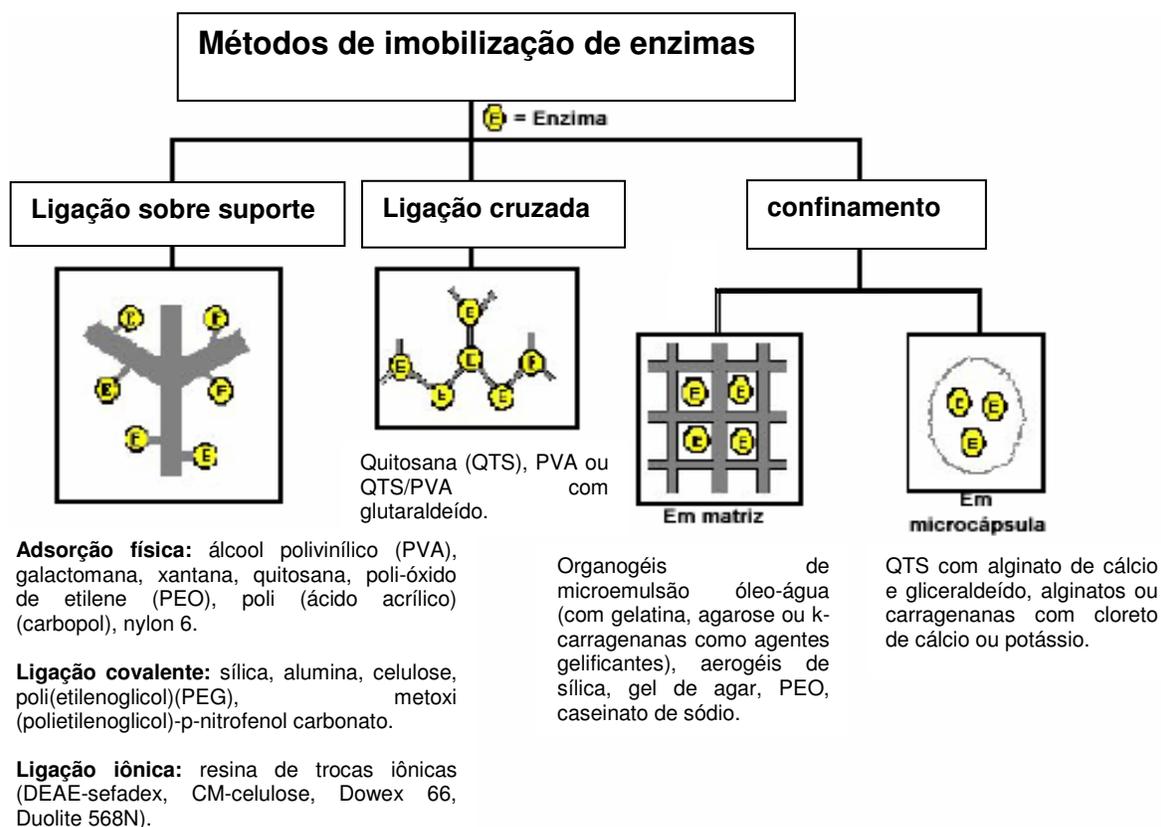


Figura 3. Principais métodos de imobilização de enzimas.

Os métodos são classificados em três categorias estabelecidas na tentativa de combinar o tipo de interação responsável pela imobilização e a natureza do suporte, são eles: (FABER, 1997; VILLENEUVE et. al., 2000)

- Método de adesão ao suporte: Consiste na fixação do biocatalisador a um suporte insolúvel em água, por adsorção física, por ligação iônica ou covalente. Os materiais utilizados como suporte podem ser orgânicos ou inorgânicos sendo que os mais comuns são a sílica, alumina, carvão ativado, e vários polissacarídeos, além de polímeros que podem ser naturais, como ágar, ou sintéticos, como o poli-óxido de etileno (PEO).
- Método de ligação covalente cruzada: As enzimas com ligações cruzadas são macromoléculas insolúveis em água produzidas pela reação de enzimas com reagentes bifuncionais, sendo o glutaraldeído o mais popular e usado. Os dois grupos aldeídicos do glutaraldeído formam bases de Schiff com resíduos de aminoácidos livres da enzima formando uma rede de ligação cruzada. Este processo é também conhecido como reticulação.
- Método de imobilização por aprisionamento ou oclusão: Baseia-se fundamentalmente na retenção de enzimas no interior de uma matriz polimérica de modo a impedir a sua liberação para o meio, permitindo apenas difusão do substrato e produtos. Neste método, nenhuma reação ocorre sendo um processo de retenção física da enzima. Este procedimento tem a vantagem de que o biocatalisador não é submetido a uma modificação estrutural, e é protegido por substâncias de alto peso molecular.

A **Figura 4, p. 15**, mostra a classificação do método de aprisionamento ou oclusão de enzimas.

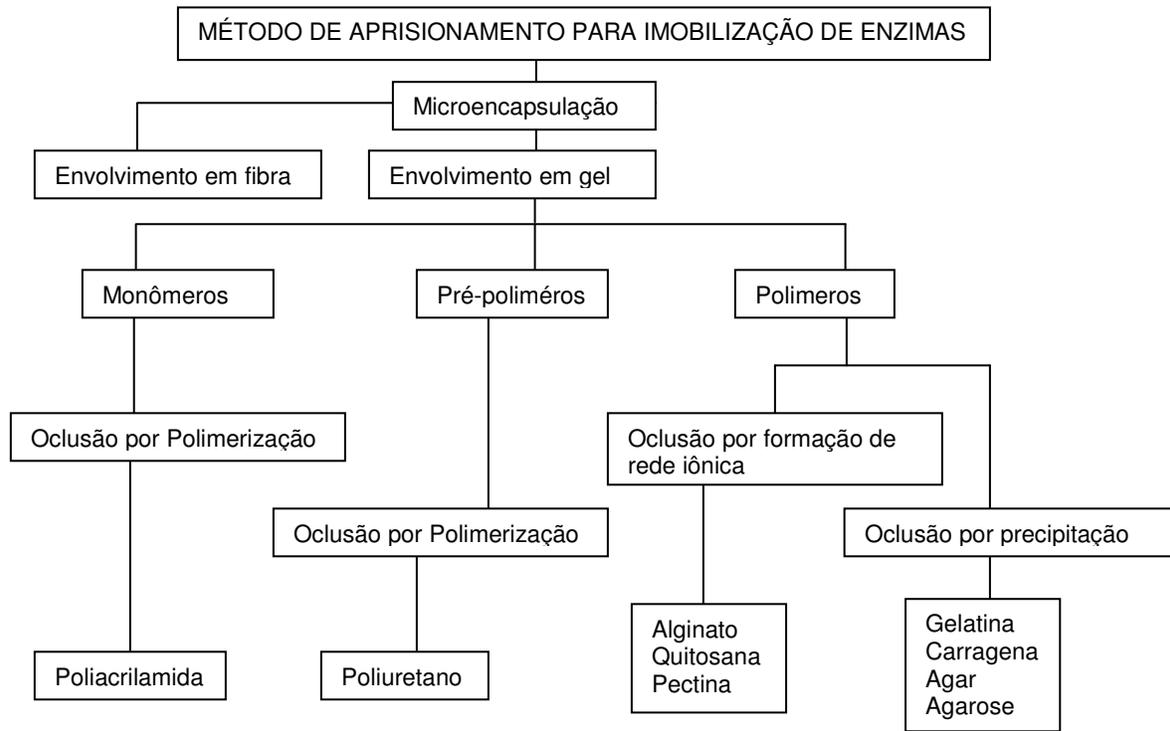


Figura 4. Tipos de suportes utilizados na imobilização das enzimas por envolvimento ou oclusão.

Capítulo 4



PARTE EXPERIMENTAL

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

As amostras dos frutos da espécie *Cocos nucifera* foram adquiridas, no Icaraí (Caucaia), no estado do Ceará, Brasil, em Fevereiro, 2007. Os dois tipos foram autenticados pelo Professor Edson P. Nunes, e as espécimes, cuja excicata tem números **#35458** e **#35459**, respectivamente, estão depositados no Herbário Prisco Bezerra (EAC) no Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.2. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

4.2.1. Cromatografia Líquida gravitacional em Coluna Aberta (CC)

As cromatografias de adsorção em coluna foram feitas utilizando gel de sílica 60 da Merck (ϕ μ m 63-200) Art. 7734. O tamanho das colunas (comprimento e diâmetro) variou de acordo com a quantidade de amostra a ser submetida à cromatografia e adsorvente empregado.

4.2.2. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As cromatografias de adsorção em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando-se sílica gel 60 (Φ = 0,004-0,005 mm) código 1094 da marca VETEC, em placas de vidro na dimensão de 10 x 5 cm com uma das faces revestida por uma camada de 0,5 mm de espessura. Também foram utilizadas cromatoplasmas de gel de sílica 60 (Φ = 2-25 μ m) sobre poliéster T-6145 da SIGMA CHEMICAL CO, com camada de 250 μ m de espessura e dimensões de 20 x 20 cm.

As revelações das substâncias nas cromatoplasmas analíticas foram realizadas, através da exposição destas, a irradiação ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda 254 e 366 nm, emitidos por lâmpada modelo UVSL-25 da Mineral Light e/ou pela borrifação com solução de vanilina ($C_8H_8O_3$) 5g/100 mL da solução de ácido perclórico ($HClO_4$) 0,75 M/100 mL de EtOH (C_2H_6O), seguida de aquecimento em estufa (\approx 150 °C), por aproximadamente 3 minutos, ou ainda pela exposição a vapores de iodo.

4.2.3. Cromatografia Líquida em Coluna sob Pressão (Flash)

Para cromatografias de adsorção em coluna flash utilizou sílica gel 60 (0,040 – 0,063 mm; 230 – 400 mesh) da MERCK. O diâmetro e o comprimento das colunas variaram de acordo com as quantidades de amostras a serem cromatografadas e adsorventes empregados. Utilizou-se para fazer a eluição sob pressão, um sistema adaptado com bomba compressora modelo ST da NS - Indústria de Aparelhos Médicos LTDA.

4.2.4. Cromatografia por Exclusão Molecular (Shephadex)

Foi utilizada na cromatografia por exclusão molecular gel de dextrana Shephadex LH-20 da PHARMACIA e metanol como eluente.

4.3. MÉTODOS FÍSICOS DE ANÁLISES

Os dados espectrais deste trabalho foram obtidos nos equipamentos da Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

4.3.1. Ponto de fusão (pf)

Os pontos de fusão foram obtidos em equipamento de microdeterminação digital da METTLER TOLEDO, provido de uma estação de aquecimento FP82HT e uma central de processamento FP90. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 2 °C/min.

4.3.2. Espectrometria de massa (EM)

Os espectros de massas do óleo essencial, ésteres metílicos e produtos de biocatálise foram obtidos no espectrômetro de massa Hewlett-Packard, modelo HP-5971 A, acoplado a cromatógrafo gás-líquido, modelo HP-5890 A, série II (CGL/EM), provido de coluna capilar de metil-fenil silicone (25,0 m x 0,20 mm x 0,25 μ m) utilizando hélio a 1,0 mL/min como gás carreador no modo split, operando com gradientes de temperatura que variavam dependendo da natureza química dos compostos analisados. Para os compostos de baixa Massa Molecular utilizou-se um gradiente de 10°C/min (40-180°C) e de 40°C/min (180-300°C) e para os de Massa Molecular mais elevada um gradiente de 10°C/min (100-180°C) e de 40°C/min (180-300°C), com a temperatura de injetor de 250°C e detector de 280°C.

4.3.2.1. Cromatografia Gasosa acoplada a Detector de Ionização de Chama (CG-DIC)

A determinação dos excessos enantioméricos (ee) foi obtida com um cromatógrafo gasoso da THERMO ELECTRON modelo Trace GC Ultra equipado com uma coluna capilar quiral da Varian Chirasil-Dex CB (β -ciclodextrina, 25,0 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), utilizando hélio como gás carreador com fluxo de 1,0 mL/min no modo split. Foram utilizados dois programas de temperatura: 2°C/min (100-180°C) e 2°C/min (130-160°C). A temperatura do injetor e detector foi 220°C.

4.3.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de Próton (RMN ^1H) e carbono-13 (RMN ^{13}C), uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelos DRX-300 e DPX-500, operando na frequência de 300 e 500 MHz para próton e para carbono-13 75 e 125 MHz, respectivamente.

Os solventes deuterados utilizados na dissolução das amostras e obtenção dos espectros foram: clorofórmio (CDCl_3), acetona [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$], metanol (CD_3OD), e piridina ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$). As multiplicidades das absorções foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), d (dubleto), dd (duplo dubleto), t (tripleto), ddd (duplo dubleto dubleto) hep (hepteto) e m (multiplete).

O padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN ^{13}C foi determinado através da utilização da técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), com ângulo de nutação de 135° , CH e CH_3 com amplitude em oposição ao CH_2 . Os carbonos não-hidrogenados foram caracterizados pela subtração dos sinais do espectro BB (Broad Band) e DEPT e segundo convenção, a terminologia metílico, metilênico e metínico, foi aplicada para os grupos CH_3 , CH_2 e CH, respectivamente.

4.3.4. Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

O aparelho utilizado para a obtenção dos espectros de absorção na região do infravermelho, foi o espectrômetro Perkin-Elmer, modelo 1000-FT. Os espectros foram feitos em pastilhas de brometo de potássio (KBr) e na forma de filmes em pastilhas de NaCl.

4.3.5. Rotação óptica (α)

A determinação da rotação óptica foi realizada em um Polarímetro 341 da Perkin-Elmer, à temperatura de 25°C, usando a concentração de 1 mg da amostra para 2 mL de solvente.

4.4. CONSTITUINTES ENCONTRADOS NA ÁGUA-DE-COCO POR HIDRODESTILAÇÃO E EXTRAÇÃO COM SOLVENTE ORGÂNICO

4.4.1. Extração do Óleo Essencial da água de *Cocos nucifera* por hidrodestilação

Os óleos essenciais da água-de-coco do tipo verde e amarelo de *cocos nucifera*, foram extraídos pelo processo de hidrodestilação, em aparelho doseador do tipo Clevenger, **Figura 5** (p. 22).

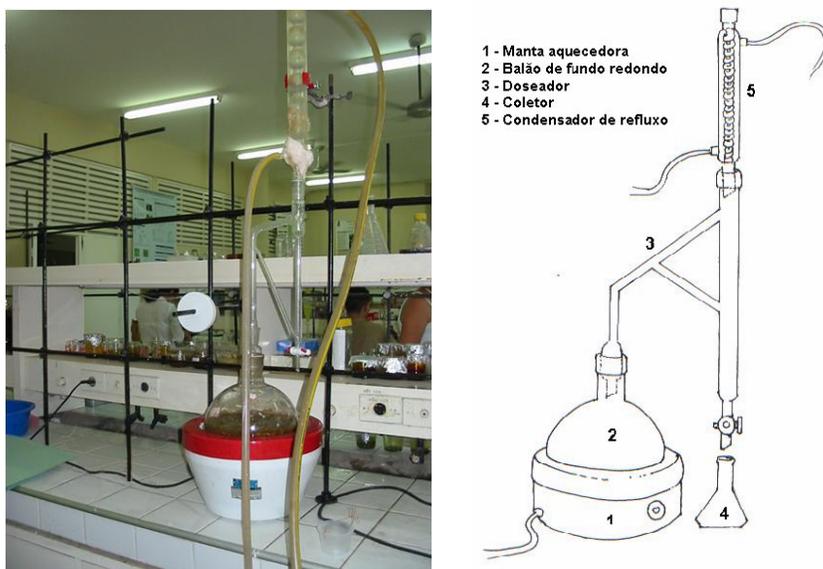


Figura 5. Aparelho usado para extração do óleo essencial por hidrodestilação.

Cerca de 2L de água-de-coco fresca do tipo verde foi colocado em balão de destilação de 5 L. O sistema foi aquecido por 3 horas, em aparelho doseador tipo Cleavenger modificado por Gottlieb (GOTTLIEB E MAGALHÃES, 1960). O óleo obtido foi seco com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrado e pesado, obtendo uma massa de 32 mg com um rendimento de 0,05%. O mesmo procedimento foi realizado com água-de-coco do tipo amarela obtendo uma massa de óleo de 45 mg com rendimento de 0,02%. O óleo obtido de ambos os tipos foi armazenado em fracos de vidro, selados e mantidos sob refrigeração para posteriores análises e testes. Estes procedimentos estão esquematizados no **Fluxograma 1 (p. 25)**, com todas as etapas.

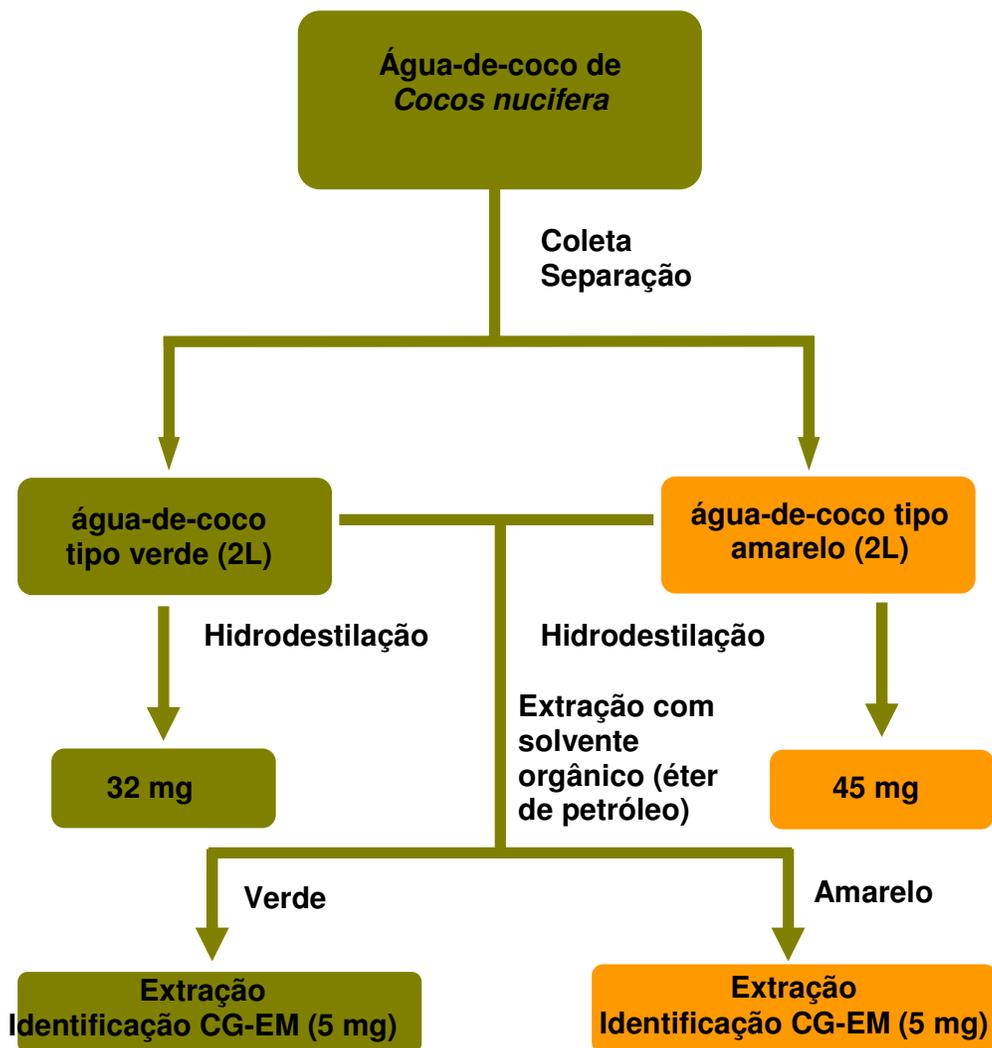
A análise da composição química dos óleos foi realizada em cromatógrafo gás-líquido, acoplado a espectrômetro de massas. A identificação foi feita por pesquisa em banco de espectros de padrões e também por comparação com espectros da literatura (ALENCAR et al, 1990; ADAMS, 2001). Os cromatogramas, os espectros de massas e os constituintes de cada óleo estão descritos nos **Resultados e discussões** no **capítulo 5**, nas **Figuras 6a/6b (Cromatogramas, p. 39)**, **Tabela 5 (p. 42)**, espectro de massas dos constituintes (**Fig. 8-33, p. 44-52**). As condições dos equipamentos estão descritos no **item 4.3.2 (p. 20)**.

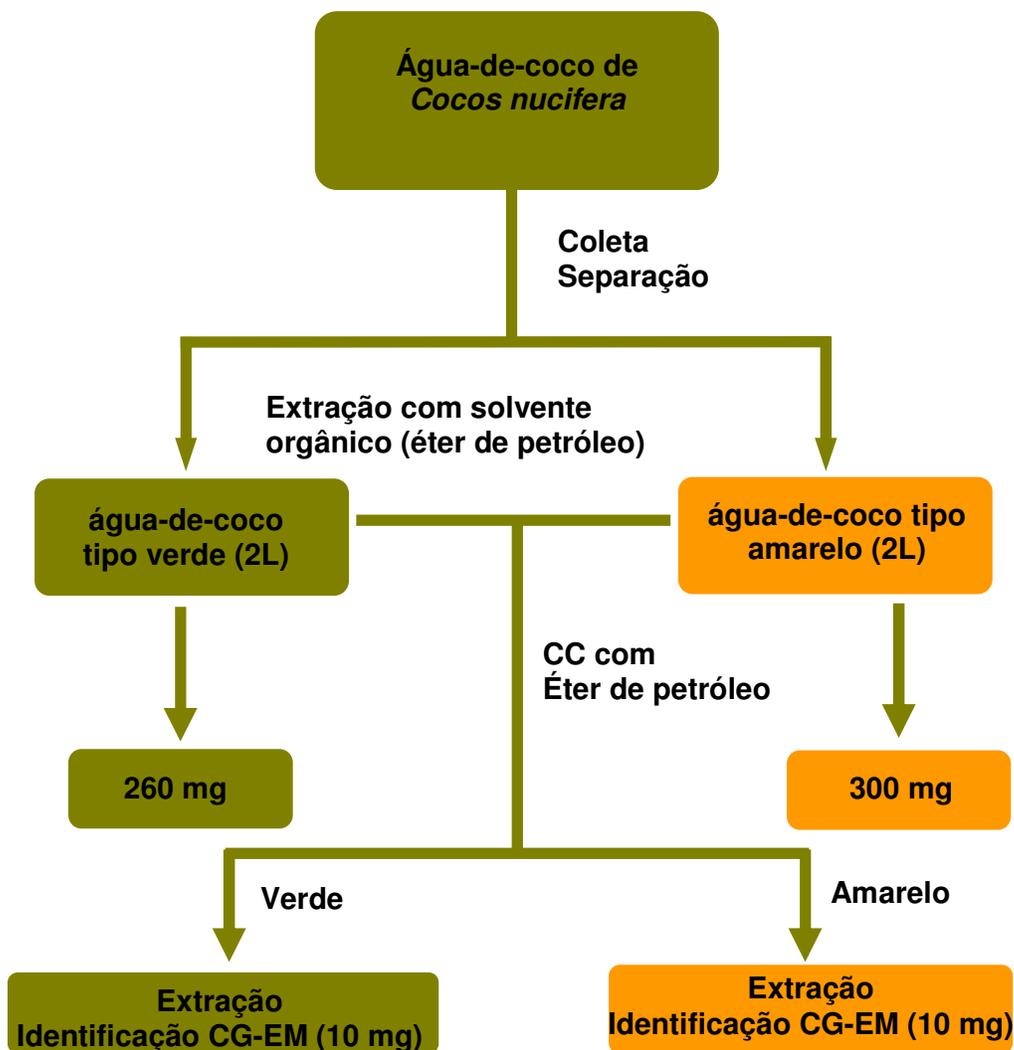
4.4.2. Extração dos constituintes apolares da água de *Cocos nucifera* por solvente orgânico

Os voláteis da água-de-coco do tipo verde e do tipo amarelo de *Cocos nucifera*, foram extraídos por solvente orgânico usando éter de petróleo.

Adicionou-se a um balão de 5 L, 2L de água-de-coco fresca do tipo verde e em outro balão do tipo amarelo. Ambas as águas foram extraídas com porções de éter de petróleo (4x250mL). Após a separação das duas fases, a fase orgânica foi filtrada, concentrada sob vácuo e seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) fornecendo 260 mg para o tipo verde e 300 mg para o tipo amarelo. Esses materiais foram ainda submetidos a cromatografia de adsorção com sílica gel, utilizando também éter de petróleo como solvente. Posteriormente, as quantidades obtidas foram 30 mg e 56 mg para os tipos verde e amarelo, respectivamente. Esses materiais fornecidos foram armazenados em frascos de vidro, vedados e mantidos refrigerados para posteriores análises em CG-EM e testes antioxidantes e os cromatogramas, espectros de massas e os constituintes de cada óleo estão descritos nos **Resultados e discussões** no **capítulo 5**, nas **Figuras 7a/7b (Cromatogramas, p. 41)**, **Tabela 5 (p. 42)**, espectro de massas dos constituintes (**Fig. 8-33, p. 44-52**). As condições dos equipamentos estão descritos no **item 4.3.2 (Pág. 20)**.

Estes procedimentos estão esquematizados no **Fluxograma 2 (p. 26)**, com todas as etapas.

Fluxograma 1: Parte experimental para obtenção dos voláteis de *Cocos nucifera*

Fluxograma 2: Parte experimental para obtenção dos voláteis de *Cocos nucifera*

4.5. METODOLOGIA DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.5.1. Atividade Antioxidante dos voláteis obtidos de *Cocos nucifera* por hidrodestilação e extração com solvente orgânico usando éter de petróleo: Método de Seqüestro do Radical DPPH

A metodologia utilizada no teste de atividade antioxidante é o de seqüestro de radicais livres, semelhantes à descrita por HEGAZI e HADY (2003) e adaptada por (BANDEIRA et. al. 2006; BURITS et. al., 2000). Onde o radical utilizado foi DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) na concentração de 60 mM. Numa cubeta de 3 mL foi colocado 1000 µL de DPPH e em seguida adicionou 1000 µL de EtOH, para assim realizar a leitura pelo UV, cuja comprimento de onda utilizado foi de 520 nm, obtendo a leitura da absorbância "X".

Foram preparadas quatro concentrações de cada amostra (1,0; 0,5; 0,25 e 0,125 µg / µL), onde foram colocadas 1000 µL das amostras e adicionado 1000 µL do DPPH na cubeta e levadas para o UV, para realizar a leitura "Y". O declínio da concentração é registrado como declínio na absorbância em $\lambda_{\text{máx}}$ 520 nm por um período de 30 minutos. A absorbância foi então medida a 520 nm usando um espectrofotômetro e a inibição de DPPH radical livre em porcentagem (I%) foi calculada usando a fórmula abaixo; onde A_{blank} é o absorbância da reação de controle (contendo todos os reagente com exceção os compostos a serem testados), e A_{sample} é a absorbância da composto testado. A concentração dos compostos demonstraram 50% inibição (IC_{50}) onde foram calculados por plotagem de porcentagem de inibição contra concentração de amostra. Os testes foram feitos em triplicata (TEPE et. al., 2005). As amostras 1, 1' (hidrodestilação e extração com solvente do tipo verde, respectivamente), 2, 2' (hidrodestilação e extração com solvente do tipo amarelo, respectivamente) foram dissolvidas com DPPH em etanol. Trolox e BHT foram usados como amostras de controle positivos.

$$I\% = \left[1 - \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}}\right] \cdot 100$$

Os resultados estão sumarizados na **Tabela 6, p. 43**.

Os procedimentos experimentais utilizados para desenvolver as atividades realizadas com os óleos essenciais da água-de-coco (*Cocos nucifera*) estão resumidos no **Fluxogramas 1 e 2 (p. 25-26)**.

4.5.1.1. Análise Estatística

Os resultados foram expressos com significância \pm S.E.M. One-Way análise de variância (ANOVA). No ensaio de atividade antioxidante, o teste one-way ANOVA foi usado através do teste de Tukey ($P < 0.001$).

4.6. OBTENÇÃO DOS CONSTITUINTES FIXOS DA ALBÚMEN SÓLIDO FRESCO (CARNE MACIA) DO COCO (*Cocos nucifera* L) DO TIPO VERDE E AMARELO EM TRÊS FASES DE MATURIDADE (VERDE, MADURO E SECO)

4.6.1. Extração do óleo fixo no Albúmen do coco sólido (fruto) nas três fases de maturidade por solvente orgânico

Os óleos fixos do albúmen de coco do tipo verde e amarelo de *cocos nucifera*, das três fases de maturidade (verde, maduro e seco) foram extraídos por solvente orgânico usando hexano.

4.6.2. Obtenção do Material

Os albúmens dos cocos em três diferentes fases de maturação: verde, maduro, e seco dos tipos verde e do tipo amarelo foram obtidos em mercado onde foram removidos e depois adicionou-se hexano como solvente orgânico para a obtenção de extrato (**Fluxograma 3, p. 32**).

4.6.3. Extração do óleo fixo no Albúmen de coco sólido nas três fases de maturidade

O albúmen (200,0 g) em cada fase: verde (**1**), maduro (**2**), e seco (**3**) das duas espécies: verde (**G**) e amarelo (**Y**), foram extraídos com hexano (250mL) por dois dias, que após evaporação sob vácuo foram fornecidos um total de seis extratos onde seus respectivos pesos em (g) e rendimentos em (%) estão presentes na **Tabela 2 (p. 30)**.

Tabela 2. Rendimento do material (g) e (%) após extração com hexano.

Tipos		maturidade					
		verde		maduro		seco	
		1	%	2	%	3	%
Albúmen do coco verde	G	2,0	1,0	3,9	2,0	7,0	2,2
Albúmen do coco amarelo	Y	0,8	0,4	2,7	1,4	5,0	1,6

4.6.4. Saponificação/Metilação do extrato hexânico

De cada extrato de hexânico obtido, foi submetido ao processo de saponificação seguindo a seguinte metodologia: 2,0 g (**1G**, **2G**, **3G**, **1Y**, **2Y**, e **3Y**), separadamente, foi colocado em balão, juntamente com quantias iguais de NaOH em 15,0 mL e MeOH. A mistura reacional foi mantida por duas horas sob refluxo. Após este período evaporou-se em rotaevaporador e o produto reacional foi acidificado com HCl (50%) até obter pH 5. A solução aquosa acidificada foi então extraída com três porções de 20 mL de clorofórmio (3x20mL com CHCl₃). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e evaporado à vácuo. Os rendimentos obtidos estão apresentados em (g) na **Tabela 3 (p. 30)**.

Tabela 3. Rendimento dos saponificáveis (g) após reação de saponificação

tipo		maturidade		
		verde	maduro	seco
		1	2	3
verde	G	2,4	4,3	5,2
amarelo	Y	2,1	3,8	5,4

4.6.5. Obtenção dos ésteres metílicos.

Cerca de 1,0g do material nas três fases (**S1G**, **S1Y**, **S2G**, **S2Y**, **S3G**, e **S3Y**) do saponificável foram adicionados separadamente cada, em balão e a este material adicionou-se 2mL de HCl concentrado e 10 mL de metanol (MeOH). A mistura reacional foi submetida a refluxo por 1,5h.

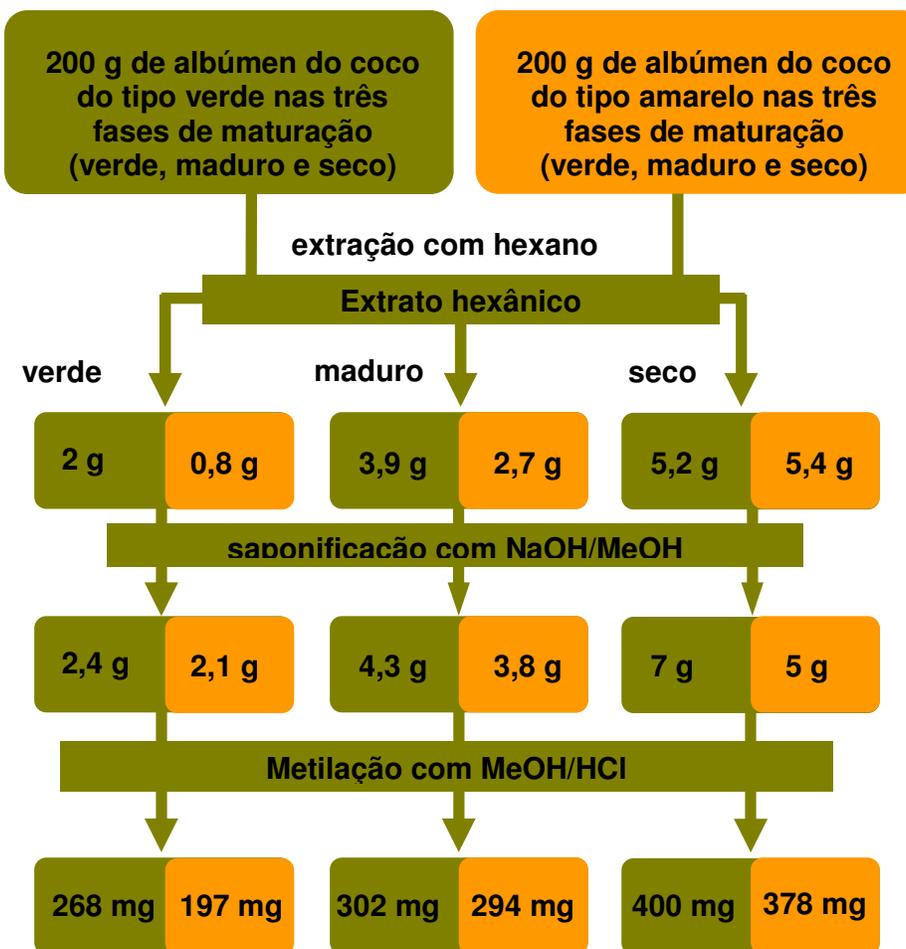
Após este período concentrou-se o metanol sob vácuo e o produto reacional foi extraído com três porções de clorofórmio (3x10mL com CHCl₃), e secado com Na₂SO₄ anidro e novamente evaporado sob vácuo. O material fornecido foi cromatografado em gel de sílica, usando a mistura binária hexano:clorofórmio (9:1) como eluente, onde se obteve de ésteres metílicos através de monitoramento em CCD (cromatografia em camada delgada). O material foi então seco para se obter o metilado, onde os resultados em (g) estão em **Tabela 4, p. 31**. Os éteres metílicos foram analisados por CG/EM além de comparação subsequente com dados da literatura (ADAMS 2001; STENHAGEN et. al., 1974). As condições dos equipamentos estão descritos no **item 4.3.2 (p. 20)** e os espectros de massas dos constituintes estão presentes nas **Figuras 34-49, p. 56-61**.

Todos os processos para a obtenção dos ésteres metílicos estão esquematizados no **Fluxograma 3 (p. 32)**.

Tabela 4. Rendimento da reação (mg) de metilação.

tipo		maturidade		
		verde	maduro	seco
		1	2	3
verde	G	268	302	400
amarelo	Y	197	294	378

Fluxograma 3: Parte experimental para obtenção dos éteres metílicos do albúmen de *Cocos nucifera*



4.7. Bioredução dos compostos 1-17, 22, hidrólise de 19-22, e dimerização do 18.

4.7.1. Extração e isolamento de 1'-22'

A água-de-coco de *Cocos nucifera* foi filtrada (papel de filtro: WHATMAN, 47 mm) para a eliminação de resíduos. Em experiências separadas, substratos **1-22** (200 mg) foram acrescentados à água-de-coco fresca (300 mL). As misturas foram incubadas em um shaker (160 rpm) à temperatura ambiente durante 72 horas, e o processo de reação foi monitorado por CCD. Cada suspensão individual foi filtrada, e o resíduo foi lavado com água. As soluções aquosas foram então extraídas com AcOEt (3 x 100 mL), e as fases orgânicas foram secas com Na₂SO₄ anidro e evaporadas sob vácuo. Os resíduos foram filtrados em uma coluna de gel de sílica curta, usando AcOEt:Hexano (2:8) como eluente, dispondo então os produtos reduzidos, com os rendimentos: **1'** (133 mg), **2'** (120 mg), **3'** (171 mg), **4'** (101 mg), **5'** (99 mg), **6'a** (87 mg), **6'b** (41 mg), **7'a** (107 mg), **7'b** (21 mg), **8'** (64 mg), **9'** (95 mg), **10'** (142 mg), **11'** (134 mg), **12'** (80 mg), **13'** (61 mg), **14'** (59 mg), **15'** (117 mg), **16'a** (58 mg), **16'b** (32.40 mg), **17'** (103 mg), **18'** (127 mg), **19'** (100 mg), **20'** (81 mg), e **22'** (152 mg). O resíduo do substrato **21** foi submetido a uma cromatografia de coluna em Sephadex LH-20 usando MeOH como eluente originando 15 frações que depois de análise de CCD, com o rendimento de **21'a** (79 mg) e **21'b** (43 mg), respectivamente. Os rendimentos de todas as reações foram quantificados por GC-MS, e são mostrados na **Tabela 8 (p. 67)** e **Esquemas 1 e 2 (p. 69-70)**.

4.7.2. Experimentos dos Dados espectroscópicos

Os produtos foram analisados em comparação por CG-EM e dados espectrais de RMN H^1 com valores da literatura (POUCHERT, 1981; POUCHERT e BEHNKE, 1993; LEE et. al., 1996), presentes nas **Tabelas 8-9 (p. 67-68)**. S-(-)-1-fenil-etanol **1'**, S-(-)-3-metoxi-fenil-etanol **2'**, álcool benzílico **3'**, álcool 3-metoxibenzílico **4'**, álcool 4-metoxi-benzílico **5'**, álcool vanílico **6'a**, metil vanil éter **6'b**, álcool cinâmico **7'a**, álcool 3-fenilpropílico **7'b**, álcool 2-metil-3-fenil alílico **8'**, álcool furfurílico **9'**, geraniol **10'**, S-(+)-butan-2-ol acetilado **11'acil**, ácido butírico **12'**, butirato de 3-S-(+)-hidroxi-etila **13'**, S-(-)-carveol **14'**, R-(+)-pulegol **15'**, ciclohexanol **16'a**, ciclohexanona-2,3-butileno cetal **16'b**, ciclopentanol **17'**, diazeno difenil-1-óxido **18'**, anilina **19'**, 4-hidroxi-anilina **20'**, 4-nitro-anilina **21'a**, 4-amino-acetanilida **21'b**, e ácido benzóico **22'** foram caracterizados completamente de acordo com seus dados espectrais.

4.8. Análise da quinina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE

4.8.1 Preparação da curva padrão da quinina

Para a determinação da curva de calibração da quinina, foi preparada uma solução estoque metanólica do padrão quinina na concentração de 250 ppm. A partir desta solução estoque foram preparadas soluções nas concentrações de 50, 40, 30, 20 e 10 ppm.

4.8.2 Análise das amostras

A análise foi feita na Universidade Federal do Ceará (UFC) no Laboratório de Biotransformação de Produtos Naturais pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) num aparelho da SHIMADZU.

Condições programadas no aparelho:

1. Coluna: OOG-4252-EO LUNA C-18 250 X 4,60mm e 5 μ de diâmetro
2. Fase móvel: Metanol:Acetonitrila (9:1)
3. Detector: UV
4. Comprimento de Onda : 254 nm
5. Fluxo: 1mL/min
6. Loop: 20 μ L
7. Tempo de corrida: 15 minutos

Foram injetadas nestas mesmas condições a curva de calibração da quinina, já a mistura reacional da quinina benzilada e acetilada com o fluxo de 1mL/min. Os resultados obtidos foram analisados no programa Origin 7.0, onde foi feita uma regressão linear área x concentração com os dados da curva de calibração e encontrada a equação da reta para avaliar a concentração da quinina nas demais amostras. As curvas estão presentes nos **Gráficos 1 e 2 (p. 157-158)**.

4.8.3. Determinação do Teor de Proteínas da água-de-coco

O processo de determinação de proteína utilizado foi a metodologia de Lowry modificada por Hartree (HARTREE, 1972).

Método de Lowry

Para a realização da determinação de proteínas na água-de-coco, segundo Hartree foi necessário o preparo dos seguintes reagentes:

- Solução A: 50,0 g de Na_2CO_3 dissolvido em 250,0 mL de NaOH 1,0 M, seguida da adição de 1,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio e dissolução em 500,0 mL de água destilada.

- Solução B: 1,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio e 0,5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dissolvido em 45,0 mL de água, seguido da adição de 5,0 mL de NaOH 1,0 M.

- Solução C: 0,5 mL do reagente de Folin-Cicateau (molibdato, tungstato e ácido fosfórico) 2,0 M diluído em 7,5 mL de água. Esta solução deve ser preparada diariamente e sua concentração deve estar entre 0,15 e 0,18 M.

O procedimento ocorreu da seguinte maneira: 0,1 mL da água-de-coco foi diluída para 50 mL utilizando água destilada. A 1,0 mL desta solução amostra foi adicionada 0,9 mL do reagente A, seguido do aquecimento a 50 °C por 10 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, foi adicionado 0,1 mL do reagente B e deixado à temperatura ambiente por 10 minutos. Então, adiciona-se 3,0 mL do reagente C seguida de agitação, que logo após é posto outra vez em “banho Maria” a 50 °C por mais 10 minutos, refria-se à temperatura ambiente e realiza-se a leitura em 650 nm. Uma curva de calibração com soro albumina bovina (BSA) como padrão foi utilizada nas medidas.

O procedimento foi realizado em triplicata, tendo como controle em branco, um tubo de ensaio contendo apenas água destilada. Como resultado

detectou-se a presença de 1,2% de proteínas presentes na água-de-coco, que está de acordo com a literatura (DUARTE, et al. 2002).

4.8.4. Imobilização das Enzimas da água-de-coco

Para o processo de imobilização das enzimas da água-de-coco, foi adotado o procedimento adaptado da metodologia de Kalogeris (KALOGERIS et al., 2006). Foram utilizados a 300,0 mL da água 3,0 g de alginato de sódio, que por sua vez foi submetido a processo de agitação constante à temperatura ambiente por 2 horas até a completa miscibilidade dos materiais.

A solução resultante foi então adicionada em 400,0 mL de solução de CaCl_2 5 %, utilizando uma seringa. Após o fim do gotejamento da mistura caldo de água-de-coco/alginato, esta foi deixada em repouso à temperatura ambiente por 20 horas.

Ao fim deste período, a solução contendo as esferas foi submetida à filtração, e obtiveram-se então as enzimas imobilizadas, conforme mostra a **Figura 109 (p. 138)**. Após filtrações, seguiu-se o processo de lavagem das esferas com água destilada. Terminadas as lavagens as esferas foram deixadas à secura a temperatura de 32°C por dois dias, e apresentaram o aspecto conforme mostra a **Figura 110 (p. 139)**. Ao fim do processo as enzimas imobilizadas foram pesadas e apresentaram um total de 5,0 g.

As enzimas imobilizadas da água-de-coco do Ceará (EIACC), também foi fotografada por Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV) utilizando metalização em ouro, para determinação do diâmetro de suas partículas. A morfologia da amostra foi analisada por aumentos de 65X (**Fig. 111, p. 139**), 200X (**Fig. 112, p. 140**) e 250X (**Fig. 113, p. 140**) e o diâmetro das partículas estimado em 756 μm .

Capítulo 5



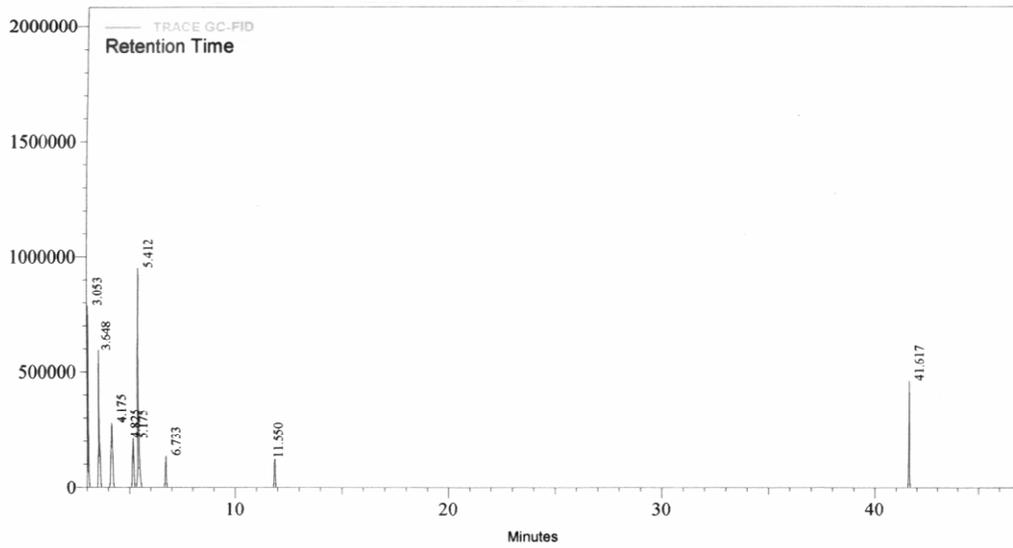
RESULTADOS **E**
DISCUSSÕES

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

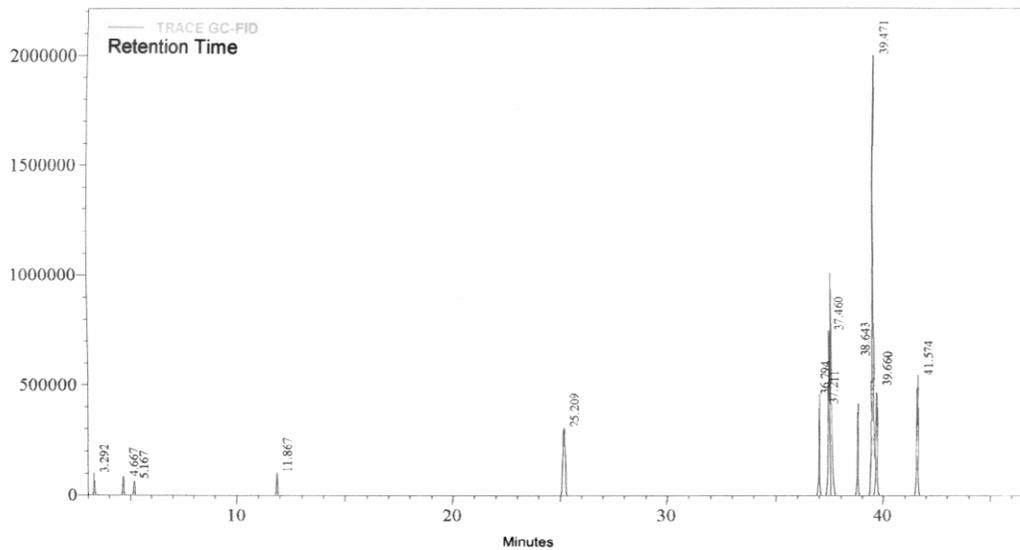
5.1. Análise e identificação dos constituintes dos óleos essenciais

Os constituintes voláteis da água-de-coco do tipo verde e amarelo foram analisados por CG-EM (cromatografia gás-líquido acoplada a espectrometria de massas) onde as condições dos equipamentos estão descritos no **item 4.3.2 (p. 20)** e a identificação foi realizada por pesquisas em biblioteca de padrões, comparação dos índices de Kovats e por comparação de espectros de massas registrados na literatura (Adams, 2001). Os percentuais de cada constituinte além do índice de Kovats experimental estão relacionados na **Tabela 5, p. 42**.

Os cromatogramas de CG-FID obtidos dos óleos essenciais da água-de-coco do tipo verde e amarelo estão mostrados, respectivamente, nas **Figuras 6a/6b, p. 39** e os espectros de massas dos constituintes identificadas nos dois tipos de coco são mostrados



(6a)



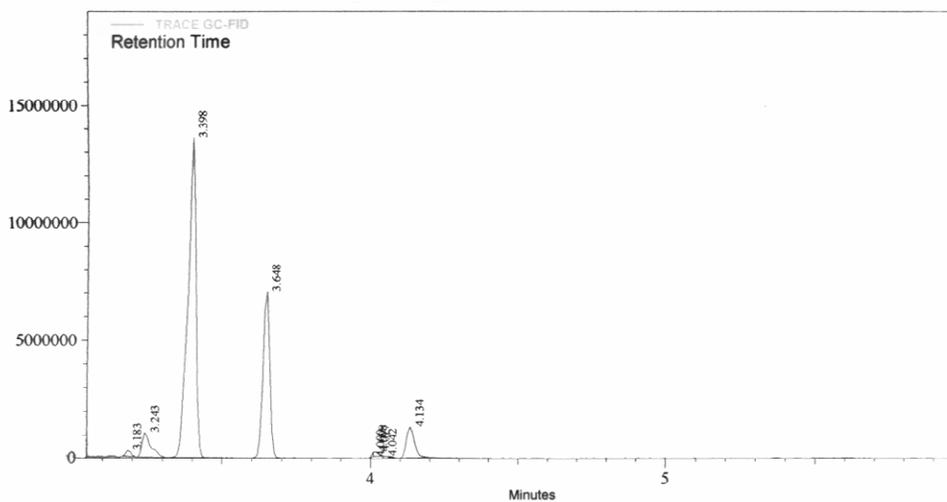
(6b)

Figura 6. Cromatograma CG-FID padrão da água-de-coco do tipo verde (6a) e do tipo amarelo (6b) pelo processo de hidrodestilação.

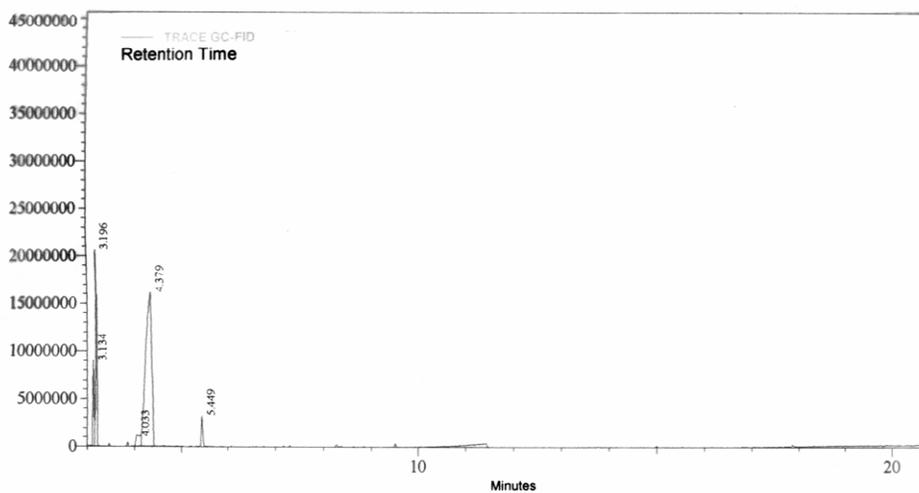
5.2. Análise e identificação dos constituintes dos voláteis

Os constituintes voláteis da água-de-coco do tipo verde e do tipo amarelo por extração de solvente orgânico foram analisados por CG-EM (cromatografia gás-líquido acoplada a espectrometria de massas) e CG-FID e a identificação realizada por pesquisas em biblioteca de padrões, comparação dos índices de Kovats e por comparação de espectros de massas registrados na literatura (Adams, 2001). As condições dos equipamentos estão descritos no **item 4.3.2, p. 20**. Os percentuais de cada constituinte além do índice de Kovats experimental estão relacionados na **Tabela 5, p. 42**. Os cromatogramas de CG-FID obtidos dos óleos essenciais da água-de-coco do tipo verde e amarelo estão mostrados, respectivamente, nas **Figuras 7a/7b, p. 41**.

Os espectros de massa dos constituintes identificados nos dois tipos de coco, pelos dois métodos de extração são mostrados nas **Figuras 8-33, p. 44-52**.



7a



7b

Figura 7. Cromatograma CG-FID padrão da água-de-coco do tipo verde (7a) e do tipo amarelo (7b) pelo processo de extração com solvente orgânico usando éter de petróleo.

Tabela 5. Constituintes obtidos por hidrodestilação na Amostra 1 (água-de-coco do tipo verde) e Amostra 2 (água-de-coco do tipo amarelo). Constituintes obtidos pelo processo de extração com solvente orgânico usando éter de petróleo na amostra 1' (água-de-coco do tipo verde) e amostra 2' (água-de-coco do tipo amarelo).

Compostos	TR	%				IR	Identificação
		Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1'	Amostra 2'		
etanoato <i>n</i> -propila	3,05	15,3		53,5	16,7	750	IR, EM, Lit
metanoato de 1-metilpropila	3,18			4,1		752	IR, EM, Lit
3-hidroxi-butan-2-ona	3,24			4,5	6,2	753	IR, EM, Lit
2-hidroxiopropanoato de metila	3,30		0,9			754	IR, EM, Lit
4-metil-pentan-2-ona	3,65	12,0		29,0		759	IR, EM, Lit
2-hidroxiopropanoato de etila	4,00			0,7		764	IR, EM, Lit
butano-1,3-diol	4,02			1,7	67,7	765	IR, EM, Lit
butano-1,2-diol	4,04			3,1	3,0	766	IR, EM, Lit
butano-2,3-diol	4,13			3,2	3,6	767	IR, EM, Lit
carbonato de etila	4,17	2,1				768	IR, EM, Lit
hexan-2-ol	4,67		1,0			774	IR, EM, Lit
etanoato de <i>n</i> -butila	4,83	2,0				776	IR, EM, Lit
furfural	5,18	14,5	0,8			781	IR, EM, Lit
4-hidroxi-4-metilpentan-2-ona	5,41	30,5				784	IR, EM, Lit
2-hidroxi-2-metilpentano	6,73	3,2				803	IR, EM, Lit
acetate de <i>p</i> -ment-8-en-1-ol	11,60	1,4				873	IR, EM, Lit
fenil acetaldeído	11,87		0,9			877	IR, EM, Lit
acetate de 4-metoxibenzila	25,21		5,3			1069	IR, EM, Lit
7,9-di- <i>ter</i> -butil-oxaspiro[4.5]deca-6,9-dien-2,8-diona	36,79		4,5			1235	IR, EM, Lit
6,9,12-octadecatrienoato de metila	37,21		4,2			1241	IR, EM, Lit
ácido <i>n</i> -hexadecanóico (ácido palmítico)	37,46		18,4			1244	IR, EM, Lit
3,6-dioxano-1,8-diol	38,64		5,0			1262	IR, EM, Lit
3-mercapto-decano	39,47		46,2			1274	IR, EM, Lit
ácido 9-octadecenóico (ácido oleico)	39,66		5,3			1276	IR, EM, Lit
9-octadecen-1-ol	41,58		6,1			1300	IR, EM, Lit
adipato de dioctila	41,62	11,2				1304	IR, EM, Lit

TR: tempo de retenção; Amostra 1 e 2: constituintes identificados por processo de hidrodestilação; Amostra 1' e 2': constituintes identificados por processo de extração de solvente orgânico; IR: índice de retenção em coluna DB-5; EM: espectro de massa; Lit: literatura. Amostra 1e 1': da água-de-coco do tipo verde; Amostra 2 e 2': da água-de-coco do tipo amarelo;

5.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A utilização de água-de-coco como bebida despertou também o interesse em realizar a atividade antioxidante pelo método de seqüestro do radical DPPH, usando como padrão positivo antioxidante as substâncias Trolox e BHT (HEGAZY et. al., 2003). A metodologia utilizada foi descrita na parte experimental (**Item 4.5.1, p. 27**) e os resultados estão na **Tabela 6, p. 43**, a seguir.

Tabela 6. O atividade do seqüestro de radical livre DPPH dos constituintes obtidos por hidrodestilação (amostras 1 e 2), e por processo de extração usando éter de petróleo (amostras 1'e 2') da água-de-coco do tipo verde e amarelo.

Amostras	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)								$\text{IC}_{50}(\mu\text{g}/\mu\text{L})$
	1,0		0,5		0,25		0,125		
	abs	%	abs	%	abs	%	abs	%	
Controle	0,2380	00,0	0,2380	00,0	0,2380	00,0	0,2380	00,0	0,0
1	0,0490	79,4	0,0557	76,6	0,0838	64,8	0,1399	41,2	0,19
2	0,0393	83,5	0,0490	79,4	0,0781	67,2	0,1607	32,5	0,24
1'	0,1630	31,5	0,1780	25,2	0,1990	16,4	0,2300	3,4	>1,0
2'	0,1550	34,9	0,1690	29,0	0,1780	27,7	0,1930	18,9	>1,0
Trolox	0,0336	85,9	0,0583	75,5	0,0616	74,1	0,0928	61,0	0,063
BHT	0,0450	81,1	0,1085	54,4	0,1126	52,7	0,1345	43,5	0,17

Amostras 1 e 2: Constituintes obtidos por hidrodestilação; Amostras 1' e 2': Extração usando éter de petróleo.

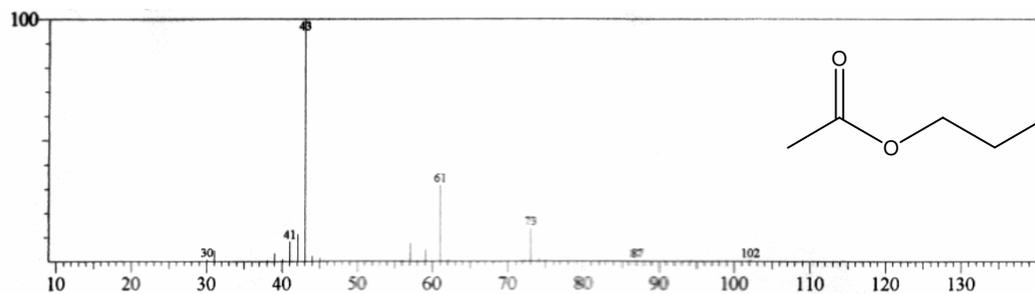


Figura 8. Espectro de massa do Etanoato de propila

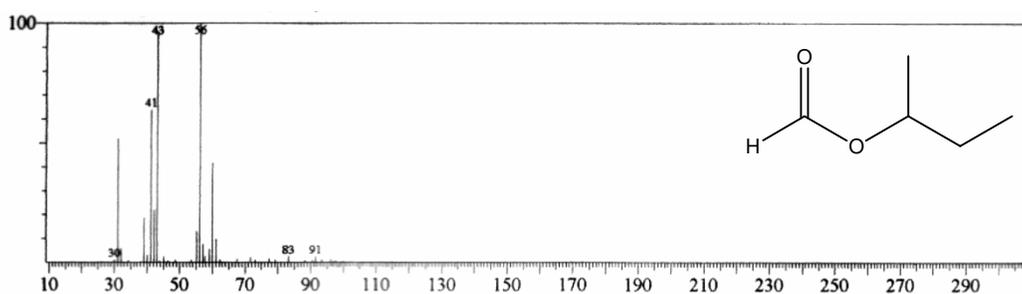


Figura 9. Espectro de massa do Metanoato de 1-metilpropila

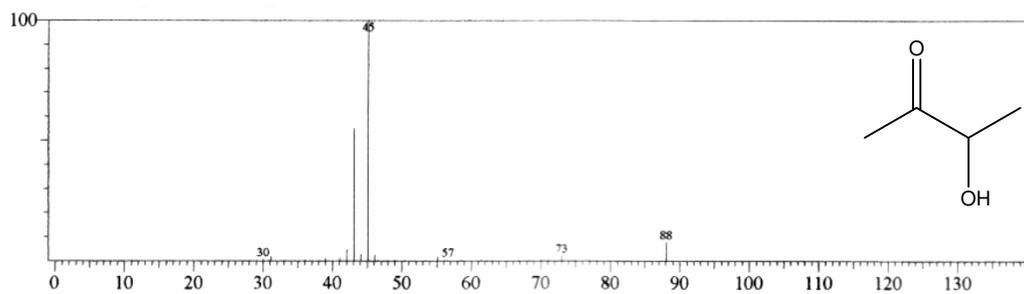


Figura 10. Espectro de massa da 3-hidroxi-butan-2-ona

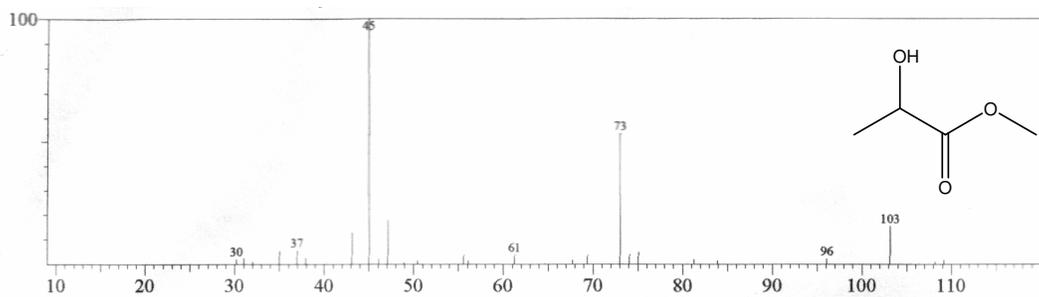


Figura 11. Espectro de massa do 2-hidroxiopropanoato de metila

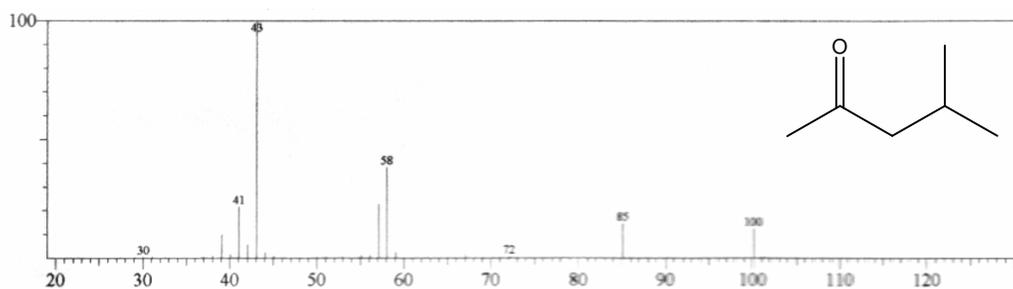


Figura 12. Espectro de massa da 4-metilpentan-2-ona

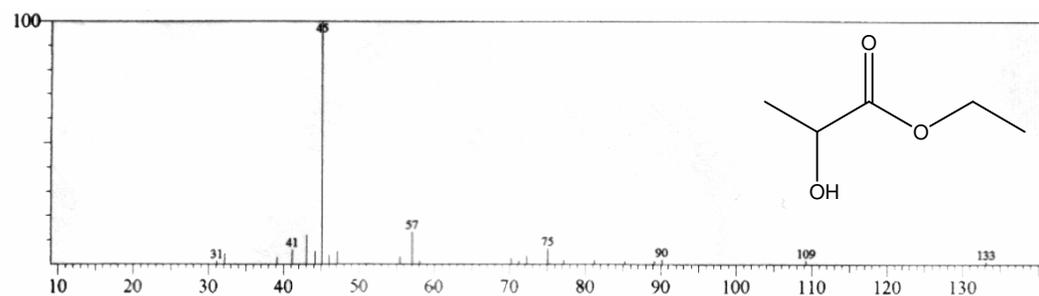


Figura 13. Espectro de massa do 2-hidroxiopropanoato de etila

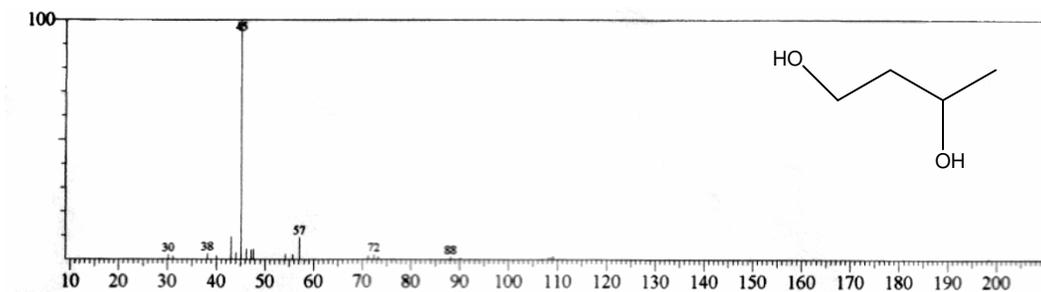


Figura 14. Espectro de massa do Butano-1,3-diol

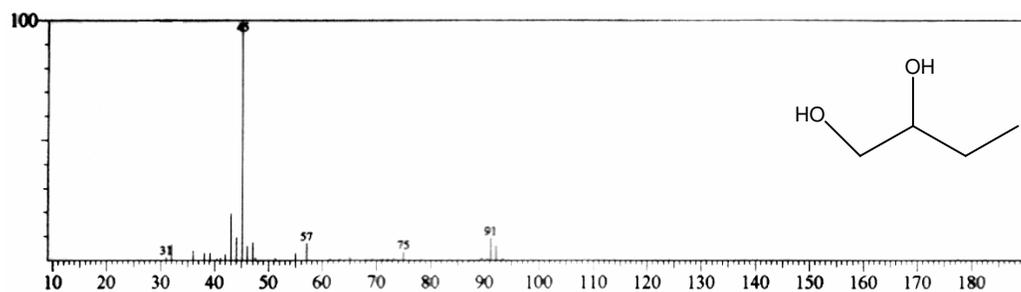


Figura 15. Espectro de massa do Butano-1,2-diol

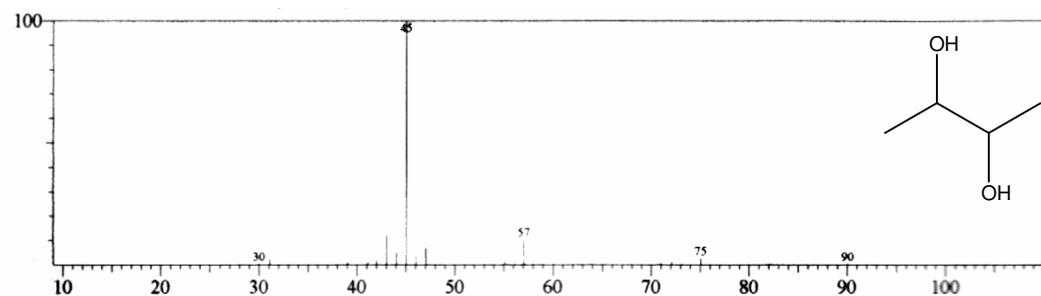


Figura 16. Espectro de massa do Butano-2,3-diol

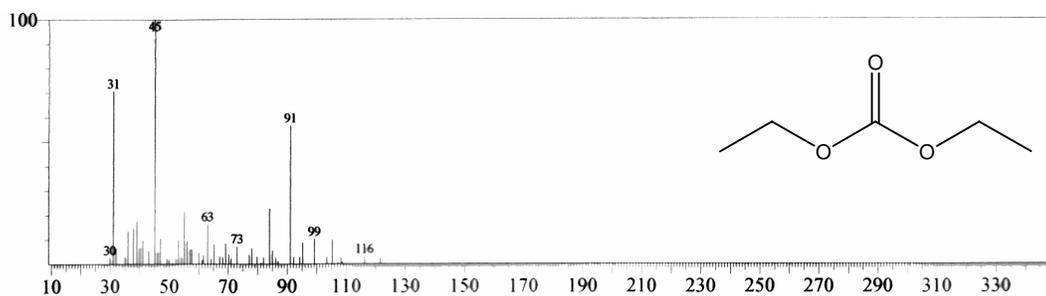


Figura 17. Espectro de massa do Carbonato de etila

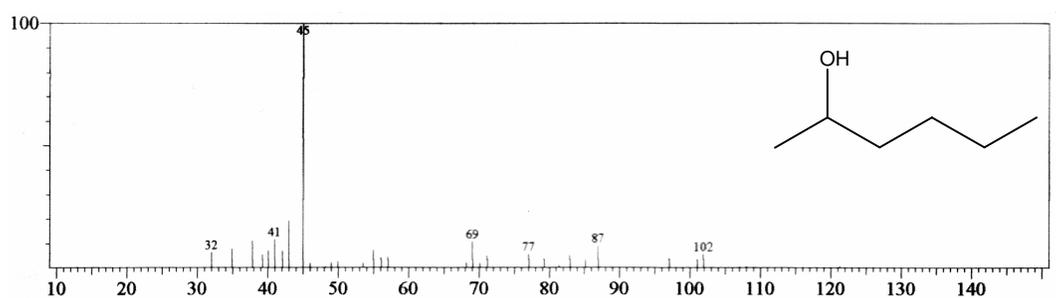


Figura 18. Espectro de massa do 2-hexanol

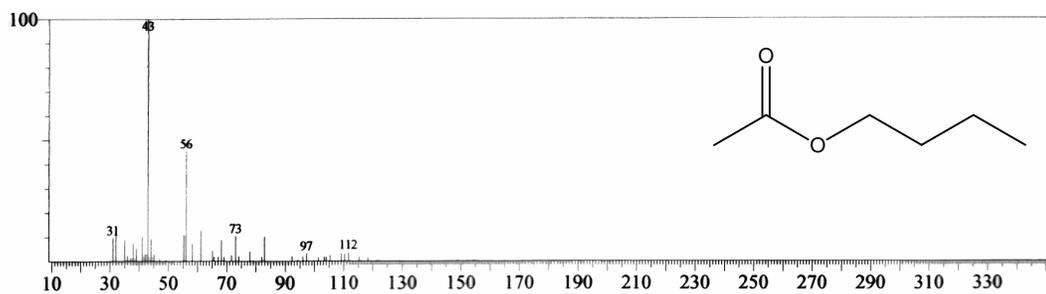


Figura 19. Espectro de massa do Etanoato de butila

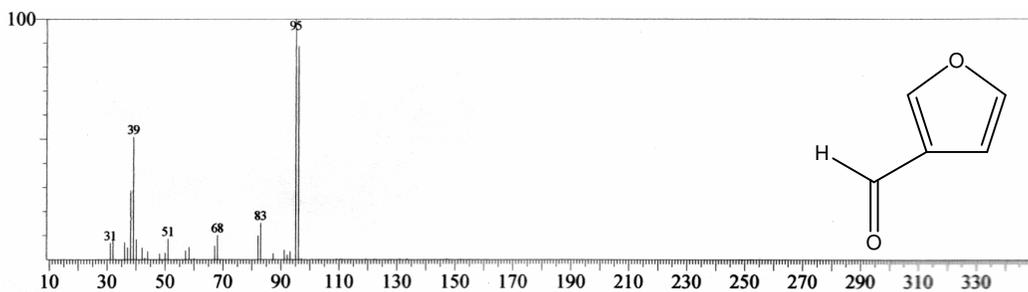


Figura 20. Espectro de massa do Furfural

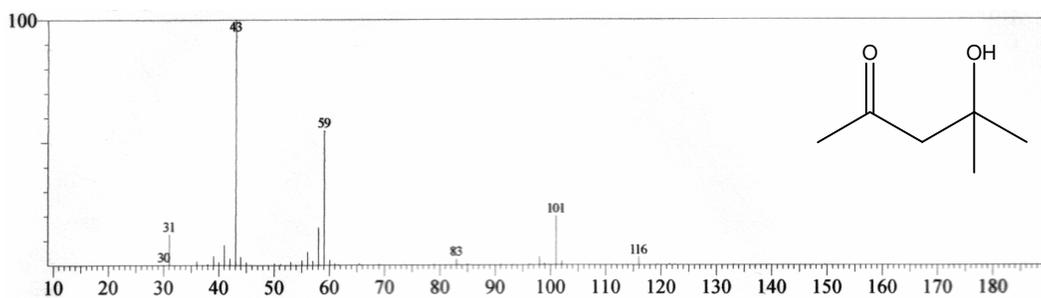


Figura 21. Espectro de massa da 4-hidroxi-4-metilpentan-2-ona

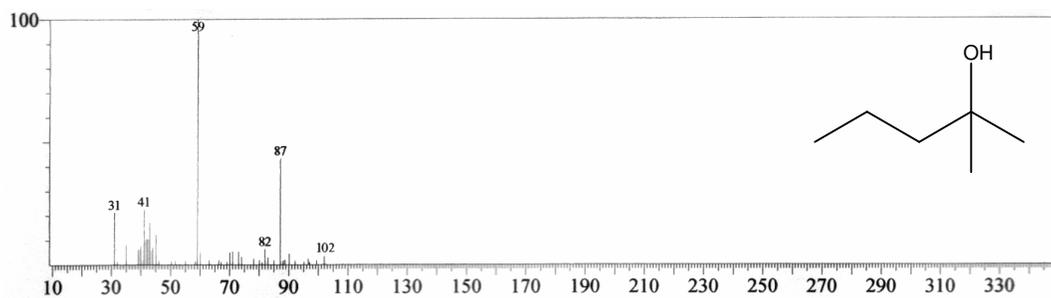


Figura 22. Espectro de massa do 2-metil-pentan-2-ol

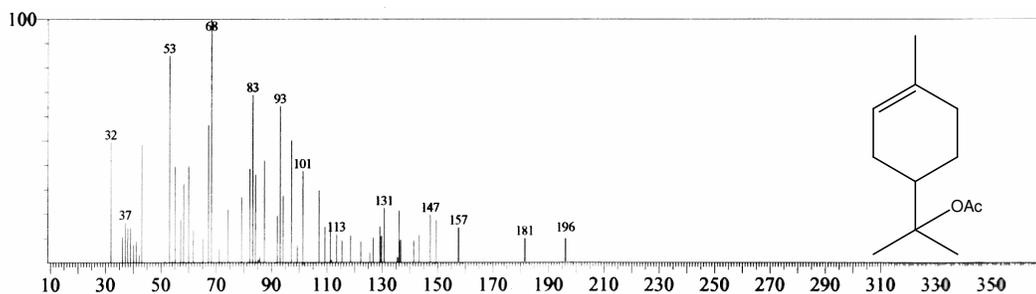


Figura 23. Espectro de massa do Acetato de *p*-ment-8-en-1-ol

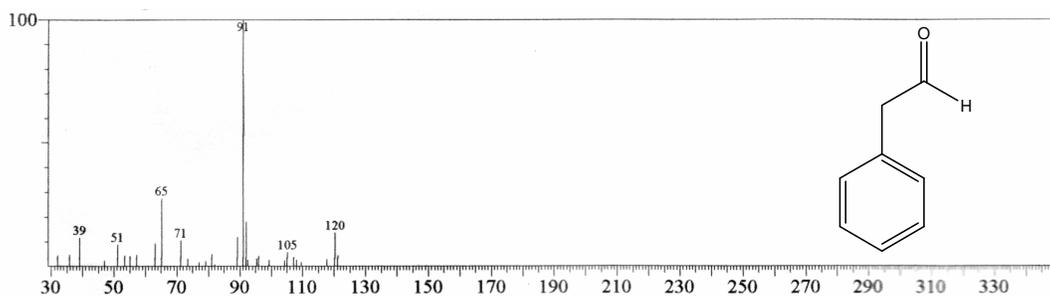


Figura 24. Espectro de massa do Fenil acetaldéido

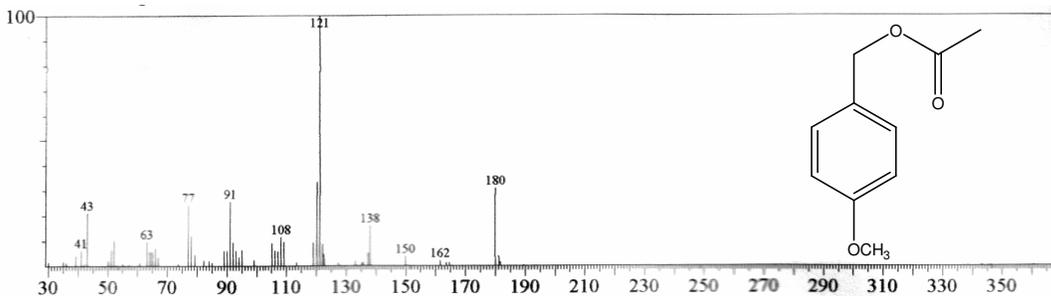


Figura 25. Espectro de massa do Acetato de 4-metoxibenzila

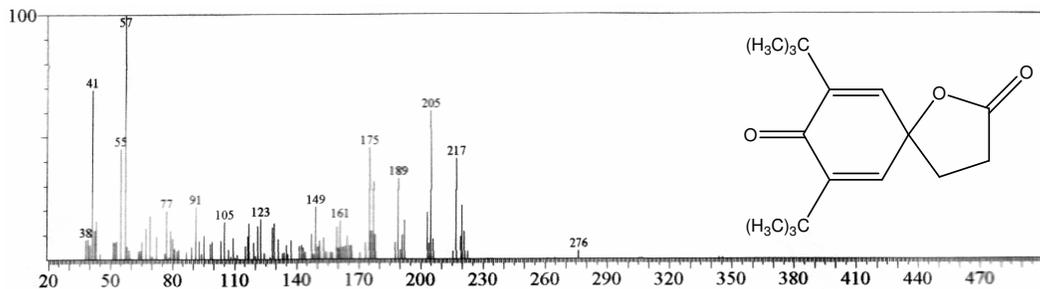


Figura 26. Espectro de massa do 7,9-di-ter-butil-oxaspiro[4.5]deca-6,9-dien-2,8-diona

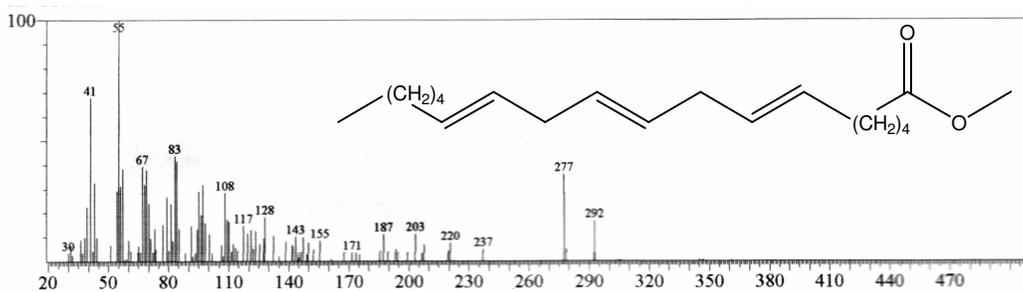


Figura 27. Espectro de massa do 6,9,12-octadecatrienoato de metila

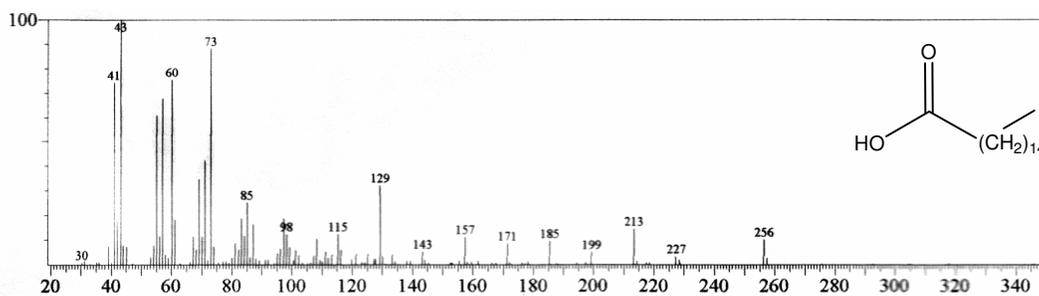


Figura 28. Espectro de massa do ácido n-hexadecanóico

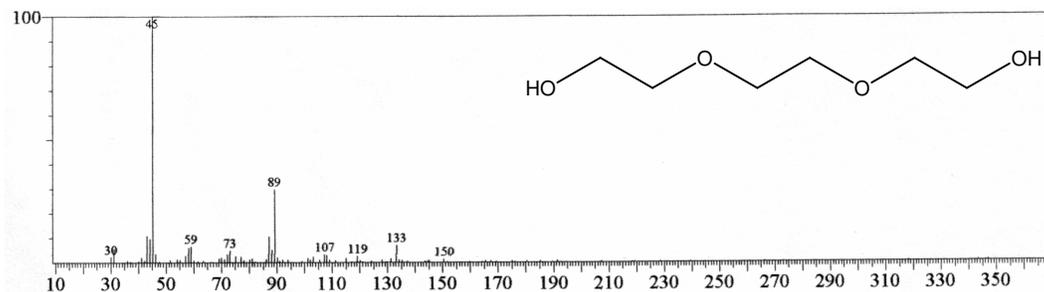


Figura 29. Espectro de massa do 3,6-dioxano-1,8-diol

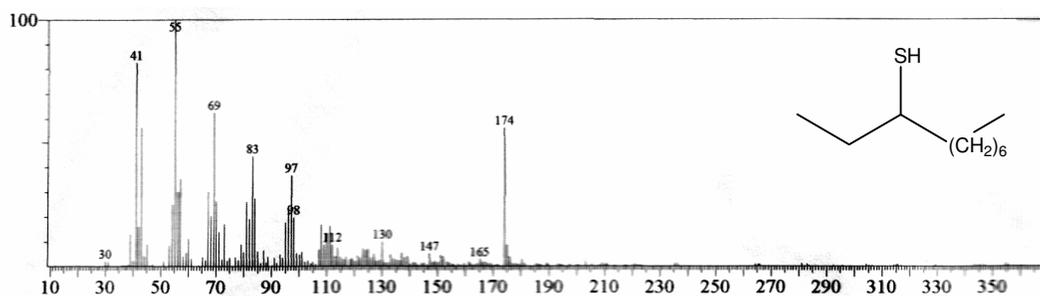


Figura 30. Espectro de massa do 3-mercapto-decano

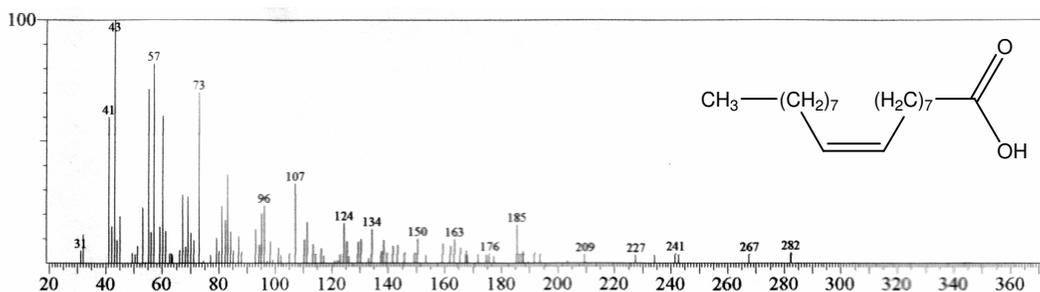


Figura 31. Espectro de massa do ácido 9-octadecenóico

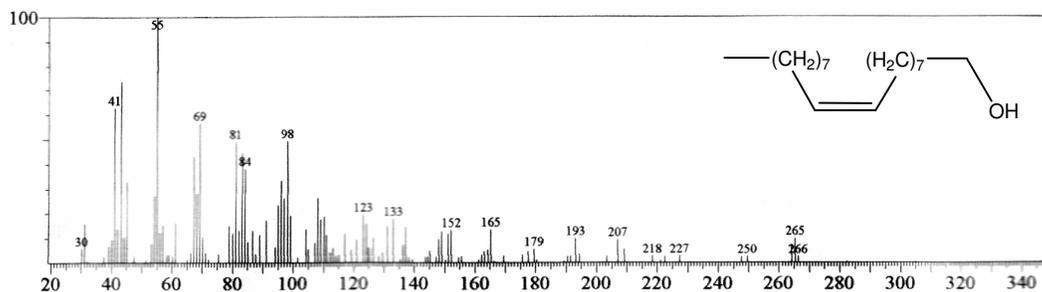


Figura 32. Espectro de massa do 9-octadecen-1-ol

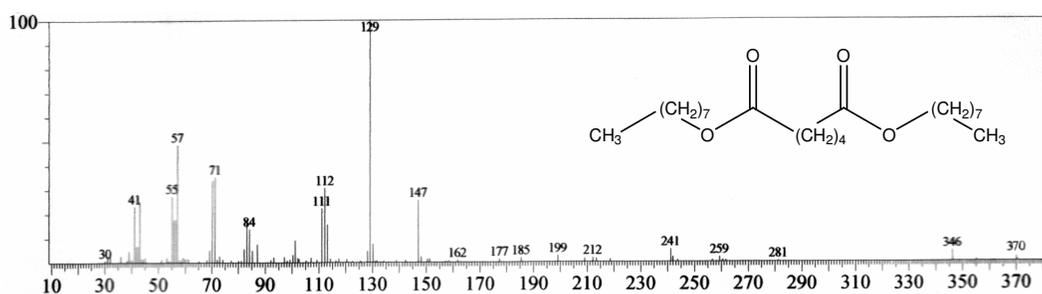


Figura 33. Espectro de massa do Adipato de dioctila

5.4. Resultados discussões sobre os dois processos de extração e atividade antioxidante

As amostras dos óleos da água-de-coco do tipo verde e amarelo de *Cocos nucifera* obtidos pelo processo de hidrodestilação apresentaram pouca similaridade, sendo os constituintes majoritários do tipo verde foram o hexan-2-ol (14,5%) e o 4-hidroxi-4-metilpentan-2-ona (30,5%), enquanto que no tipo amarelo, o constituinte majoritário foi caracterizado pelo 3-mercpto-decano (46,2%).

Análise dos constituintes pelo processo de extração com solvente mostrou como constituintes majoritários no coco tipo verde os constituintes etanoato de *n*-propila (53,5%) e 4-metil-pentan-2-ona (29%), enquanto para coco tipo amarelo foi o butan-1,3-diol (67,7%) e etanoato de *n*-propila (16,7%).

Os óleos essenciais obtidos pelo processo de hidrodestilação dos dois tipos de água-de-coco, verde (**amostra 1**), e amarelo (**amostra 2**), mostraram composições químicas diferentes. O óleo essencial da água do coco do tipo verde foi caracterizado por uma quantidade elevada das cetonas (42,5%), ésteres (29,9%), seguido por aldeídos (14,5%) e álcoois (3,2%), representando 90,1% do total. Os componentes principais foram identificados como a cetona, 4-hidroxi-4-metilpentan-2-ona (30,5%), e o etanoato de *n*-propila (15,3%). A análise do óleo essencial da água-de-coco do tipo amarelo foi caracterizada pela presença dos tióis (46,2%), dos ácidos carboxílicos (23,7%), álcoois (12,1%), ésteres (10,4%), das lactonas (4,5%), e de aldeídos (1,7%), representando 98,6% do total. Os componentes principais do óleo essencial para esta amostra foi o 3-mercaptop-decano (46,2%) seguido pelo ácido *n*-hexadecanóico (18,4%). Os compostos da água-de-coco dos dois tipos foram analisados para as amostras obtidas pela extração usando o éter de petróleo como o solvente. Oito compostos foram identificados na **amostra 1'** do tipo verde, caracterizada por ésteres (58,3%), cetonas (33,5%), e dióis (8,0%), representando 99,8% do total. Para a espécie do tipo amarelo, cinco componentes foram identificados caracterizados por dióis (74,3%), ésteres (16,7%), e as cetonas (6,2%), representando 97,2% do total. Todos os cinco componentes identificados na **amostra 2'** do tipo amarelo estão na composição do tipo verde, **amostra 1'**, mas em concentrações diferentes. Para o tipo verde, os componentes principais foram o etanoato de *n*-propila (53,5%) e o etanoato de 4-metila (29,0%), visto que para o tipo amarelo, os componentes principais foram o butano-1,3-diol (67,7%), e o etanoato *n*-propila (16,7%). O butano-1,3-diol identificado em ambas as amostras (**amostra 1'** e **amostra 2'**) é um sítio quiral importante para vários compostos opticamente ativos, tais como os derivados da azetidinona que conduzem aos antibióticos peneno e ao carbapeneno (MATSUYAMA et al, 2001). O éster etanoato de *n*-propila aparece na **amostra 1** (15,3%) (processo do hidrodestilação) e na **amostra 1'** (53,5%, extrato de éter do petróleo), e a cetona 4-metil-pentan-2-ona estava tanto na **amostra 1** (12%) como na **amostra 1'** (29%). Além, pelo processo do hidrodestilação, o furfural estava em ambos os tipos (verde e amarelo) na porcentagem de 14,5% e de 0,8%, respectivamente.

As amostras obtidas pelo processo de hidrodestilação do coco do tipo verde e do tipo amarelo apresentam significativa atividade pelo método do seqüestro de radicais. Pelo processo de hidrodestilação o coco tipo verde apresentou 79,4% de inibição na concentração de 1,0 µg/µL e 64,8% na concentração de 0,125 µg/µL. Enquanto que o coco do tipo amarelo apresentou inibição de 83,5% na concentração de 1,0 µg/µL e 32,5% na concentração de 0,125 µg/µL. Para as concentrações obtidas pelo processo de extração com solvente apresentaram uma fraca atividade de seqüestro de radicais, com 16,4% na concentração de 1,0 µg/µL para o coco do tipo verde e 27,7% de inibição na concentração de 1,0 µg/µL para o coco do tipo amarelo.

As diferenças observadas nos dois processos são significativos e podem ser justificados pelas diferenças de composição química.

5.5. Análise e identificação dos constituintes dos óleos fixos

Os constituintes fixos da carne do coco do tipo verde e amarelo foram analisados por CG-EM (cromatografia gás-líquido acoplada a espectrometria de massas) onde as condições dos equipamentos estão descritos no **item 4.3.2 (p. 20)** e a identificação realizada por pesquisas em biblioteca de padrões, comparação dos índices de Kovats e por comparação de espectros de massas registrados na literatura (Adams, 2001).

Após serem realizadas reação de saponificação seguida de metilação. Os percentuais de cada constituinte além do índice de Kovats experimental estão relacionados na **Tabela 7, p. 55**. Os espectros de massa de cada constituinte estão presentes nas **Figuras 34-49, p. 56-61**.

Tabela 7. Constituintes encontrados nos ésteres metílicos do extrato hexânico do óleo fixo do coco do tipo verde e amarelo em três fases de maturação.

compostos	TR	verde		maduro		seco		Identificação
		verde	amarelo	verde	amarelo	verde	amarelo	
hexanoato de metila (caproato de metila)	3,10				0,90		0,24	IR, EM, Lit
octanoato de metila (caprilato de metila)	6,25			2,10	1,20	1,98	4,51	IR, EM, Lit
tridecano	10,40	5,96	8,41	0,18	0,10			IR, EM, Lit
decanoato de metila (caprinato de metila)	10,96			3,87	2,42	7,54	4,64	IR, EM, Lit
2,6,11-trimetildodecano	12,34	4,20						IR, EM, Lit
isotetradecano	12,91	15,20	20,64					IR, EM, Lit
2,8-dimetilundecano	14,47	8,73	11,51					IR, EM, Lit
isohexadecano	15,40	14,37	18,15					IR, EM, Lit
dodecanoato de metila (laurato de metila)	16,13			38,27	30,21	57,80	40,49	IR, EM, Lit
tiodipropionato de dimiristila	20,12	3,95						IR, EM, Lit
<i>n</i> -heneicosano	20,13		6,28					IR, EM, Lit
Tetradecanoato de metila (miristato de metila)	20,73			19,37	12,34	17,55	21,06	IR, EM, Lit
<i>n</i> -eicosano	23,64		2,33					IR, EM, Lit
hexadecanoato de metila (palmitato de metila)	24,05	19,23	3,68	12,38	9,00	7,85	11,57	IR, EM, Lit
9,12-octadecadienoato de metila (linoato de metila)	26,13	7,27		4,08	1,07		1,86	IR, EM, Lit
9-octadecenoato de metila (elaidato de metila)	26,23	11,55		16,37	7,90	4,90	8,44	IR, EM, Lit
ocadecanoato de metila (estereato de metila)	26,50			2,97	3,12	2,36	5,30	IR, EM, Lit

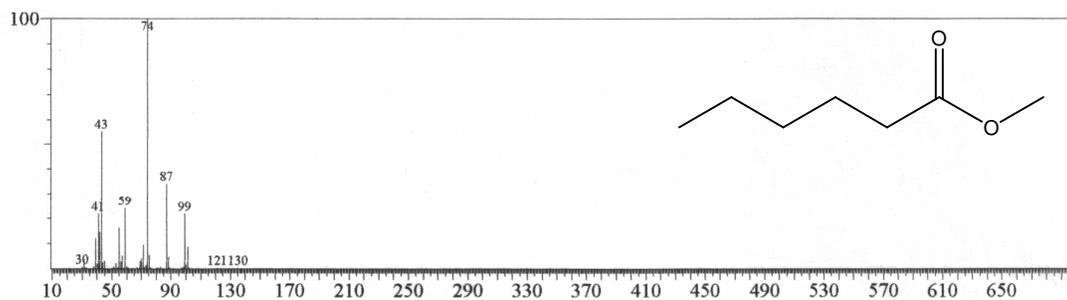


Figura 34. Espectro de massa do hexanoato de metila

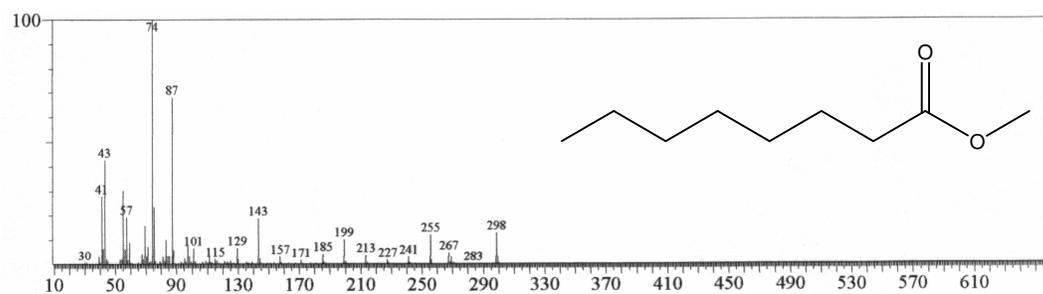


Figura 35. Espectro de massa do octanoato de metila

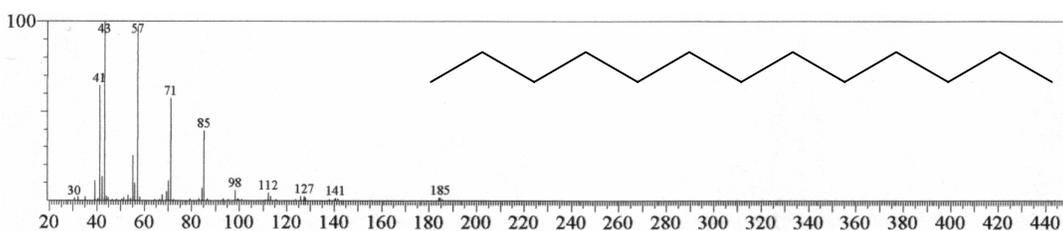


Figura 36. Espectro de massa do tridecano

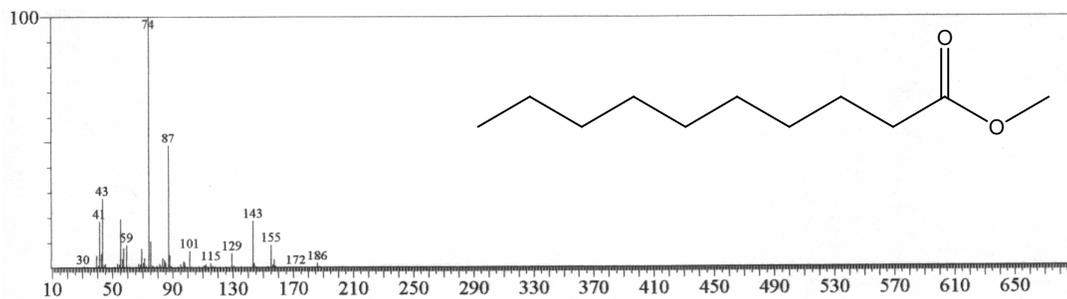


Figura 37. Espectro de massa do decanoato de metila

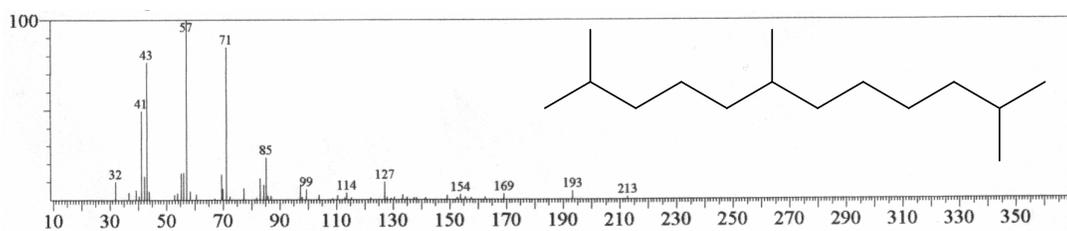


Figura 38. Espectro de massa do 2,6,11-trimetildodecano

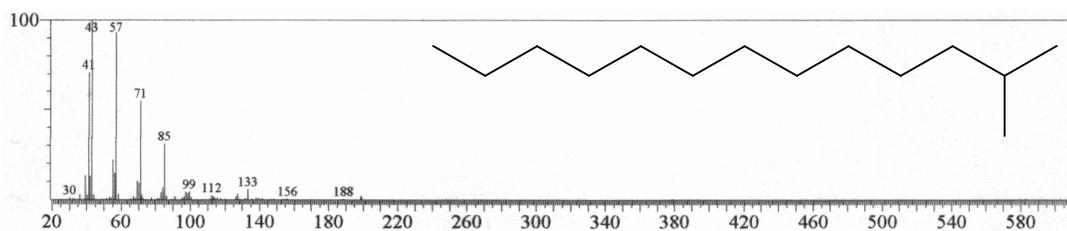


Figura 39. Espectro de massa do isotetradecano

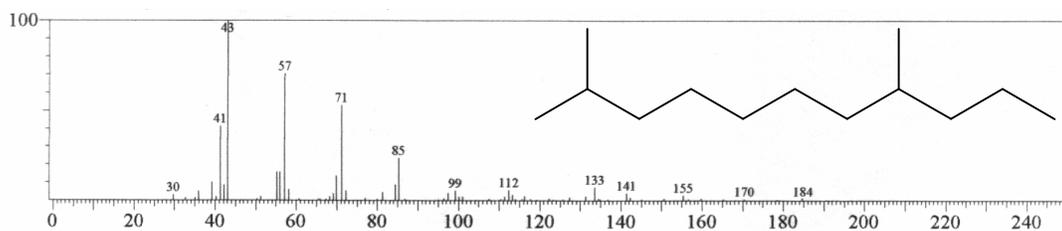


Figura 40. Espectro de massa do 2,8-dimetilundecano

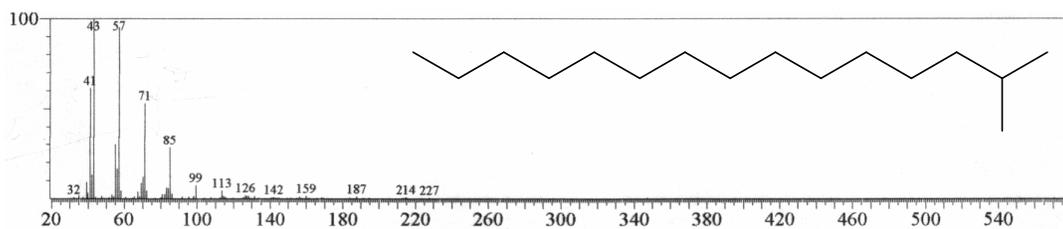


Figura 41. Espectro de massa do isohexadecano

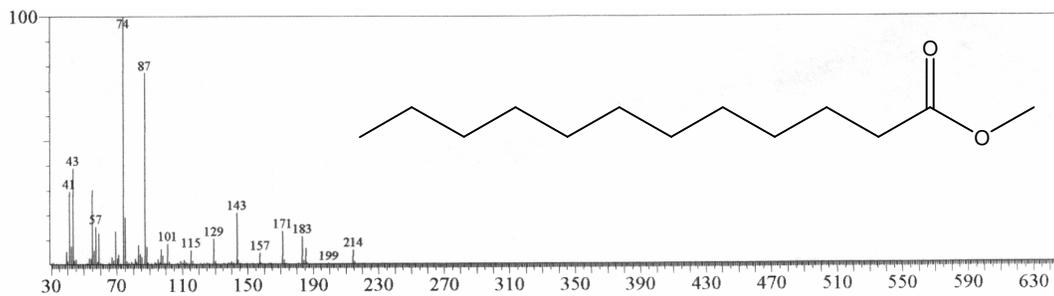


Figura 42. Espectro de massa do dodecanoato de metila

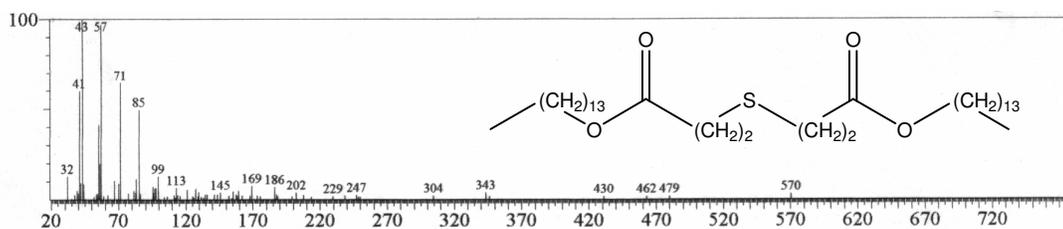


Figura 43. Espectro de massa do tiodipropionato de dimiristila

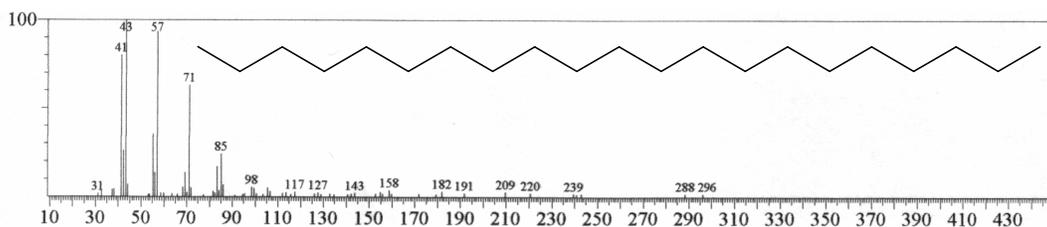


Figura 44. Espectro de massa do *n*-heneicosano

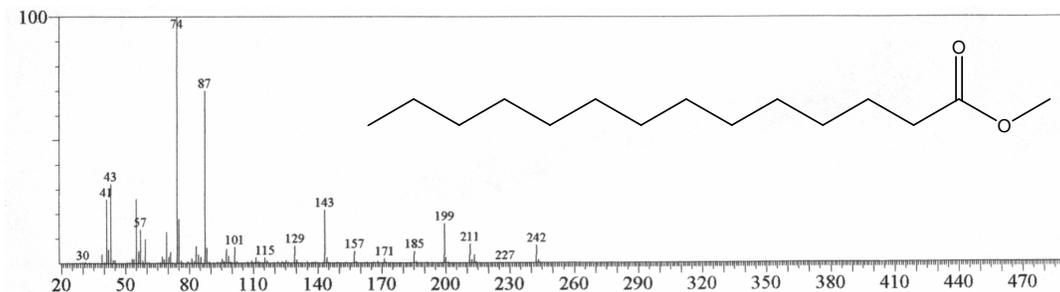


Figura 45. Espectro de massa do tetradecanoato de metila

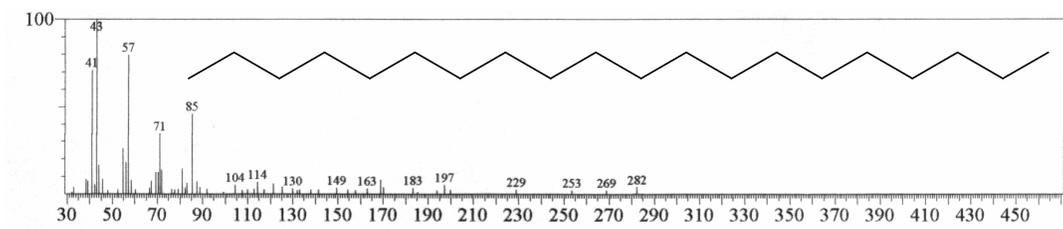


Figura 46. Espectro de massa do *n*-eicosano

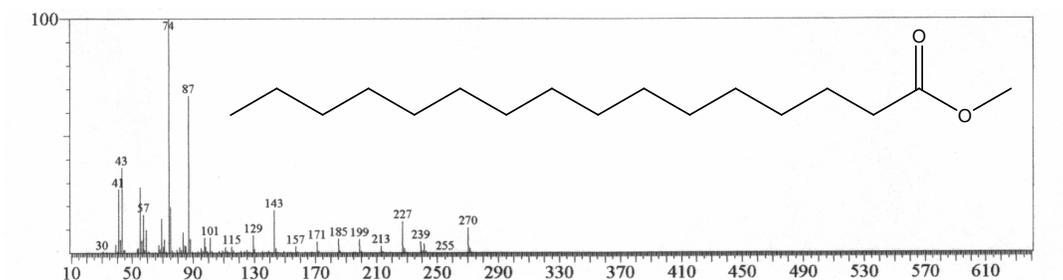


Figura 47. Espectro de massa do hexadecanoato de metila

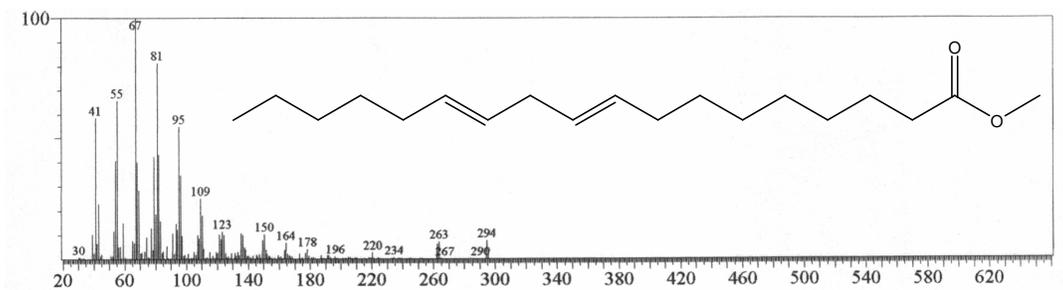


Figura 48. Espectro de massa do 9,12-octadecadienoato de metila

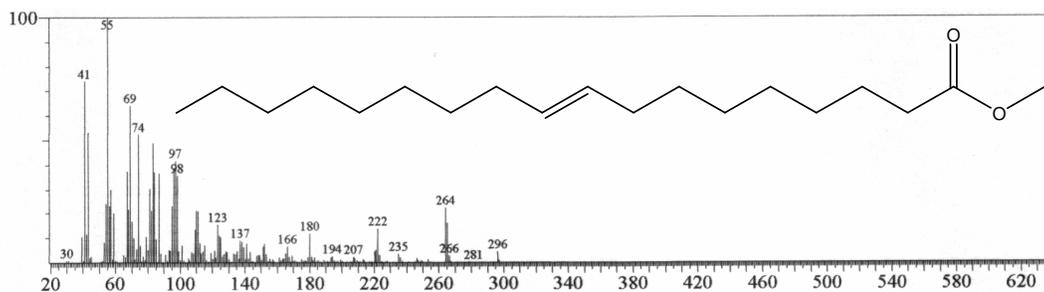


Figura 49. Espectro de massa do 9-octadecenoato de metila

5.5.1. Resultado e discussões sobre constituintes dos óleos fixos do albúmen do coco em três fases de maturação

Na **Tabela 5 (p. 42)** estão relacionados os constituintes identificados no albúmen do coco em diferentes estágios de maturação na forma de ésteres metílicos. O total de compostos identificados no albúmen do coco da casca verde foram quatorze, onde se caracterizaram por hidrocarbonetos (16,77%), tioésteres (1,36%) e ácidos carboxílicos (81,87%). Para a espécime do tipo amarelo foram identificados dez componentes, representando um total de 96,68%, onde foram caracterizados por hidrocarbonetos (23,25%) e ácidos carboxílicos (58,60%). O óleo fixo obtido do albúmen sólido nas três fases de maturação pelo processo da extração solvente das duas espécimes do coco mostrou composições químicas diferentes. O óleo fixo do albúmen obtido do coco tipo verde nas três fases de maturação foi caracterizado por uma quantidade elevada de hidrocarbonetos: somente no forma verde (48,46%) e madura (0,18%), tioésteres: somente verde (3,95%), e ácidos carboxílicos: verde (38,05%), maduro (99,41%) e seco (99,98%). O constituinte majoritário foi identificado como o ácido palmítico (19,23%) para o verde, ácido láurico para o maduro (38,27%) e (57,80%) para o seco. O óleo fixo do albúmen do coco tipo amarelo foi caracterizado igualmente pela presença dos hidrocarbonetos: verde (67,32%) e maduro (0,1%) e ácidos carboxílicos: verde (3,68%), maduro (68,16%), e seco (98,71%), representando 79,12% do total. O

componente principal do óleo fixo para esta espécie foi o ácido láurico com (30,21%) para maduro e (40,49%) para a forma seca.

Estudos comparativos já realizados em dois tipos de coco, o vermelho e o verde em diferentes estágios de maturação mostram que existem a presença dos ácidos linoléico, cáprico e capróico (ARROUCHA et. al. 2005), além de estudos com a composição lipídica de apenas o tipo verde, também em diferentes fases de maturação mostra a presença do ácido láurico como o majoritário, principalmente no seco (ARAGÃO et. al., 2005), e o seu uso como biodiesel mencionado por RESENDE et. al. 2005. Os resultados deste trabalho apresentam indedismo no sentido de ser um estudo dos constituintes dos óleos fixos do albúmen do coco verde e o amarelo nas diferentes fases de maturidade que podem complementar os estudos já obtidos.

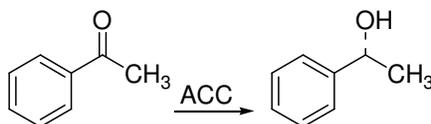
5.6. CONVERSÃO DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS A ÁLCOOIS USANDO ACC (ÁGUA-DE-COCO DO CEARÁ)

5.6.1. Biorreduções Utilizando Água-de-coco do Ceará (ACC)

5.6.1.1. Biorreduções com aldeídos e cetonas

A experiência inicial foi a determinação das proteínas totais presentes no sistema enzimático (DUARTE et al., 2005; ROBINSON, 1991) usando o método de Hartree (HARTREE, 1972). Para a água-de-coco, as proteínas totais foram determinadas como 1,2%, que de acordo com os valores da literatura, aproximadamente 1% (NASSAR, 1986). Uma série de aromáticos e alifáticos simples: os aldeídos, as cetonas, os ésteres e os amidas (**1-22, esquemas 1 e 2, p. 69-70**) foram tratados com a água-de-coco, referido como o ACC (água-de-coco do Ceará), obtidos da fruta de *C. nucifera* (FONSECA et al., 2006). O processo da reação foi monitorado por CCD e análise de espectroscopia de RMN H^1 e todas as conversões foram baseadas em medidas de RMN e de CG/EM.

A reação de bio-redução usando células íntegras de água-de-coco foi inicialmente testada com acetofenona **1**, usando metodologia já descrita por YADAV et al., 2002; SOUZA, 2003; MACHADO, 2004; MACHADO et al., 2006 (**Item 4.7.1, p. 33**).



A reação foi inicialmente monitorada por CCD onde observou-se a formação do álcool correspondente, quantificou-se o álcool formado por RMN 1H , medindo-se a integração do grupo “CH₃” ligado à carbonila em δ_H 2,48, comparada ao quarteto formado no produto do álcool secundário **1'** (**Figura 51a, p. 72**), δ_H 4,83, obtendo-se um rendimento de 79% (**Tabela 8, p. 67**).

Enantioseletividade, induzido por *C. nucifera*, foi observado na redução das cetonas pro-quirais **1/2**, onde os álcoois **1'** álcool 1-fenil etanol (79%), e **2'** 3-metoxifeniletanol (98%) foram dados como os únicos enantiômeros com configuração "S", de acordo com a regra de Prelog, e com a e.e. que variou de 95% a 99%, respectivamente. CG-FID da mistura reacional permitiu identificar o álcool obtido de configuração "S", (**Figura 106a, p. 134**) confirmado por polarimetria. Os espectros de massa e RMN ¹H encontram-se nas **Figuras 50a/50b e 51a/51b, p. 71-72**.

Baseado nestes resultados os estudos foram estendidos a outros compostos carbonílicos: aldeídos aromáticos, cetonas aromáticas, cetonas alifáticas e β-ceto ésteres.

Assim, os dados registrados em ambas as técnicas foram em acordo, com pequenas diferenças em precisão. A percentagem de cada produto foi calculada a partir da comparação da integração dos picos de selecionados hidrogênios nos substratos e respectivos produtos. Assim, foram comparados a integração dos sinais dos hidrogênios aldeídicos dos aldeídos benzaldeído (**3**), m-anisaldeído (**4**), anisaldeído (**5**), vanilina (**6**), cinamaldeído (**7**), α-metil-cinamaldeído (**8**), furfural (**9**) e citral (**10**) com os hidrogênios metilênicos dos álcoois benzílico (**3'**), anísico (**4'**), m-anísico (**5'**), vanílico (**6'a**), éter etil vanílico (**6'b**), cinâmico (**7'a**), álcool 3-fenilpropílico (**7'b**), α-metil-cinâmico (**8'**), furfurílico (**9'**) e o geraniol (**10'**) respectivamente; dos hidrogênios metílicos dos compostos: 2-butanona (**11**) e o β-ceto éster (**13**) com os hidrogênios metínicos do S-(+)-butan-2-ol (**11'**) e do 3-S-(+)-hidróxi-butirato de etila (**13'**); dos metilênicos dos produtos carvona (**14**), pulegona (**15**) e ciclohexanona (**16**) e do ciclopentanona (**17**) com seus respectivos hidrogênios metínicos dos produzidos: carveol (**14'**), pulegol (**15'**), ciclohexanol (**16'a**) e a ciclohexanona-2,3-butileno cetal (**16'b**) e o ciclopentanol (**17'**); Além ds sinais relativos aos demais compostos que foram registrados na **Tabela 8 (p. 67)**.

Os aldeídos **3-5** renderam os álcoois preliminares correspondentes ao álcool benzílico **3'** (88%), álcool 3-metoxibenzílico **4'** (80%) e do 4-metoxibenzílico **5'** (42%) obtendo bons rendimentos. a vanilina **6** foi modificada pelo sistema cru de enzimas rendendo dois compostos: **6'a/6'b**, identificados como o álcool vanílico **6'a** e um inesperado éter vanílico **6'b** (meti vanil éter) na relação de 8:2, respectivamente.

Uma reação regioselectiva foi observada nos aldeídos **7** (cinamaldeído) e **8** (α -metil cinamaldeído), onde a redução ocorreu seletivamente no grupo carbonila, produzindo somente o álcool correspondente **8'** (álcool 2-metil-3-fenilalílico), com 27%, sem modificação da dupla ligação (CANTELLO et al., 1994). É possível que a presença do grupo de alquila unido na dupla ligação na posição alfa à carbonila module o rendimento e os produtos. Para o aldeído **7**, o esperado álcool **7'a** (álcool cinâmico) e o produto tetrahydro com redução do carbonila e a dupla ligação, o denominado **7'b** (álcool 3-fenilpropílico), onde foram obtidos a razão de 84:17, para **7'a** e **7'b**, respectivamente, em conformidade com a literatura (VAN DUERSEN et al., 2004).

A redução dos aldeídos e das cetonas indicados com água-de-coco rendeu os respectivos álcoois no rendimento excelente e com os resultados superiores àqueles relatados para *Daucus carota* (YADAV et al., 2002), o *Zygosaccharomyces rouxii* (ANDERSON et al., 1995) e as espécies do manihot (MACHADO et al., 2006).

A reação enzimática foi estendida então a outros tipos de compostos carbonílicos contendo: cetonas alifáticas e alicíclicas e derivados de ácidos carboxílicos simples, incluindo ésteres, uma amida, e um nitro composto. Um rendimento excelente foi obtido com **11** (2-butanona), uma cetona alifática para **11'**. A redução quimioselectiva ao correspondente S-(+)-butan-2-ol (96%), e a e.e. foi determinada como 95% pela análise chiral do CG de seu derivado acetilado.

O excesso enantiomérico do 2-butanona **11** foi determinado pelo correspondente derivado acetilado 2-acetil butano, **11'acil**. O racêmico comercialmente disponível **11** e o produto de reação obtido por redução de **11** com *C. nucifera* foram separadamente acetilados com Ac_2O na presença de piridina à temperatura ambiente de acordo com procedimento de literatura (MACHADO, 2004). Ambos os produtos acetilados foram analisados por CG quiral e o e.e. do processo de bio-redução foi determinado como 95%. As condições da CG: 40°C (10 min), 2°C/min, 160°C (10 min); tR (R) 6,945 MIN, tR (S) 8,797 min.

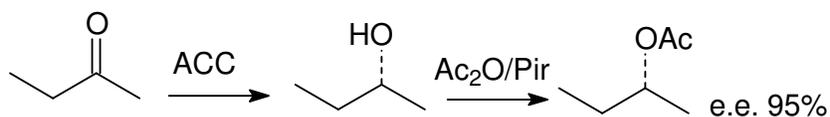


Tabela 8. Relativo rendimento percentual dos produtos reduzidos de **1–11**, e **13–17**. Hidrólise de **12** e **19–22**, com a dimerização de **18** usando ACC. As quantificações feitas por RMN H¹ e CG/EM.

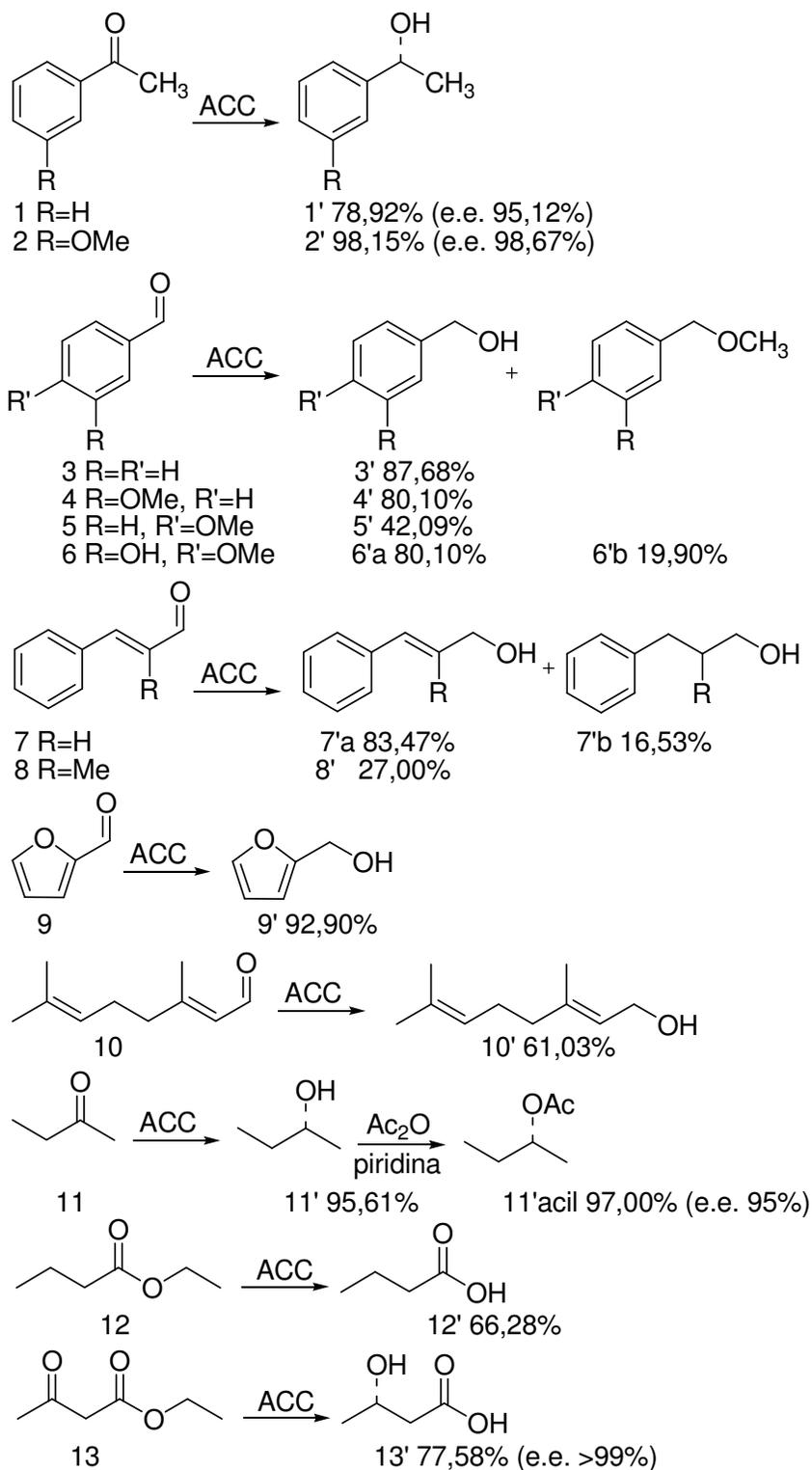
Reagentes	Produtos	T.R.	% ^a	Identificação dos produtos	Massa de conversão	e.e % ^b
1	1'		79	S-(-)-1- fenil-etanol	67	95%
2	2'	22,683	95	S-(-)-3-metoxi-fenil-etanol	67	> 99%
3	3'	12,934	88	benzil álcool	60	
4	4'	22,960	80	álcool 3-metoxibenzílico	86	
5	5'	22,677	42	álcool 4-metoxibenzílico	51	
6	6'a	27,417	80	álcool vanílico	50	
	6'b	25,943	20	metil vaniléter	44	
7	7'a	22,727	83	álcool cinâmico	21	
	7'b	20,088	17	álcool 3-fenilpropílico	54	
8	8'	24,878	27	álcool 2-metil-3-fenilalílico	11	
9	9'	13,702	93	álcool furfurílico	32	
10	10'	21,577	61	geraniol	48	
11	11'		96	S-(+)-butan-2-ol	71	95%
12	12'	5,833	66	ácido butírico	67	
13	13'	9,347	78	3-S-(+)-hidróxi-butirato de etila	40	> 99%
14	14'	18,530	12	S-(-)-carveol	30	> 99%
15	15'		47	R-(+)-pulegol	30	56%
16	16'a	9,841	64	ciclohexanol	59	
	16'b	17,808	36	ciclohexanona-2,3-butileno cetal	29	
17	17'	7,686	35	ciclopentanol	16	
18	18'	31,030	100	diazeno difenil-1-óxido	52	
19	19'	10,547	22	anilina	64	
20	20'	37,350	99	4-hidróxi-anilina	50	
21	21'a		60	4-nitro-anilina	41	
	21'b	30,599	40	4-amino-acetanilida	40	
22	22'	10,517	34	ácido benzóico	22	

T.R: tempo de retenção; ^a Determinado por CG-EM; ^b Determinado por CG-quiral

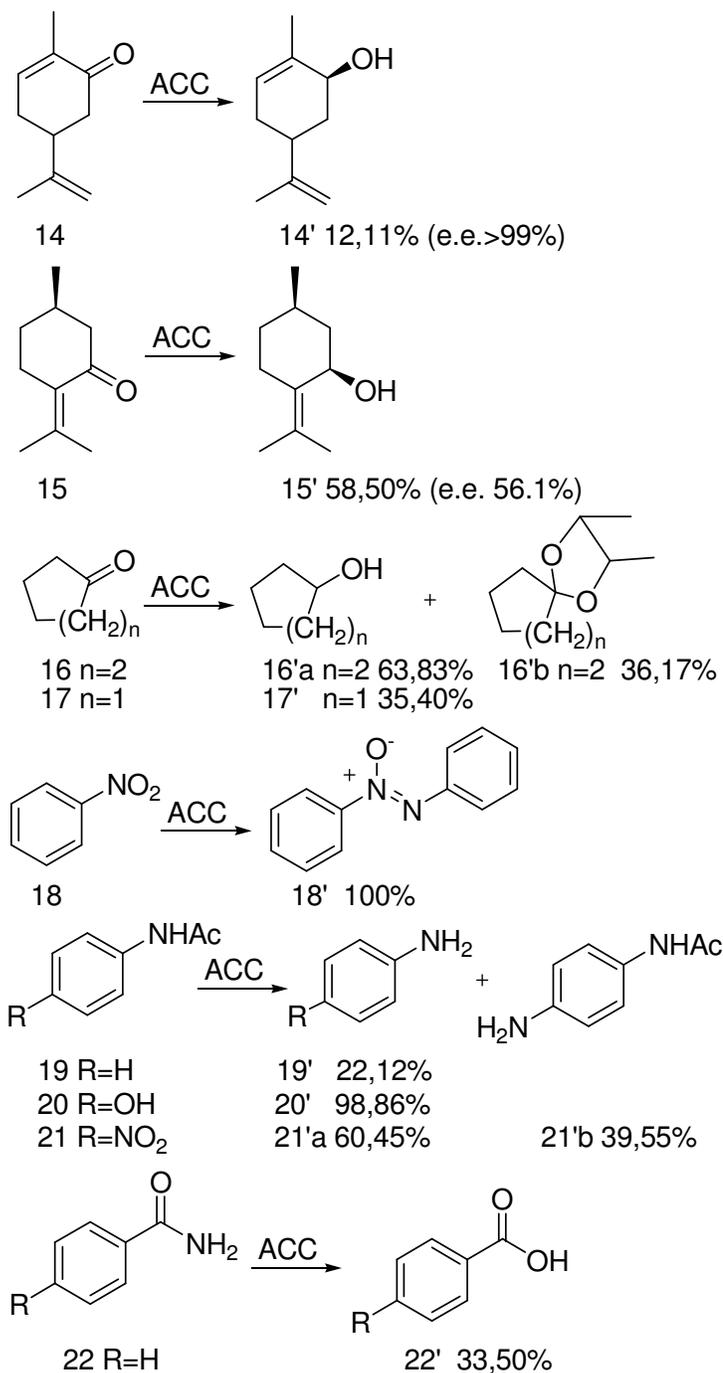
Tabela 9. Sinais de RMN ^1H usados na integração dos prótons selecionados dos compostos **1–11**, e **13–17**, comparados com a integração dos produtos álcool **1'–11'**, e **13'–17'**, usando água-de-coco.

Reagentes/ Produtos	δ_{H}	
	$-\text{CHO}$ (3–10); $-\text{CH}_3$ (1, 2, 11, 13), $-\text{CH}_2$ (14, 15, 16, e 17)	$-\text{CHROH}$ (1'–11', 13'–16'a, e 17'); $-\text{CHO-}$ (16'b)
1/1'	2,48, s	4,83, q
2/2'	2,54, s	4,78, q
3/3'	9,88, s	4,66, s
4/4'	9,77, s	4,67, s
5/5'	9,81, s	4,56, s
6/6'a/6'b	9,81, s	4,52, s/4,41, s
7/7'a/7'b	9,63, d	4,32, s/3,81, s
8/8'	9,59, s	4,24, s
9/9'	9,42, s	4,53, s
10/10'	9,87, d	4,05, d
11/11'	1,90, s	3,53, q
13/13'	2,18, s	3,97, m
14/14'	2,35–2,40, dd	4,13, m
15/15'	2,36–2,59, m	3,65, m
16/16'a/16'b	2,05, m	3,56, q/4,78, m
17/17'	1,81, m	4,25, q

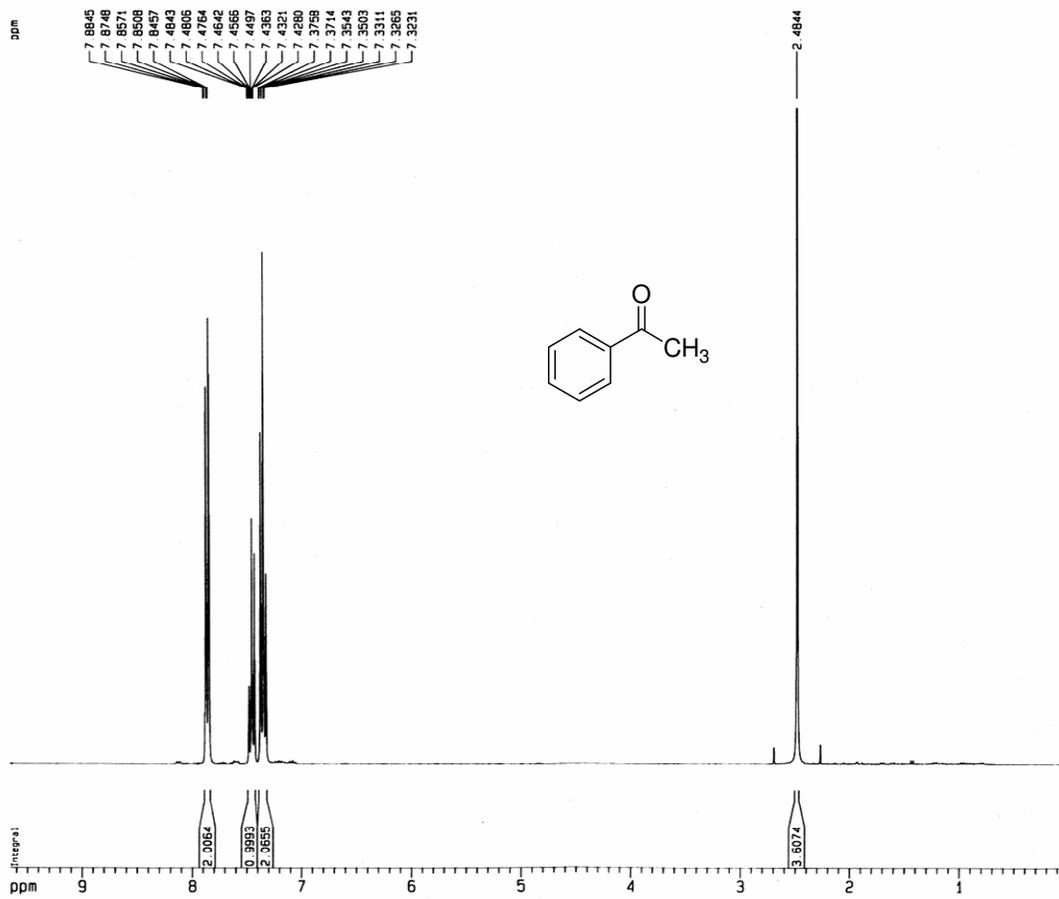
Esquema 1. Reação da ACC com compostos carbonílicos aromáticos e alifáticos (aldeídos, cetonas e ésteres).



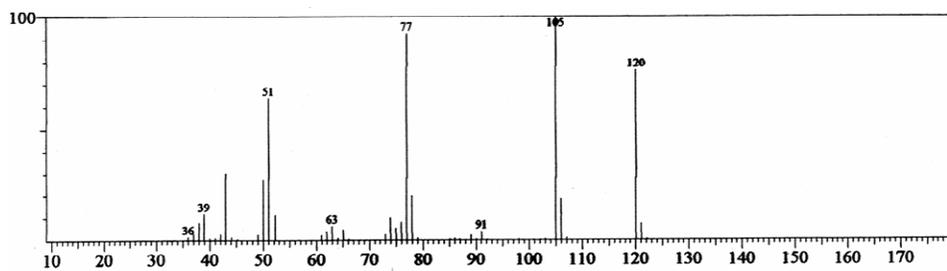
Esquema 2. Reação da ACC com compostos carbonílicos cíclicos e alifáticos (cetonas), além de compostos carbonílicos alicíclicos, amidas e nitrobenzenos.



A seguir estão relacionados os espectros de RMN ^1H dos compostos de partida (**1-11**) (aldeídos/cetonas) e dos respectivos alcoóis obtidos por redução e os espectros de massa dos produtos resultantes da biorredução dos compostos **1-11** (Figuras 50-74, p. 71-95).

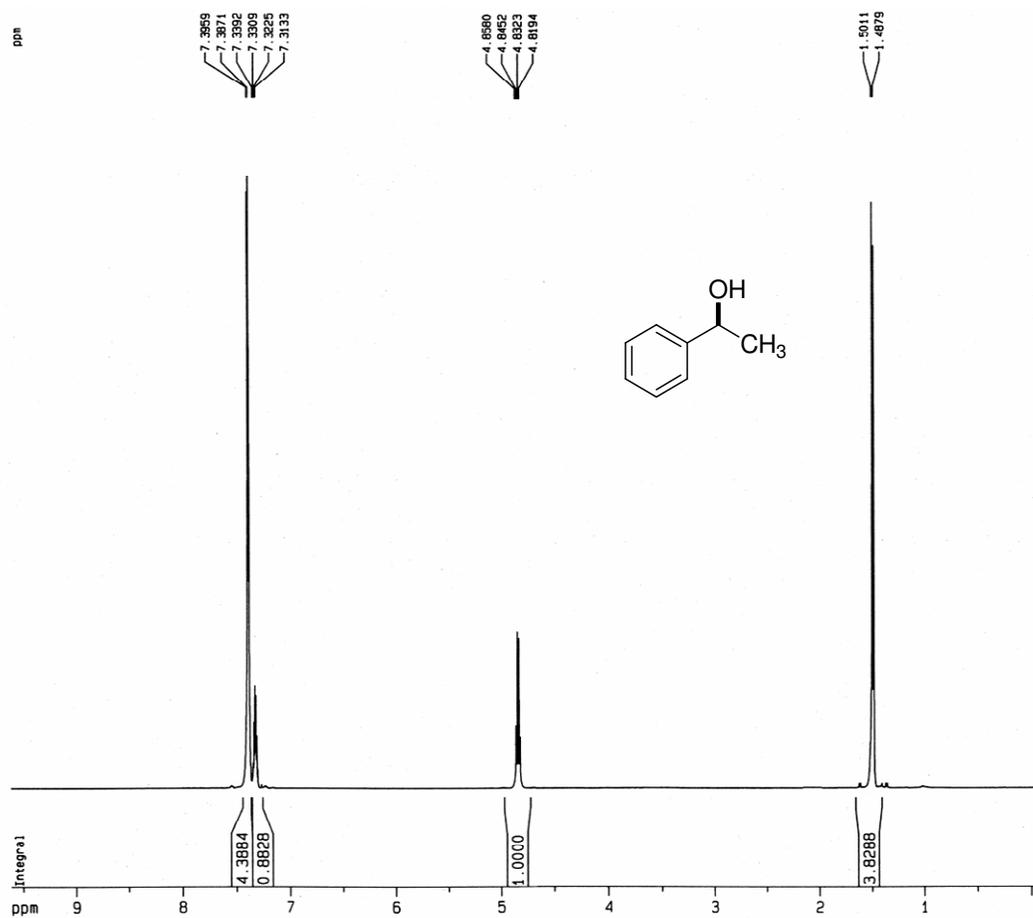


(50a)

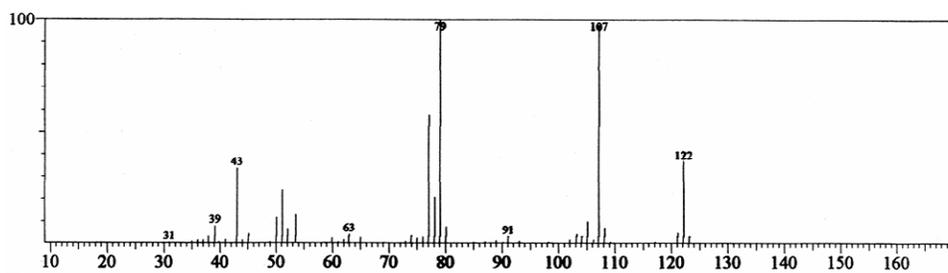


(50b)

Figura 50. (50a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em CDCl_3) de **1**; (50b) Espectro EIMS de **1**.

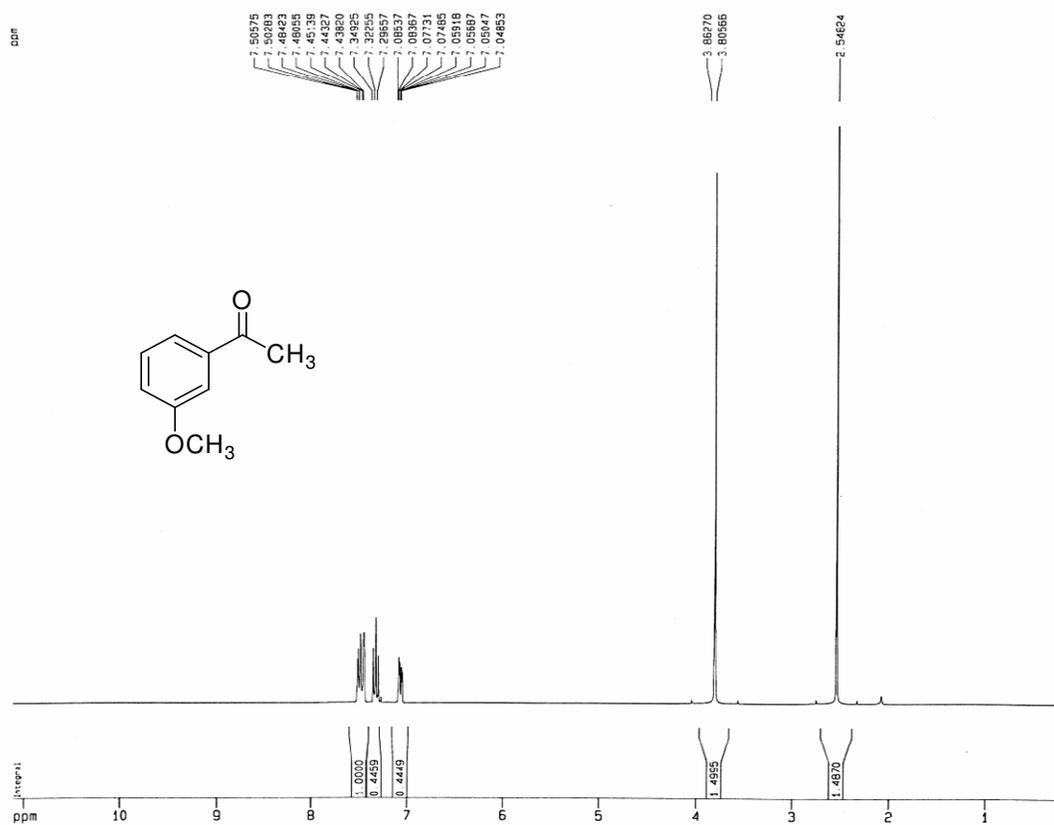


(51a)

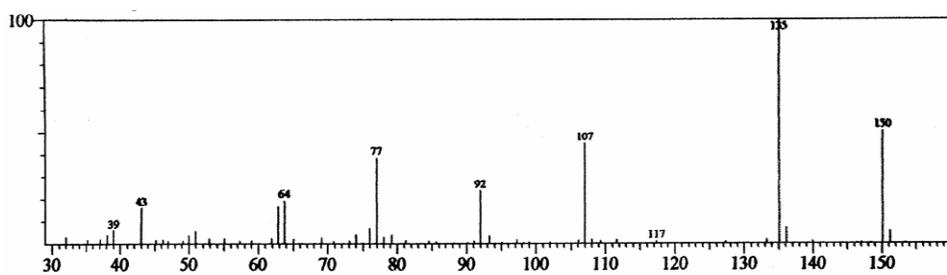


(51b)

Figura 51. (51a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em CDCl_3) de $1'$; (51b) Espectro EIMS de $1'$

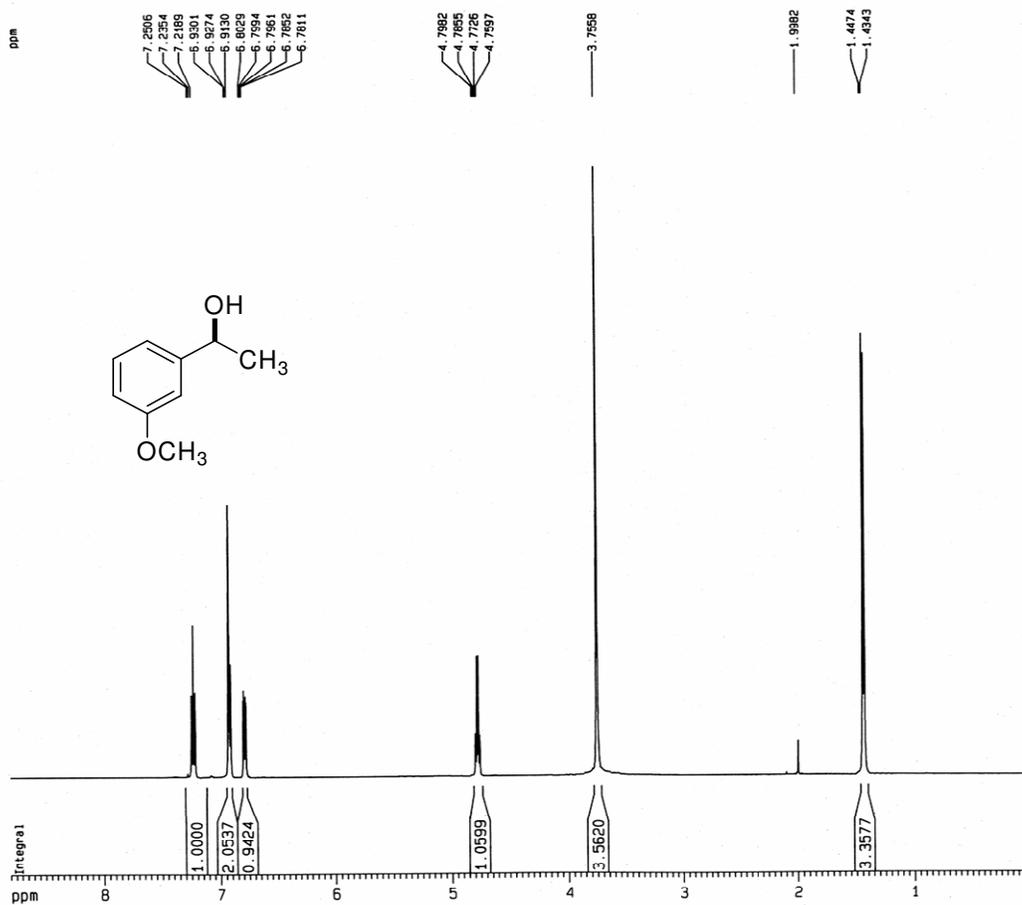


(52a)

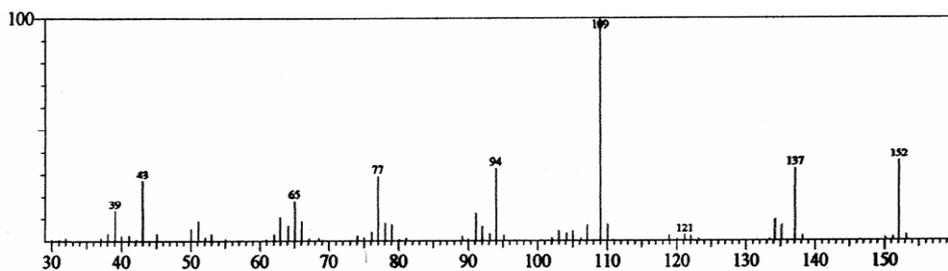


(52b)

Figura 52. (52a) Espectro de RMN H¹ (500 MHz, em CDCl₃) de **2**; (52b) Espectro EIMS de **2**.

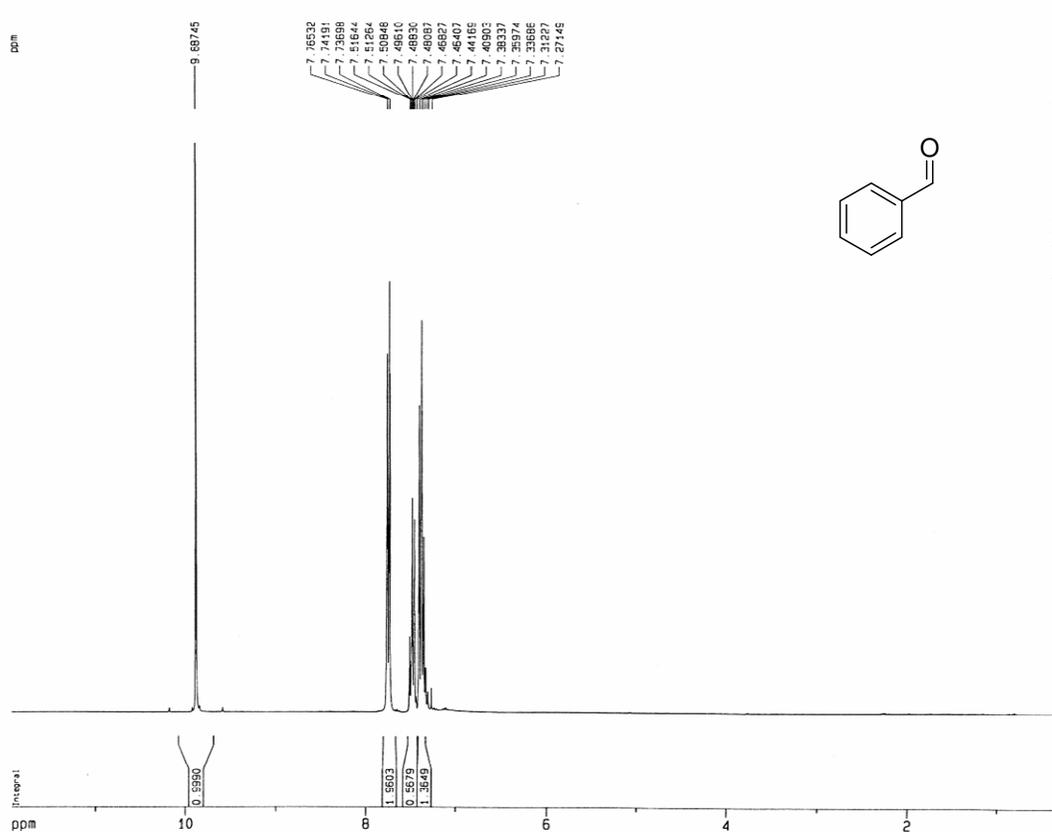


(53a)

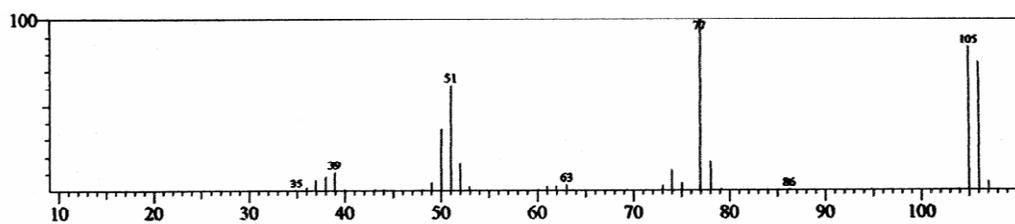


(53b)

Figura 53. (53a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em CDCl_3) de **2'**; (53b) Espectro EIMS de **2'**.



(54a)



(54b)

Figura 54. (54a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em CDCl_3) de **3**; (54b) Espectro EIMS de **3**.

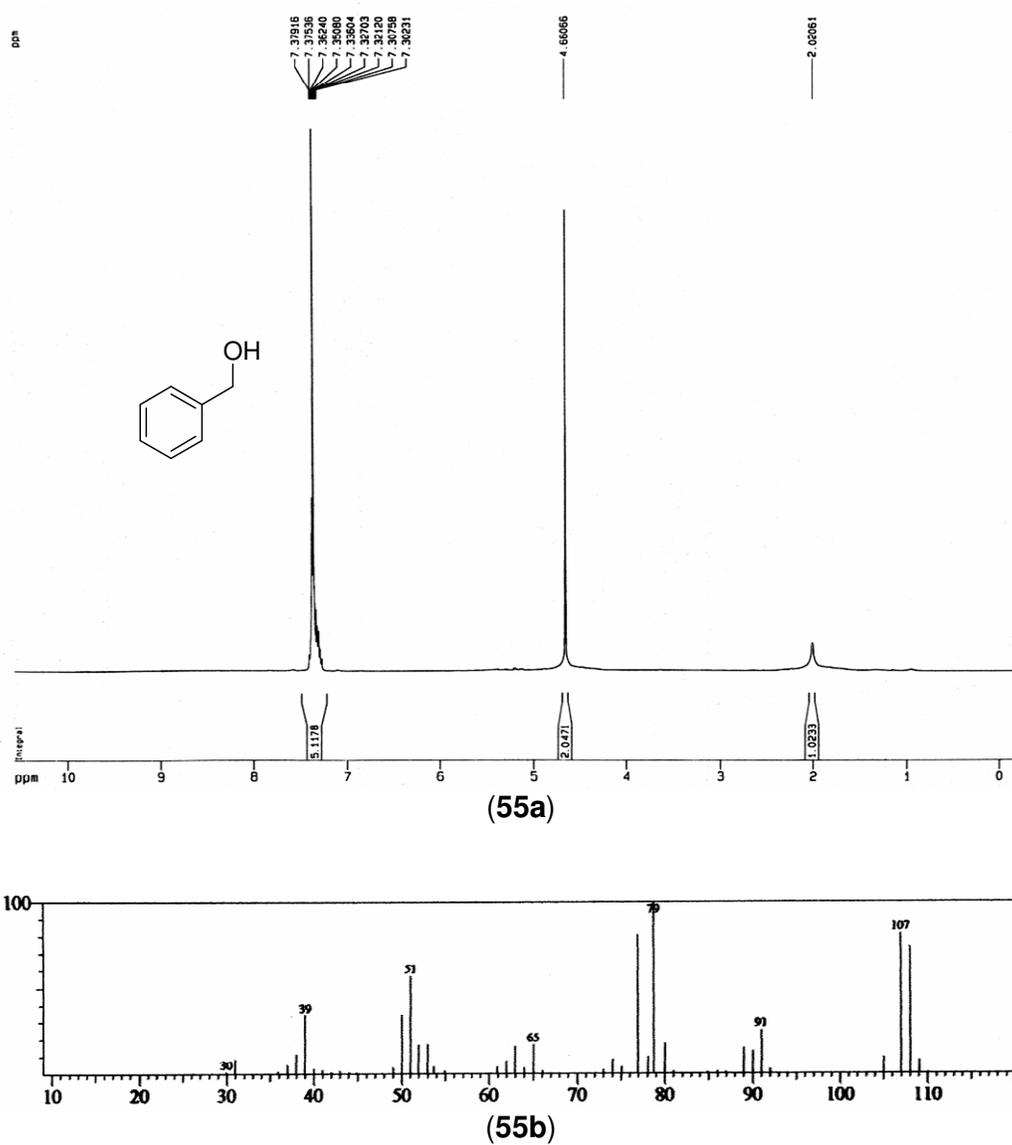


Figura 55. (55a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em CDCl_3) de 3'; (55b) Espectro EIMS de 3'.

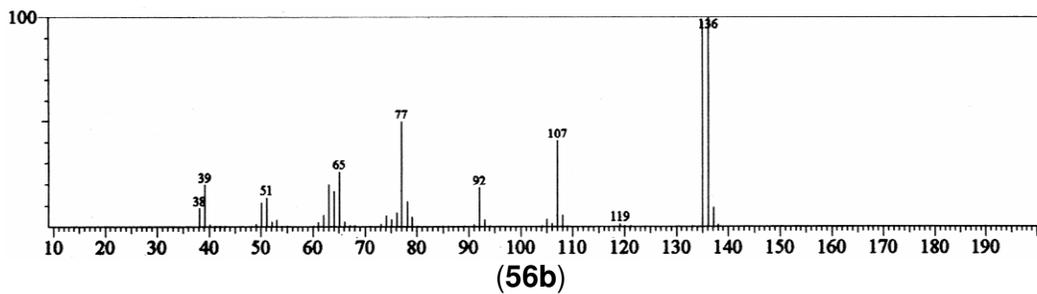
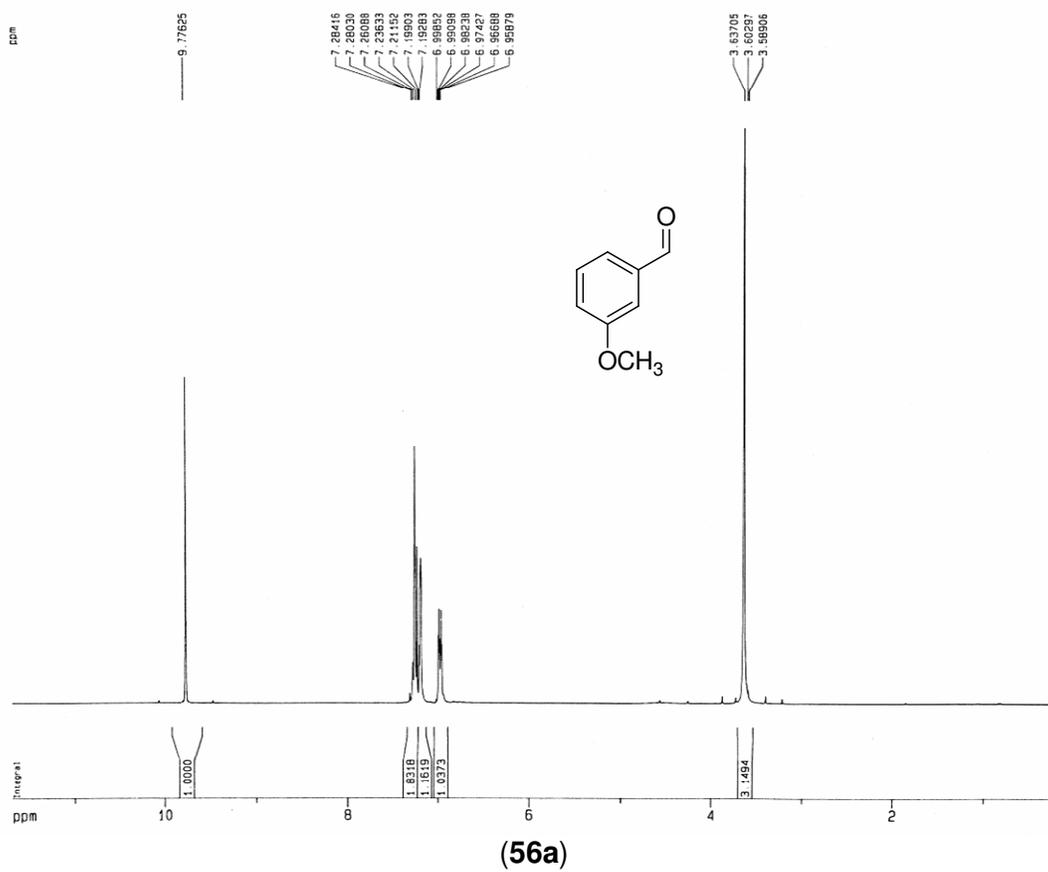
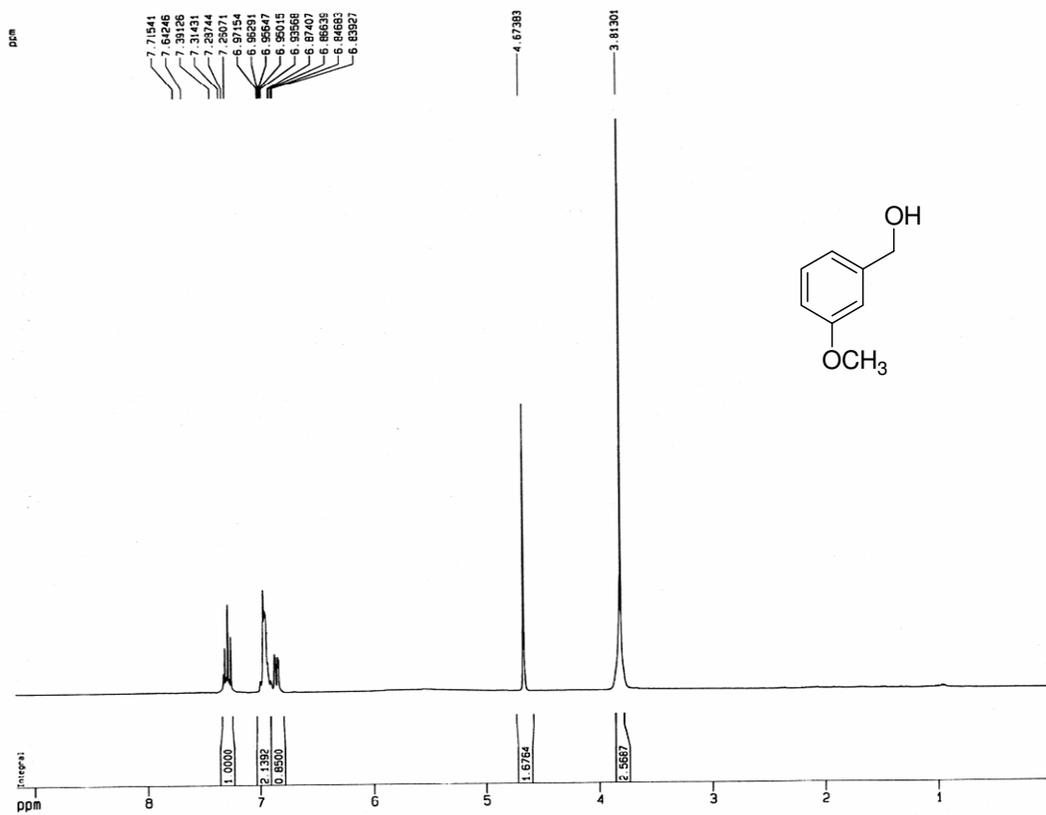
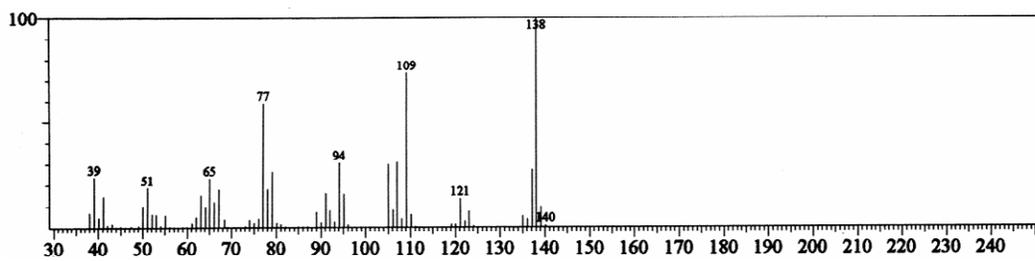


Figura 56. (56a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em CDCl_3) de **4**; (56b) Espectro EIMS de **4**.

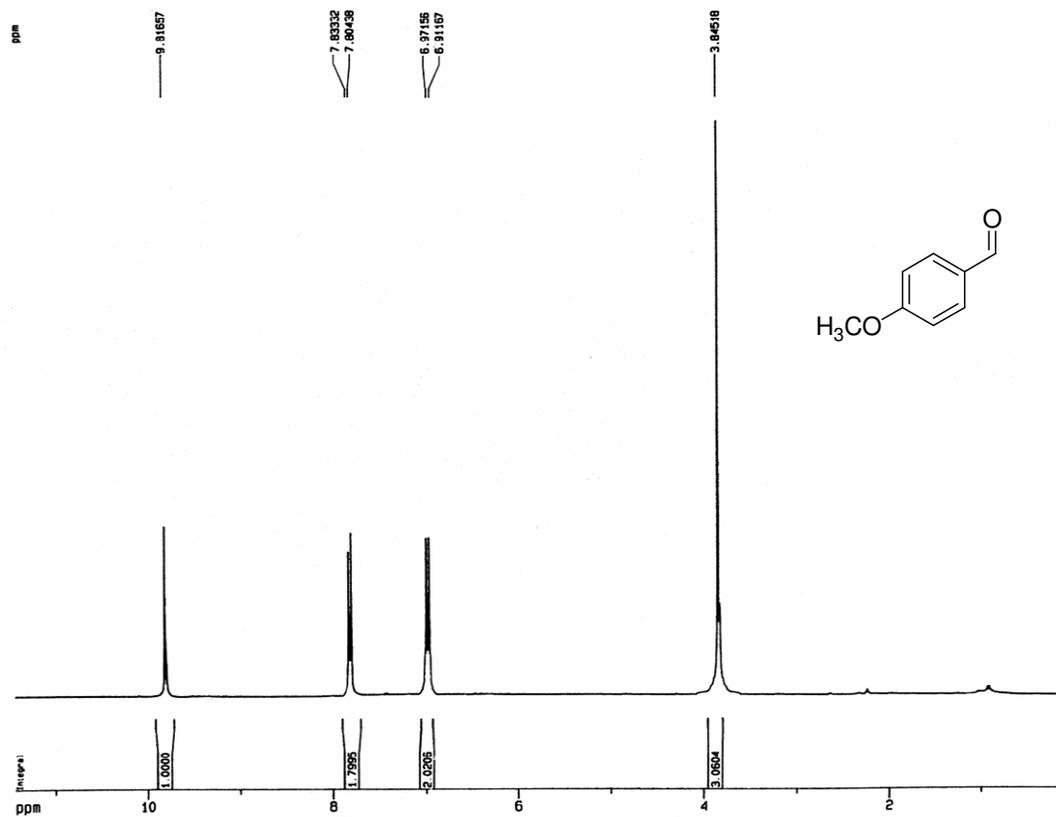


(57a)

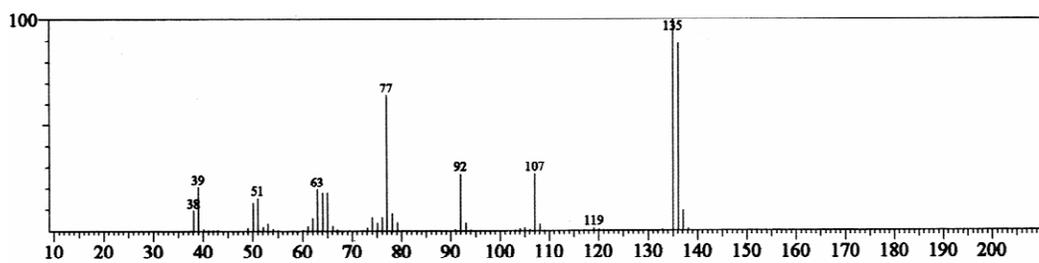


(57b)

Figura 57. (57a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em CDCl_3) de 4'; (57b) Espectro EIMS de 4'.

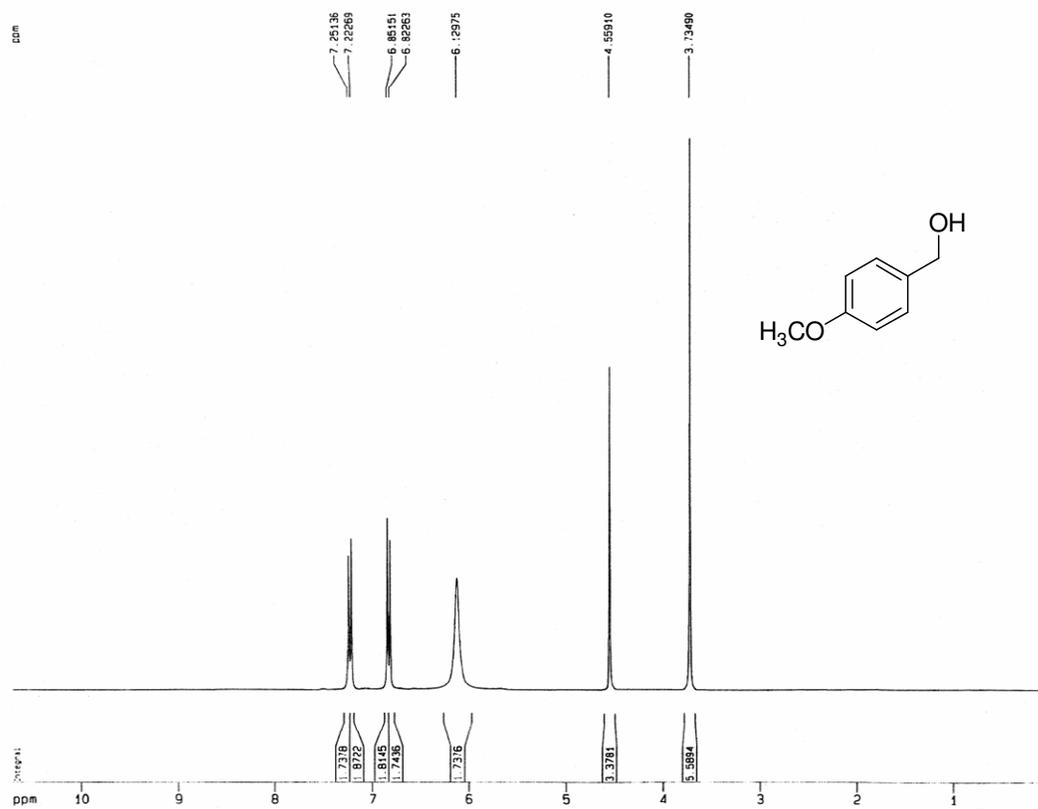


(58a)

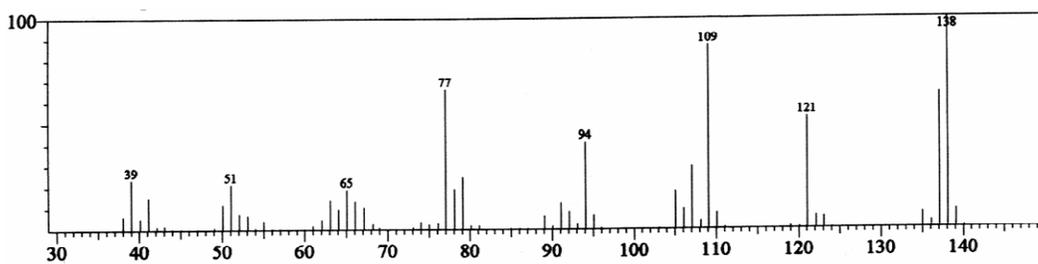


(58b)

Figura 58. (58a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de **5**; (58b) Espectro EIMS de **5**.

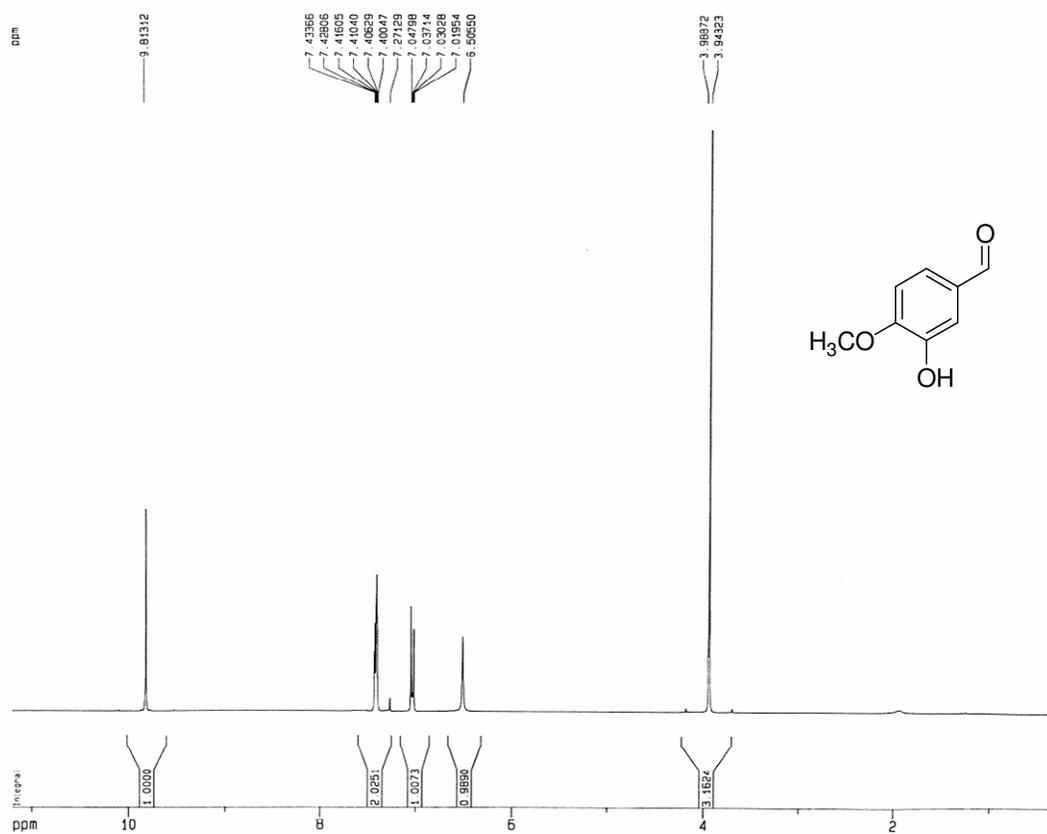


(59a)

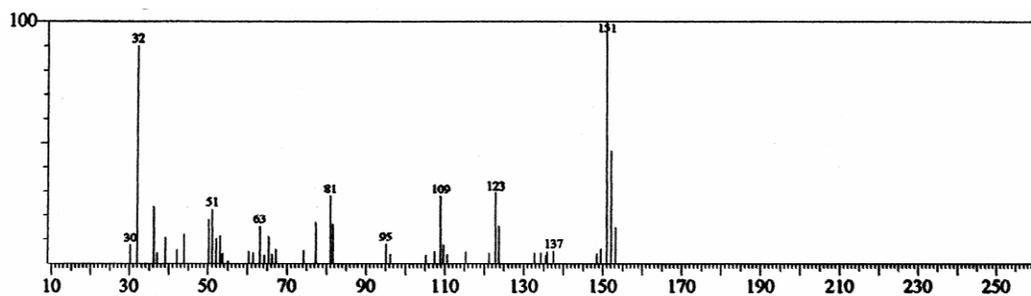


(59b)

Figura 59. (59a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em CDCl_3) de **5'**; (59b) Espectro EIMS de **5'**.



(60a)



(60b)

Figura 60. (60a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de **6**; (60b) Espectro EIMS de **6**.

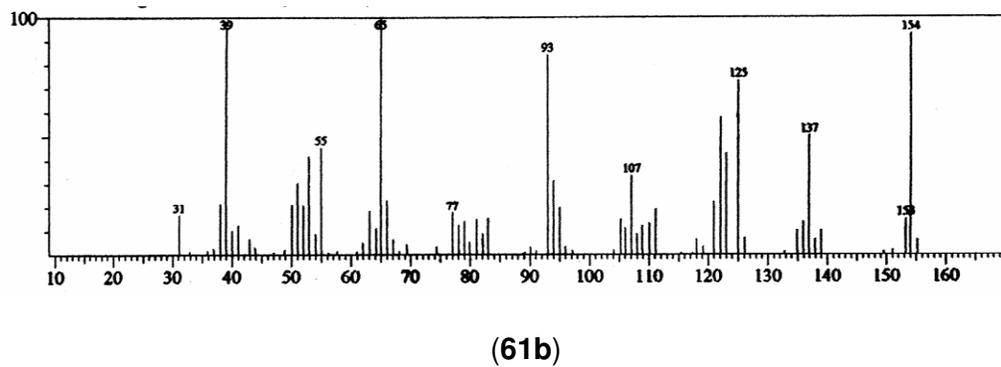
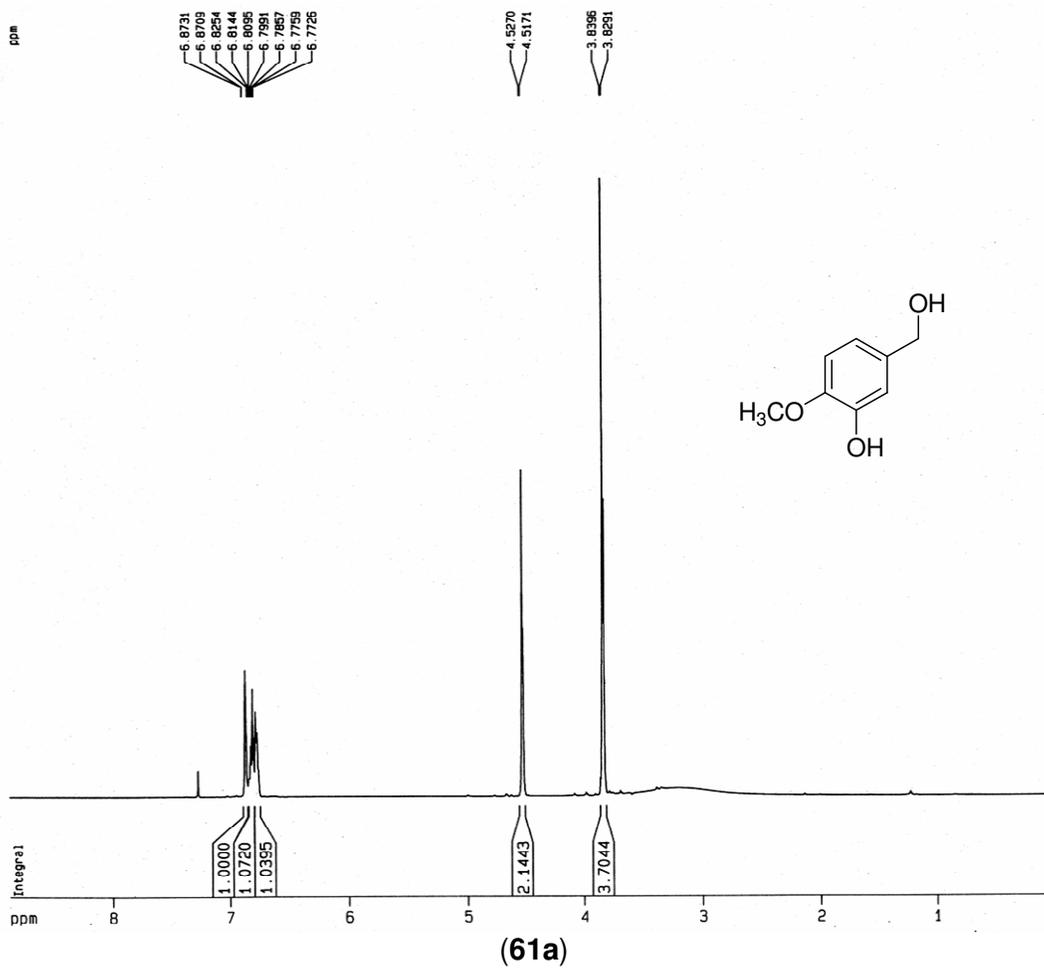
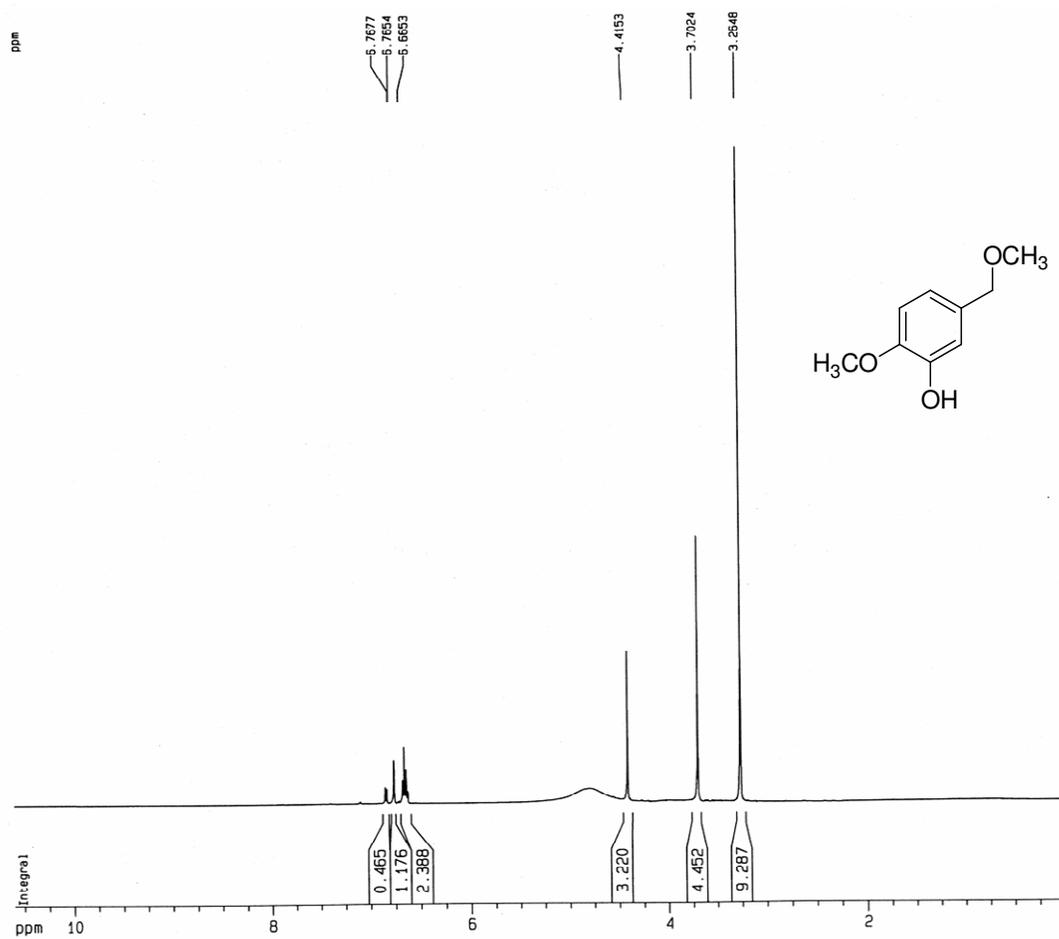
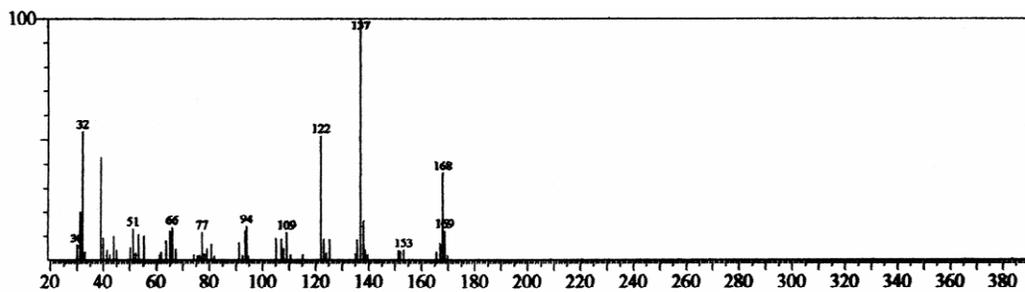


Figura 61. (61a) Espectro de RMN H¹ (500 MHz, em CDCl₃) de 6'a; (61b) Espectro EIMS de 6'a.



(62a)



(62b)

Figura 62. (62a) Espectro de RMN H¹ (500 MHz, em CDCl₃) de 6'b; (62b) Espectro EIMS de 6'b.

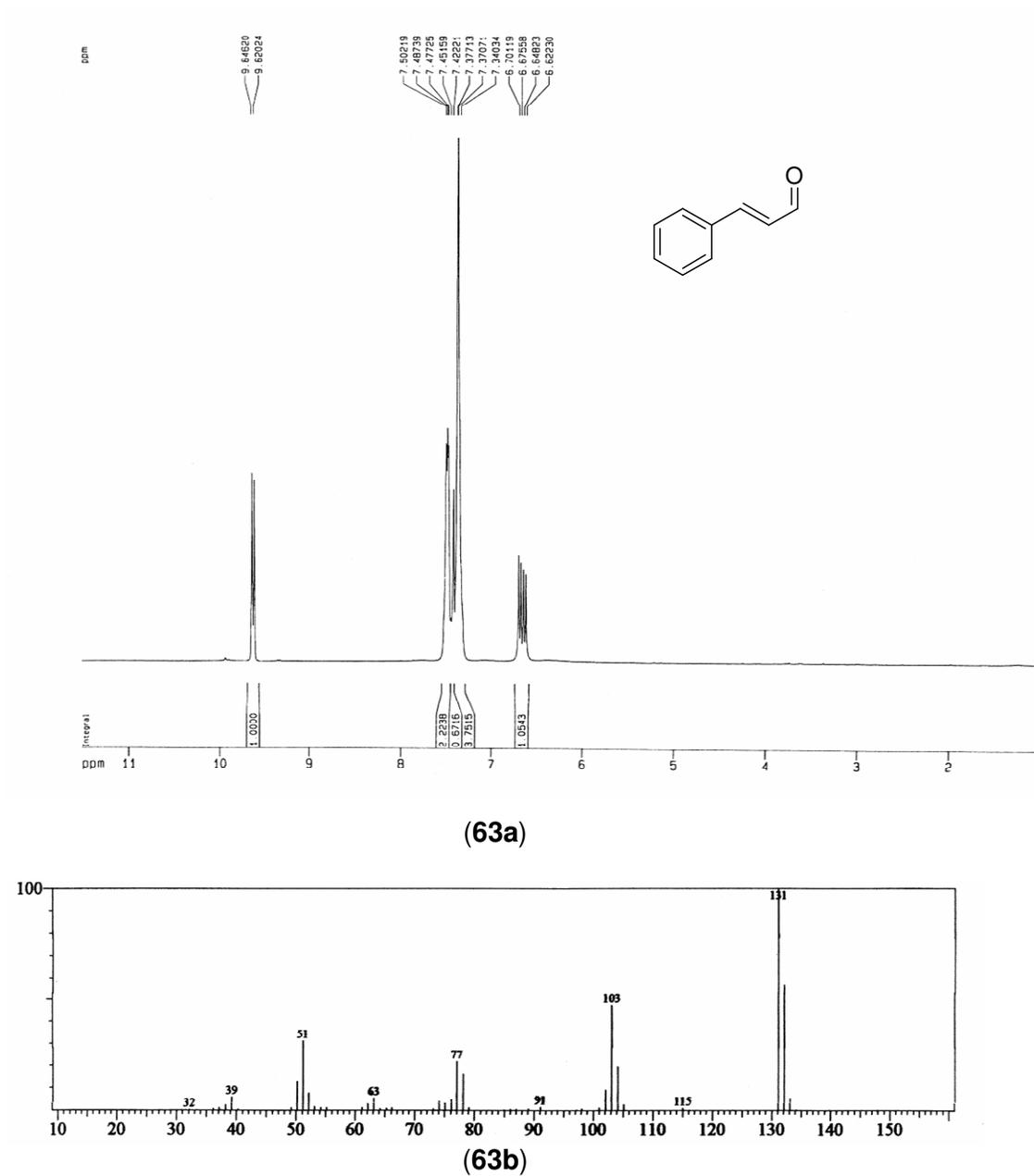
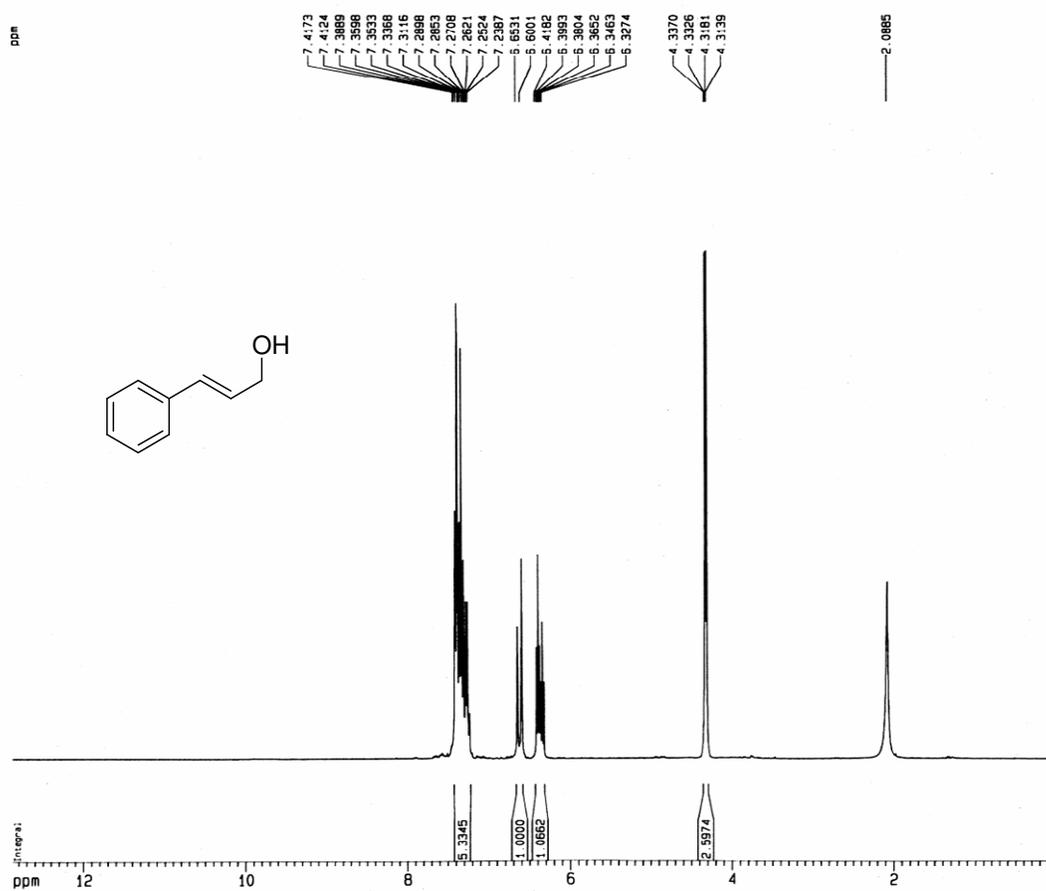
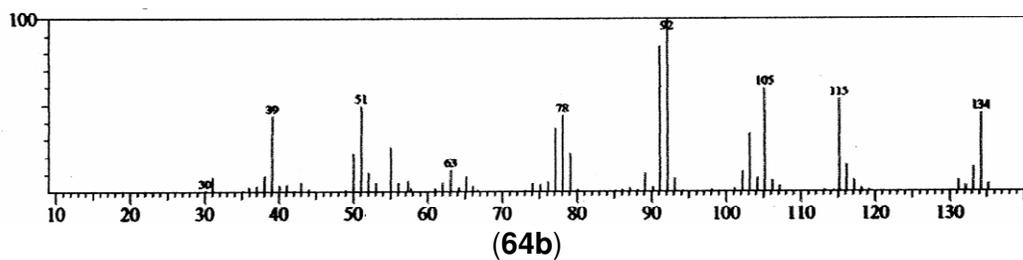


Figura 63. (63a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em CDCl_3) de 7; (63b) Espectro EIMS de 7.

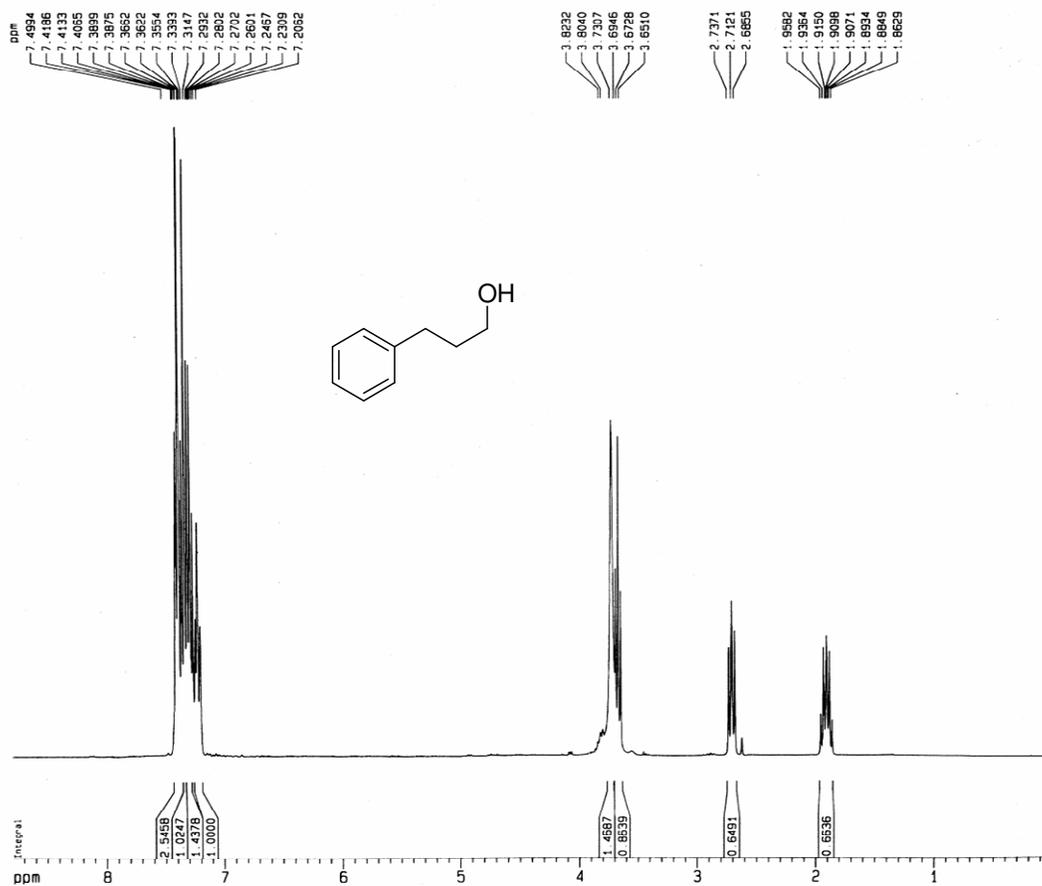


(64a)

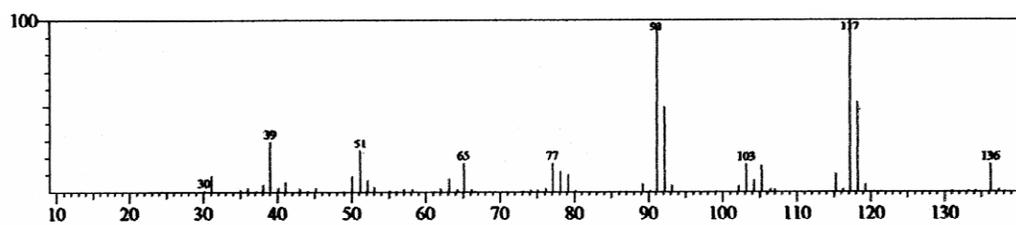


(64b)

Figura 64. (64a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em CDCl_3) de **7'a**; (64b) Espectro EIMS de **7'a**.

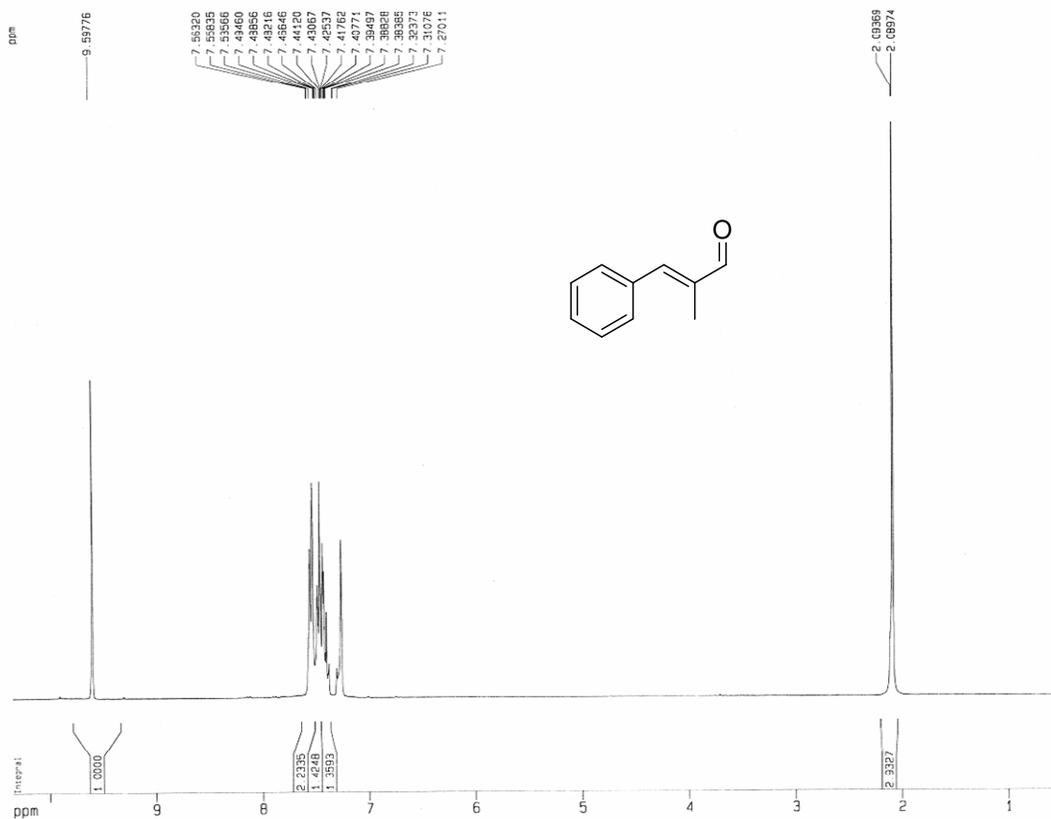


(65a)

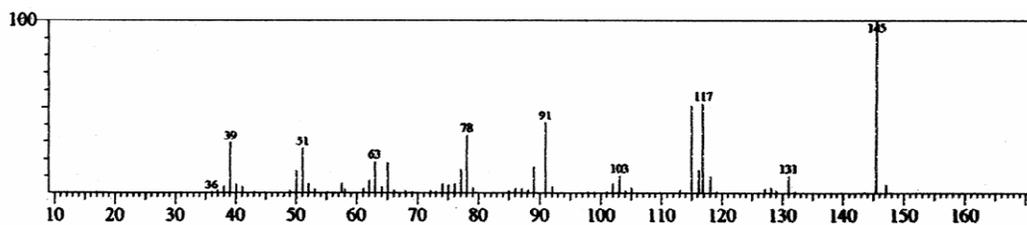


(65b)

Figura 65. (65a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em CDCl_3) de **7'b**; (65b) Espectro EIMS de **7'b**.

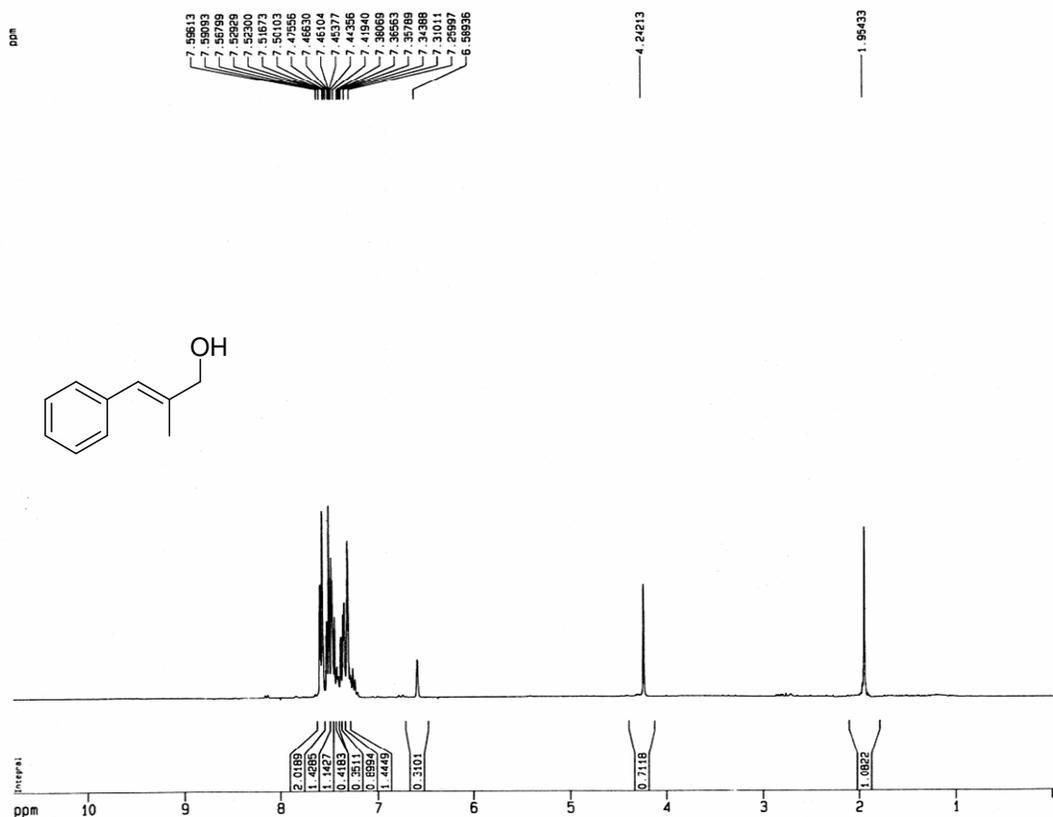


(66a)

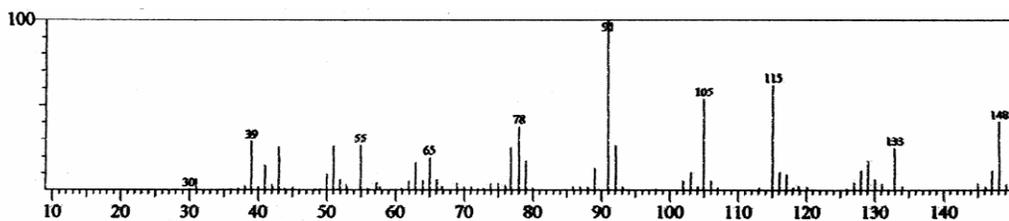


(66b)

Figura 66. (66a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de **8**; (66b) Espectro EIMS de **8**.



(67a)



(67b)

Figura 67. (67a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de **8'**; (67b) Espectro EIMS de **8'**.

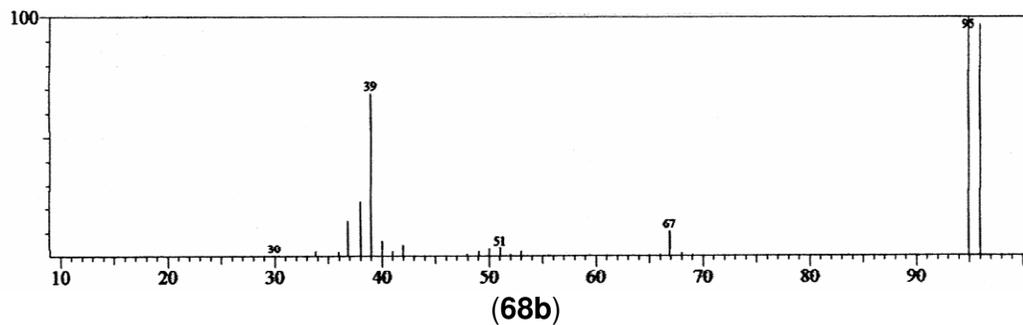
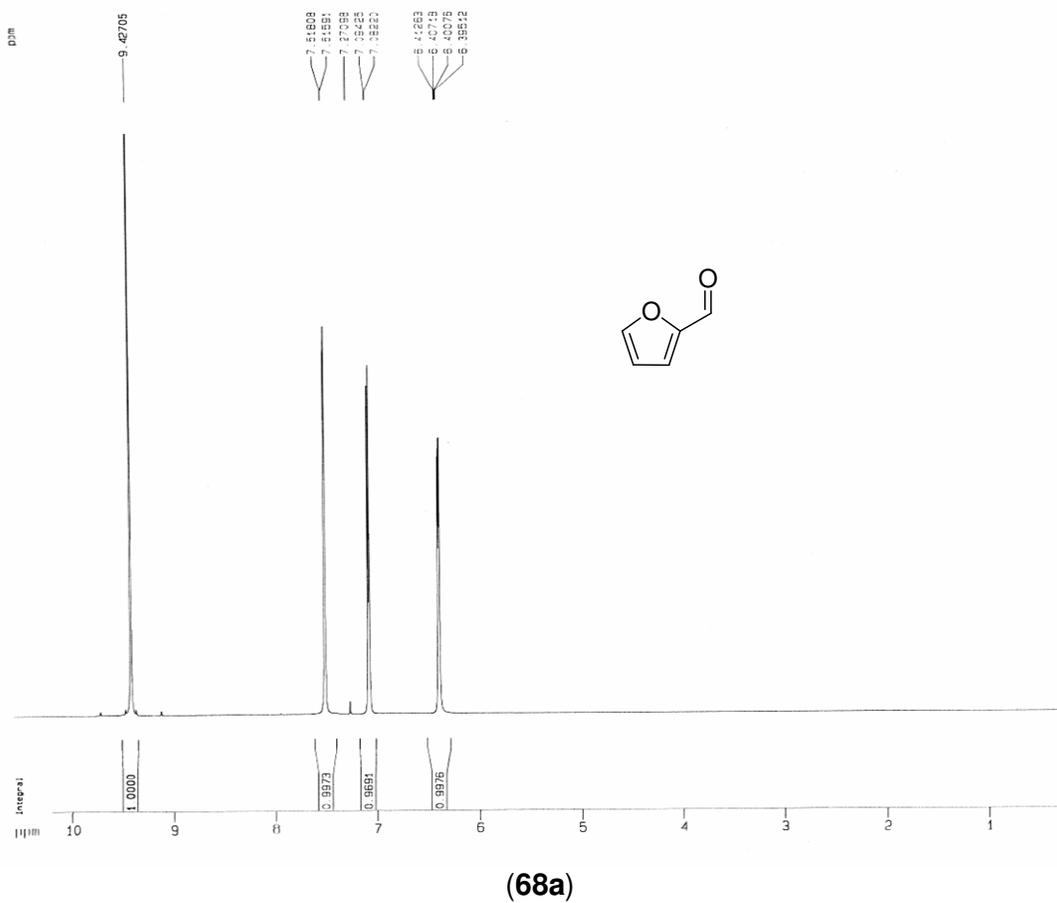
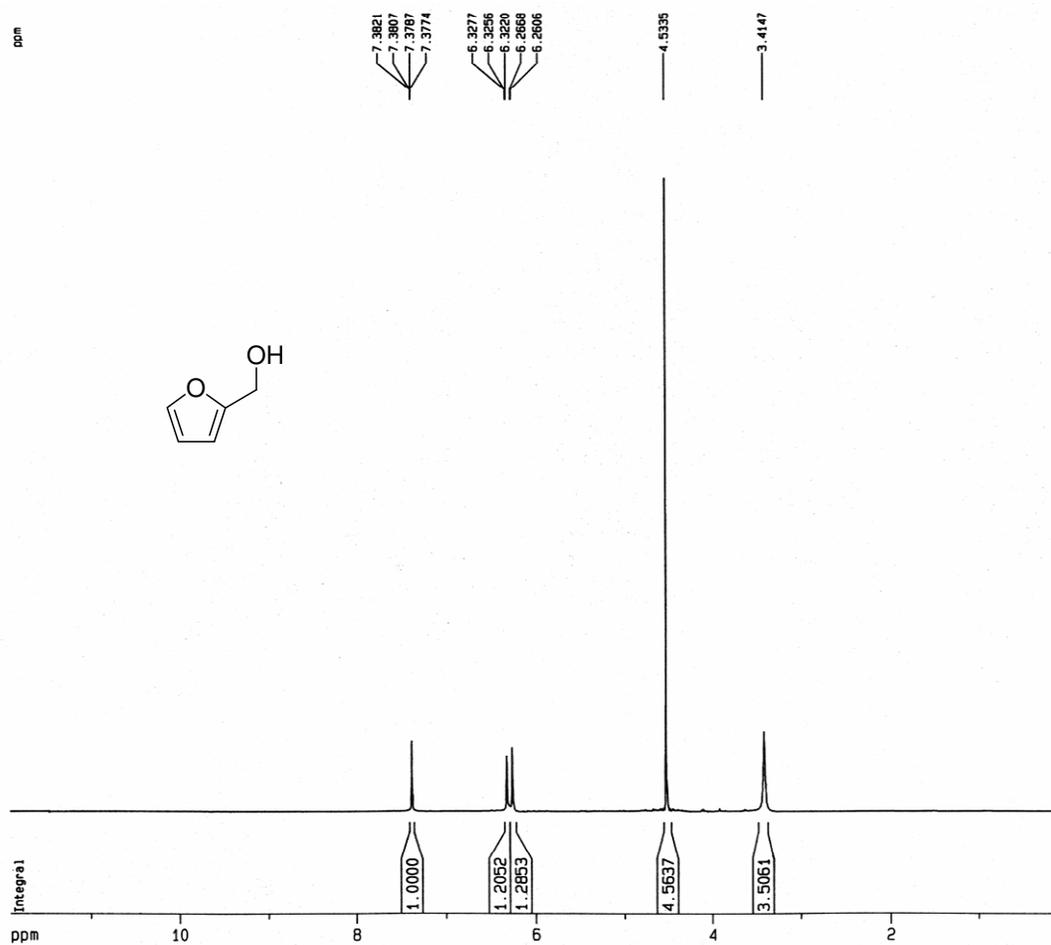
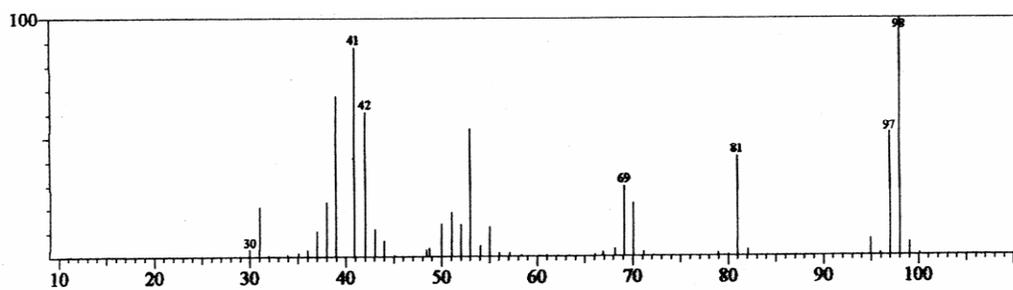


Figura 68. (68a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de **9**; (68b) Espectro EIMS de **9**.

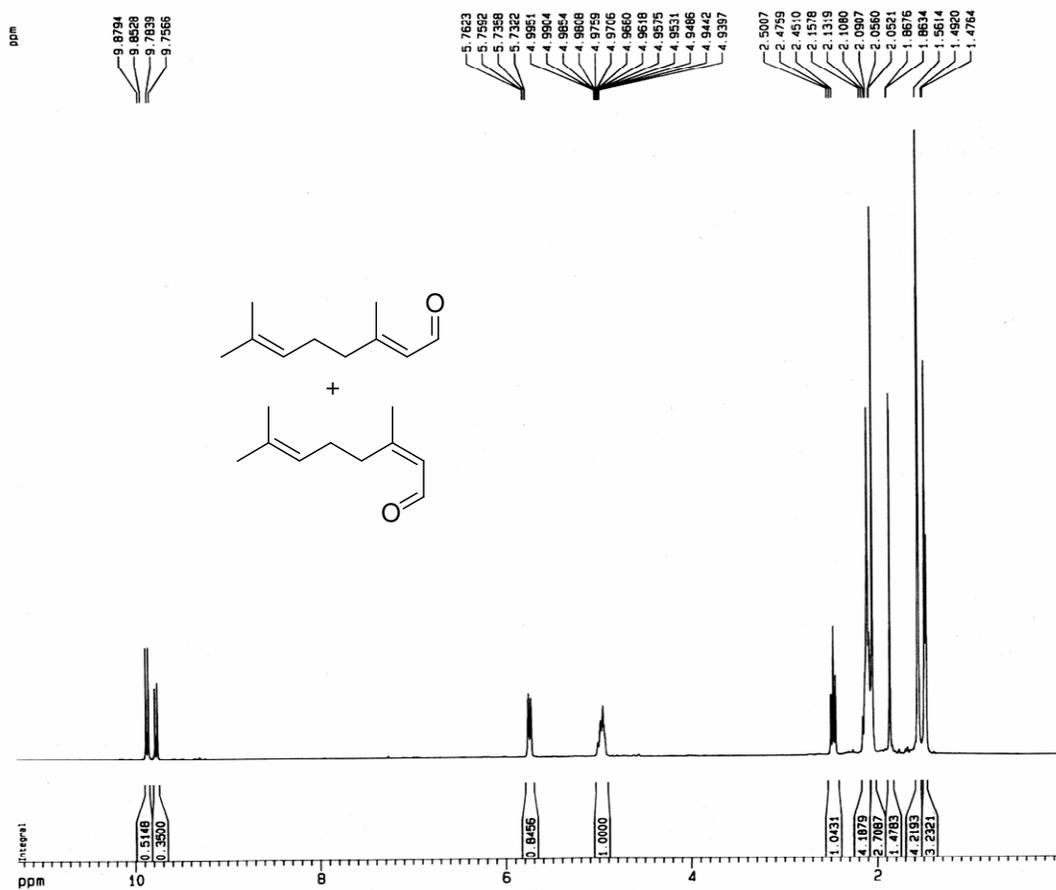


(69a)

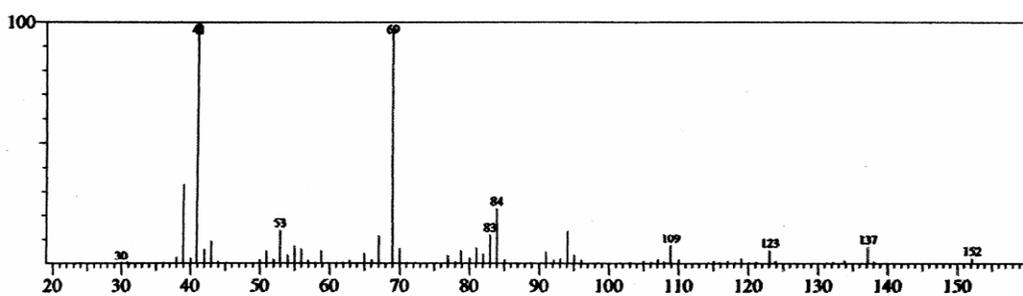


(69b)

Figura 69. (69a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em CDCl_3) de **9'**; (69b) Espectro EIMS de **9'**.

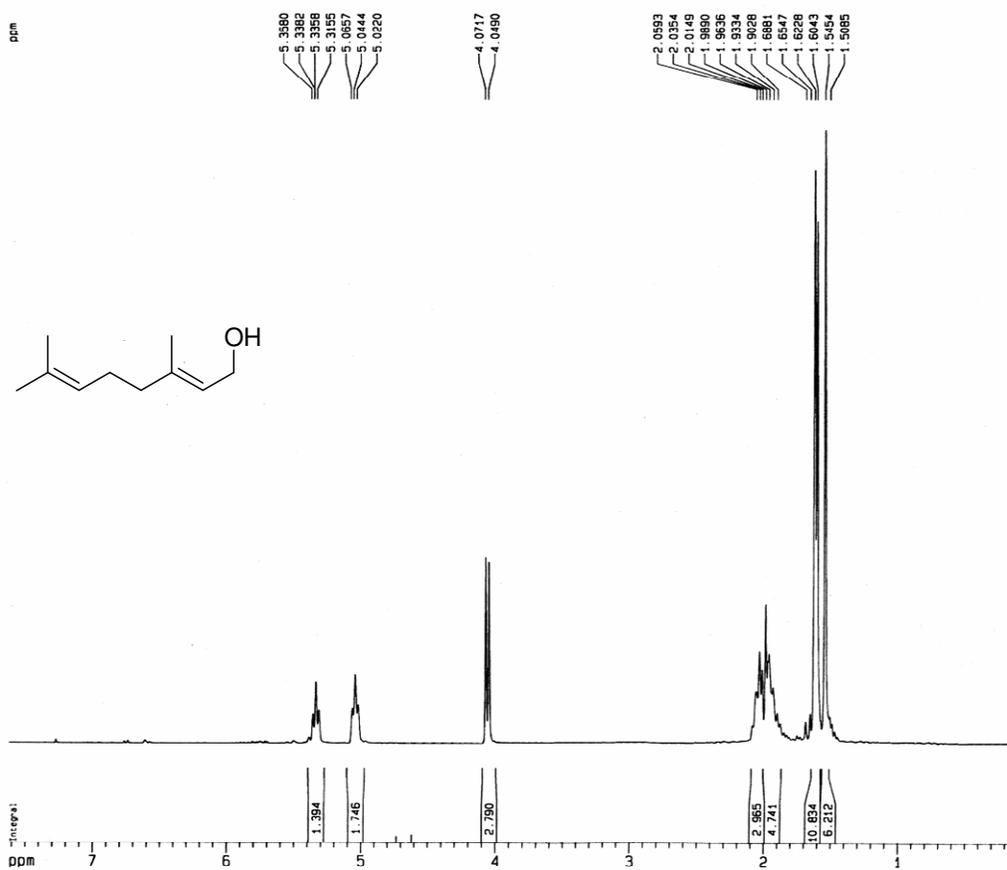


(70a)

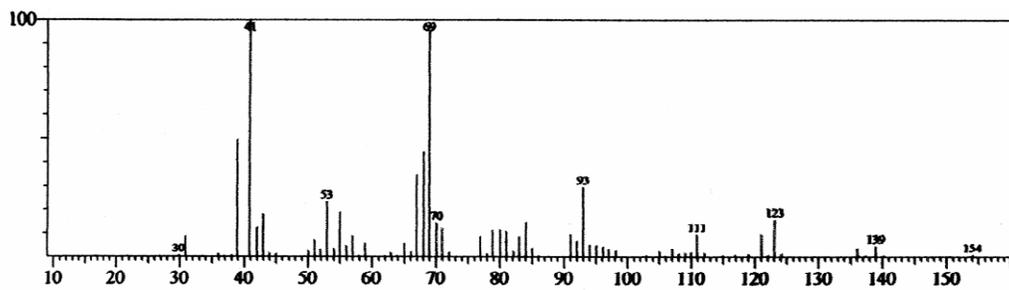


(70b)

Figura 70. (70a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de **10**; (70b) Espectro EIMS de **10**.



(71a)



(71b)

Figura 71. (71a) Espectro de RMN H¹ (500 MHz, em CDCl₃) de 10'; (71b) Espectro EIMS de 10'.

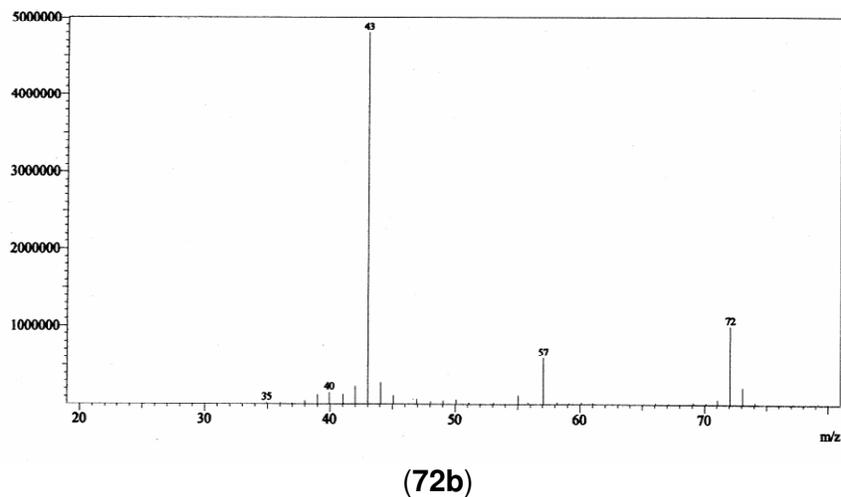
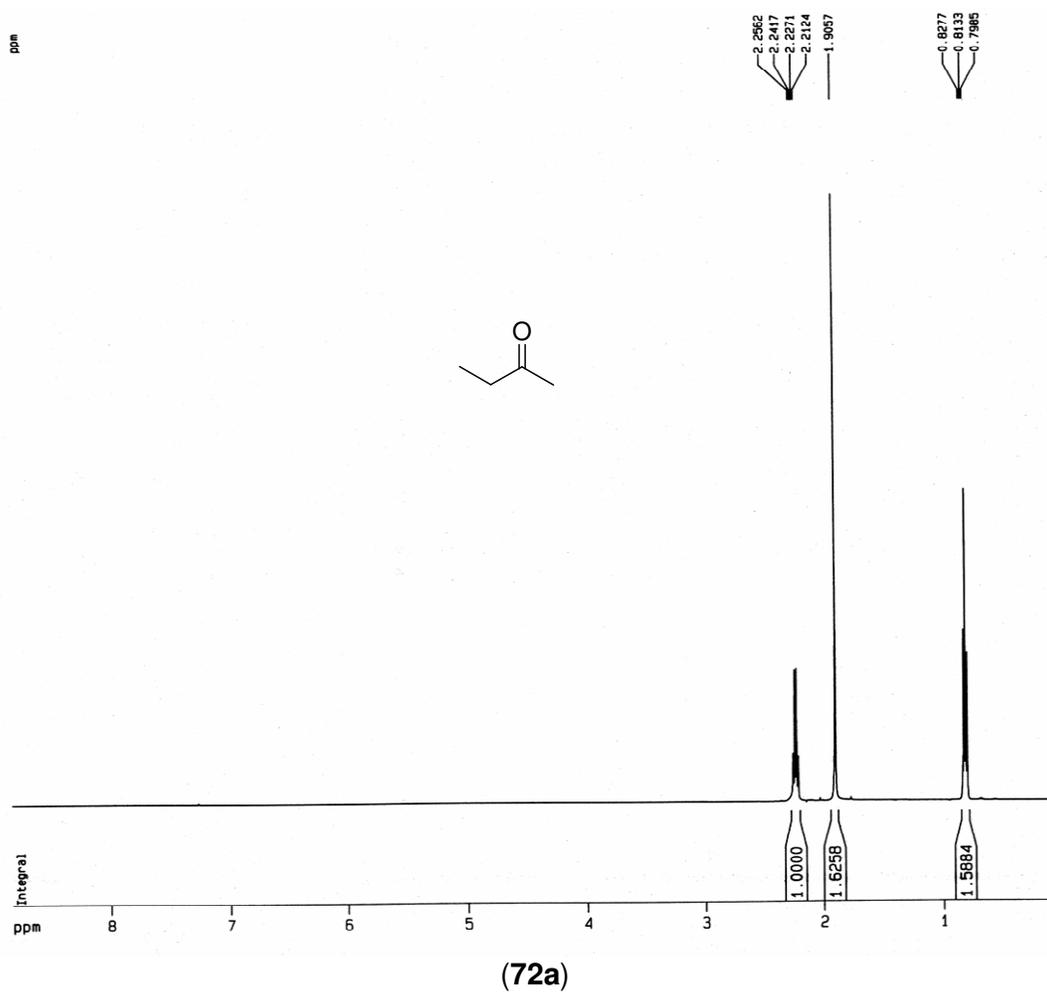
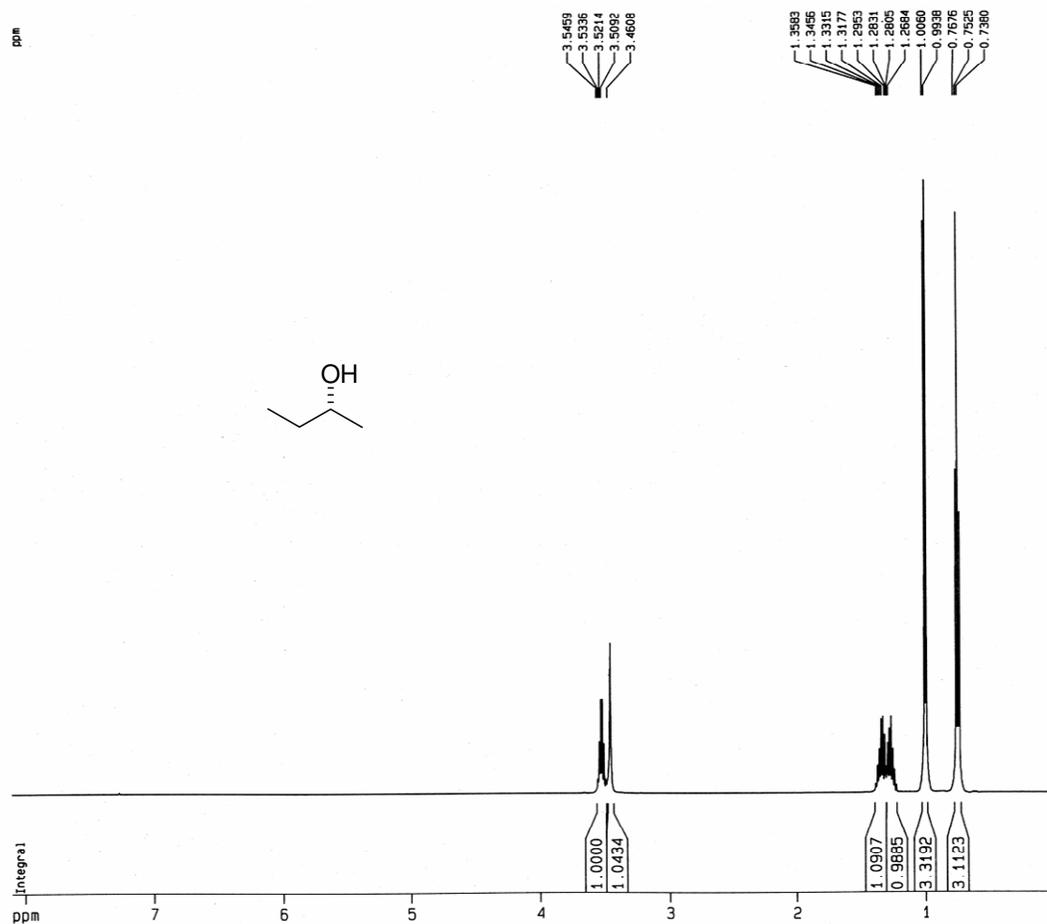
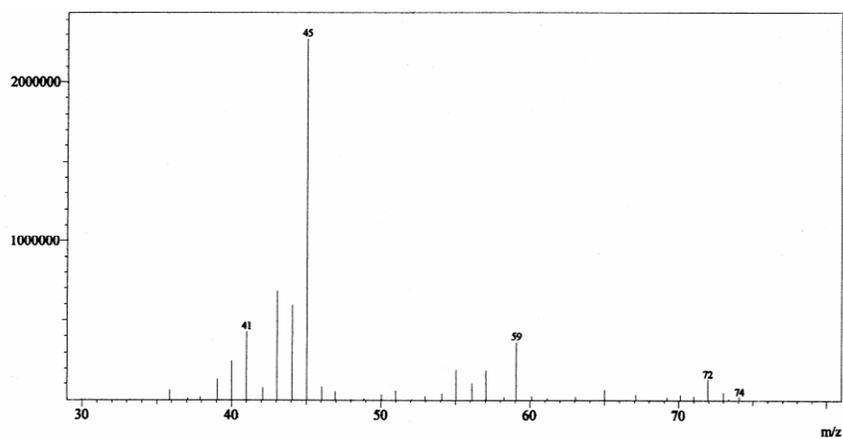


Figura 72. (72a) Espectro de RMN H¹ (500 MHz, em CDCl₃) de 11; (72b) Espectro EIMS de 11.



(73a)



(73b)

Figura 73. (73a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em CDCl_3) de **11'**; (73b) Espectro EIMS de **11'**.

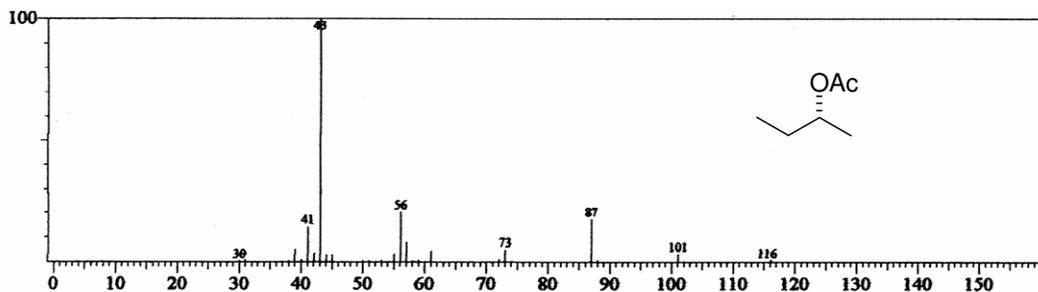


Figura 74. Espectro EIMS de 11' acil.

5.6.1.2. Hidrólise de ésteres e biorredução de β -keto-ésteres

A etapa seguinte foi observar o sistema enzimático com outras carbonilas e grupos funcionais. Os compostos selecionados foram o butirato de etila **12** e um β -keto-éster alifático **13**. Os produtos obtidos para os ésteres foram derivados da hidrólise que corresponderam aos ácidos carboxílicos, um pouco a mais do que a redução dos álcoois.

completa *regio* e o enantioestereoseletividade foram observadas com β -ceto-butirato de etila **13**, com a redução exclusiva do grupo keto em C-3 produzindo o 3S-(+)-hidroxi-butirato de etila **13'** (78%) com um valor da e.e. 99%. A hidrólise enzimática do éster **12** pela água-de-coco (ACC) foi completamente eficaz para um éster alifático que rendeu o ácido butírico **12'** (66%).

A seguir estão relacionados os espectros de RMN ^1H dos compostos de partida (**12-13**) e dos respectivos álcoois obtidos por redução e os espectros de massa dos produtos resultantes da biorredução dos compostos **12'-13'** (**Figuras 75-78, p. 96-99**).

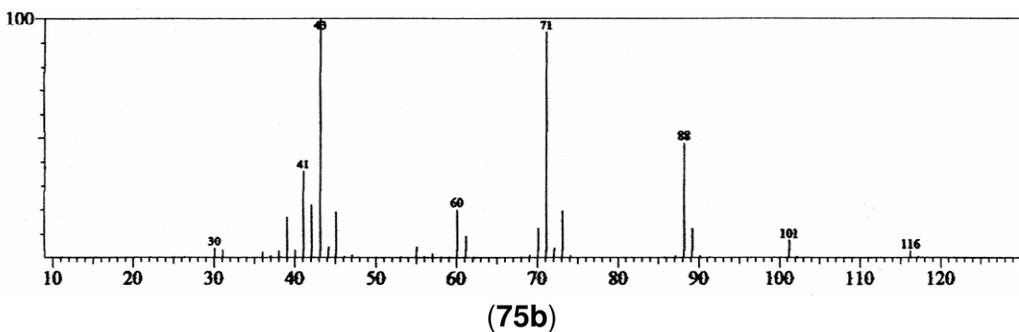
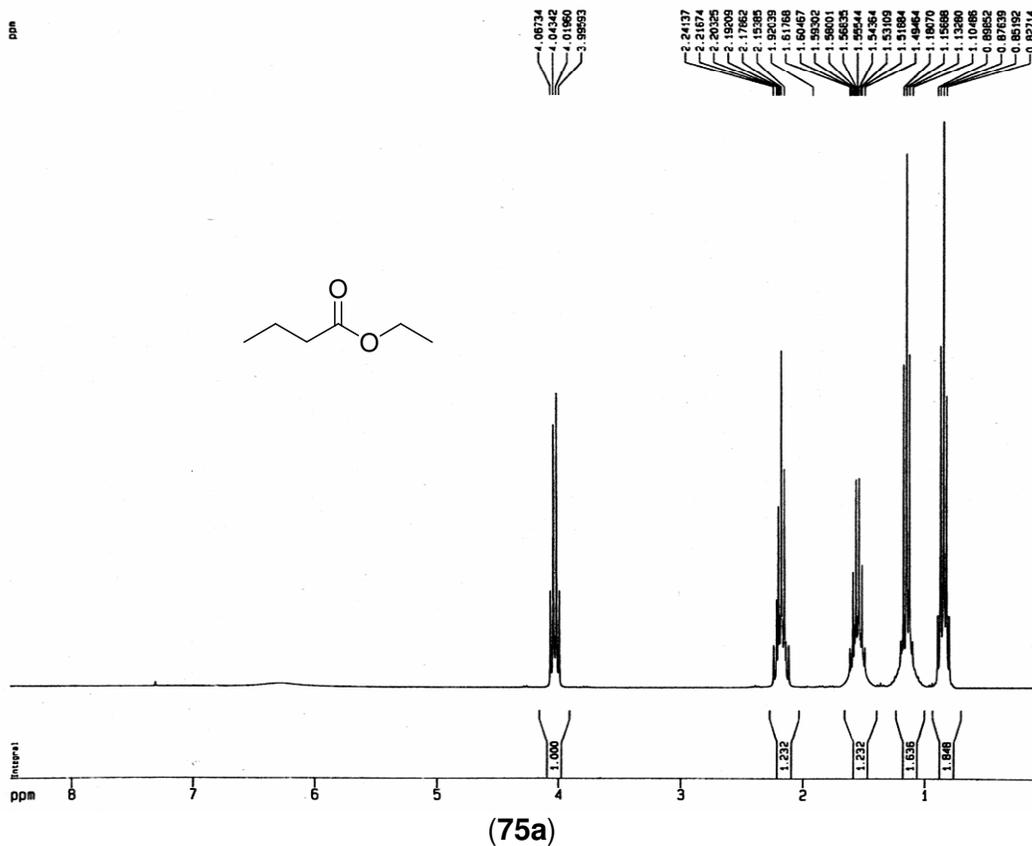


Figura 75. (75a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de **12**; (75b) Espectro EIMS de **12**.

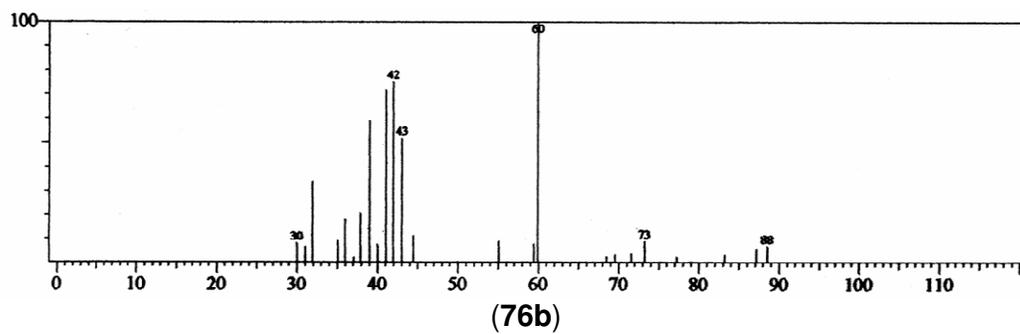
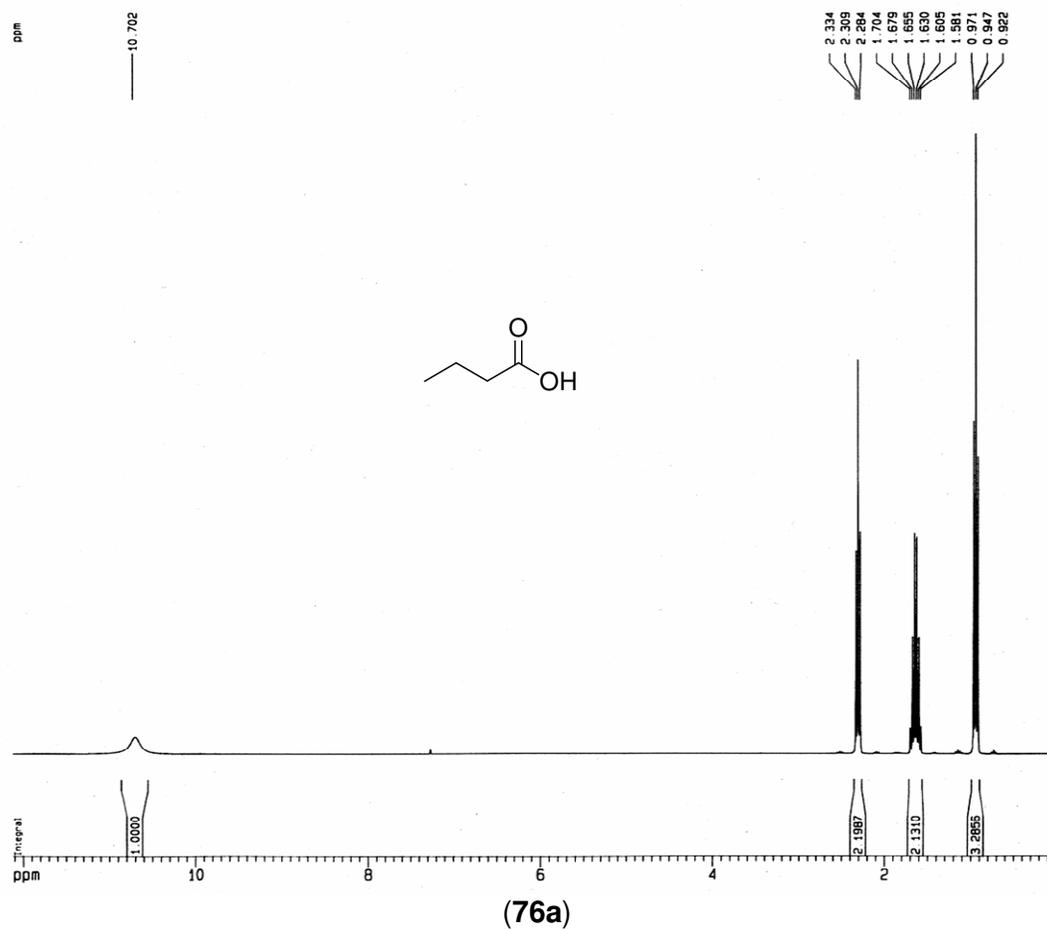
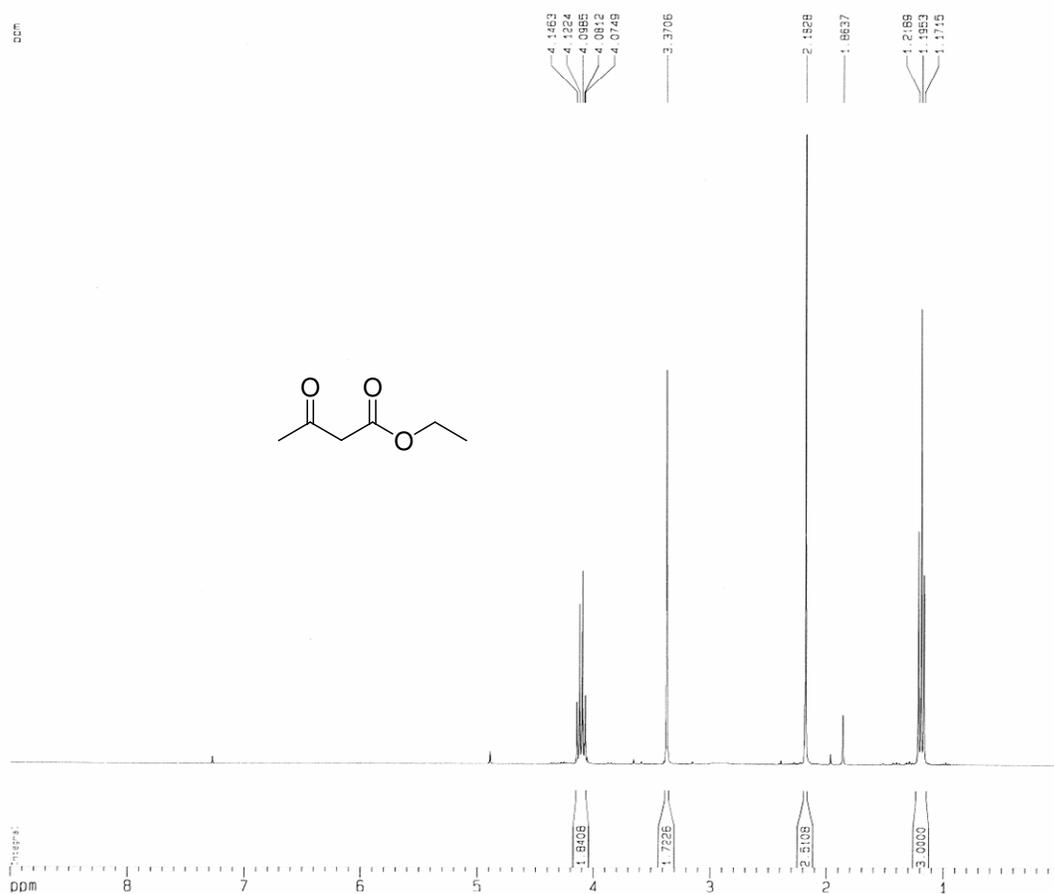
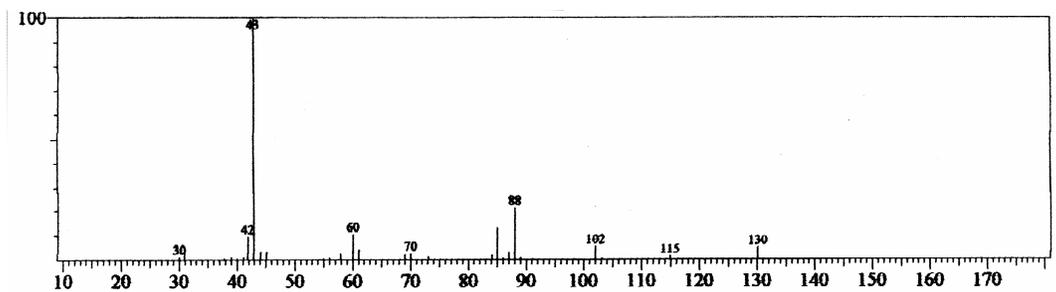


Figura 76. (76a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de $12'$; (76b) Espectro EIMS de $12'$.



(77a)



(77b)

Figura 77. (77a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de **13**; (77b) Espectro EIMS de **13**.

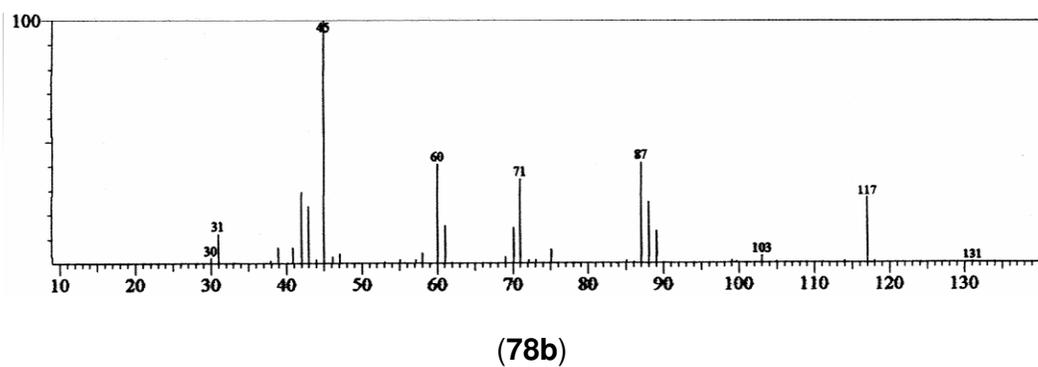
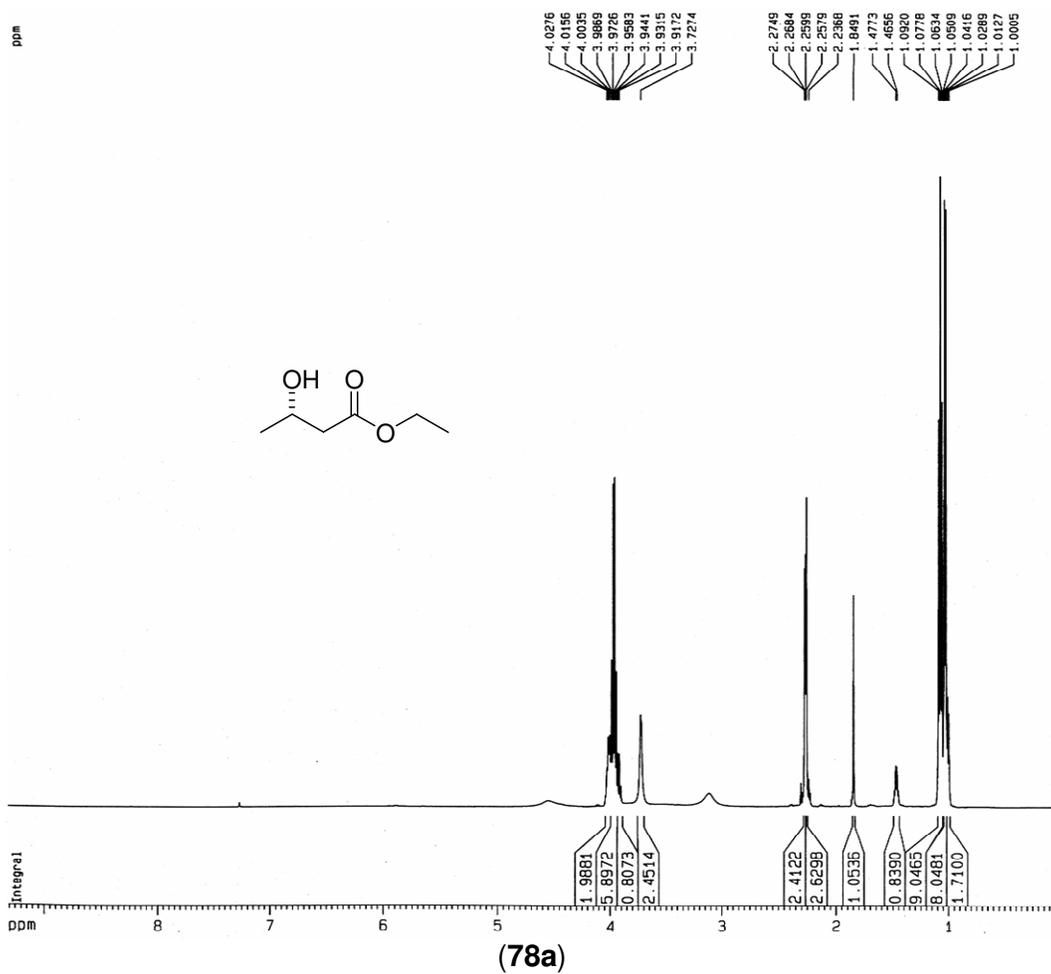
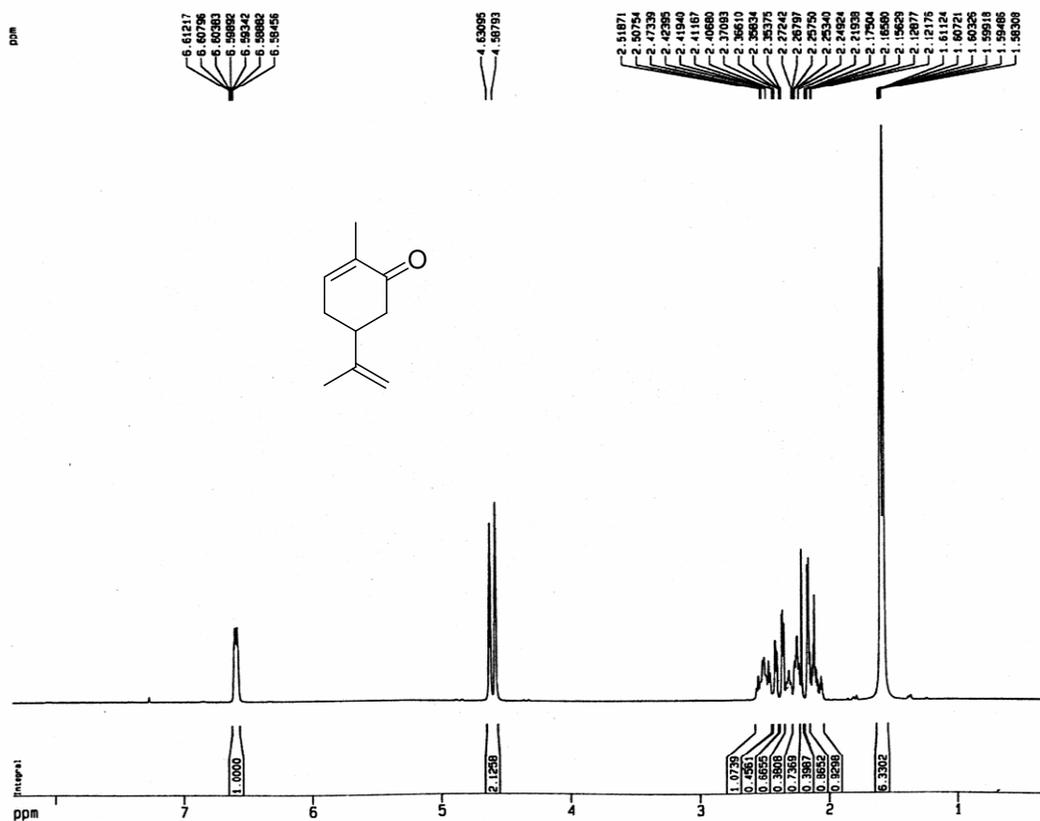


Figura 78. (78a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de $13'$; (78b) Espectro EIMS de $13'$.

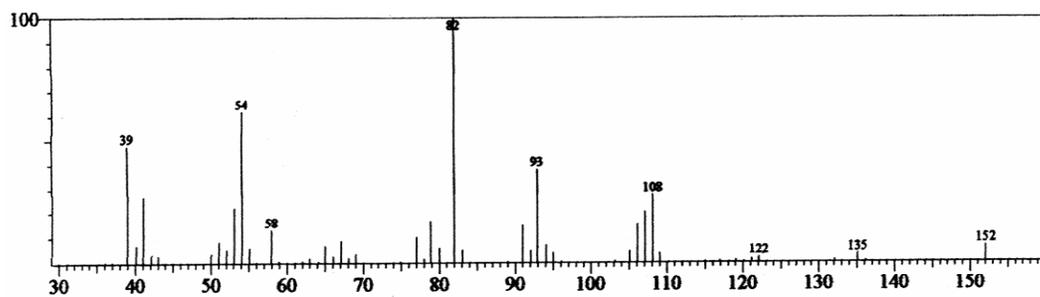
5.6.1.3. Biorreduções com cetonas cíclicas α,β -insaturadas

As reações enzimáticas foram estendidas às cetonas α,β -insaturadas alifáticas: pulegona (**14**) e carvona (**15**).

A redução da cetona α,β -insaturada **14** (carvona), foi *regio* e estereoseletiva com baixo rendimento produzindo **14'** (*S*-(-)-carveol) com rendimento de 12%; entretanto, com e.e. elevada de 99% e uma configuração de “*S*”. Para o composto **15** (pulegona), a redução ao álcool **15'** (*R*-(+)-pulegol) foi igualmente *regio* e enantioseletiva; entretanto, era somente moderadamente eficaz, com rendimento de 47%, e e.e. de 56%, com configuração “*R*”. A seguir estão relacionados os espectros de RMN ^1H dos compostos de partida (**14-15**) (cetonas) e dos respectivos alcoóis obtidos por redução e os espectros de massa dos produtos resultantes da biorredução dos compostos **14'-15'** (**Figuras 79-82, p. 101-104**).

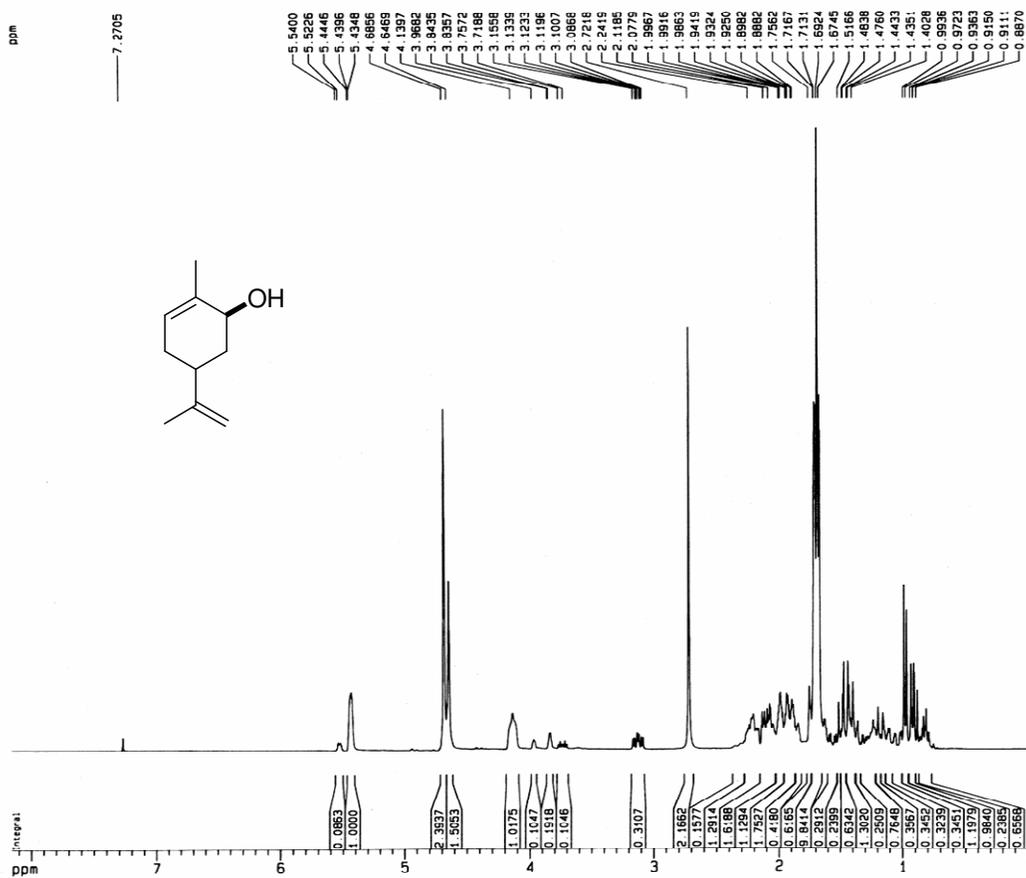


(79a)

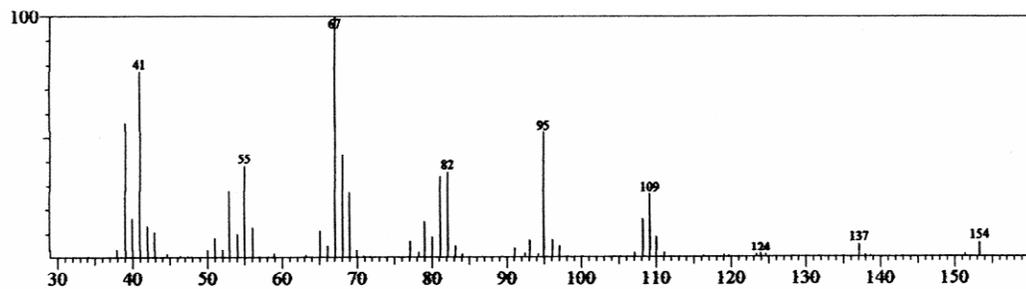


(79b)

Figura 79. (79a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de **14**; (79b) Espectro EIMS de **14**.

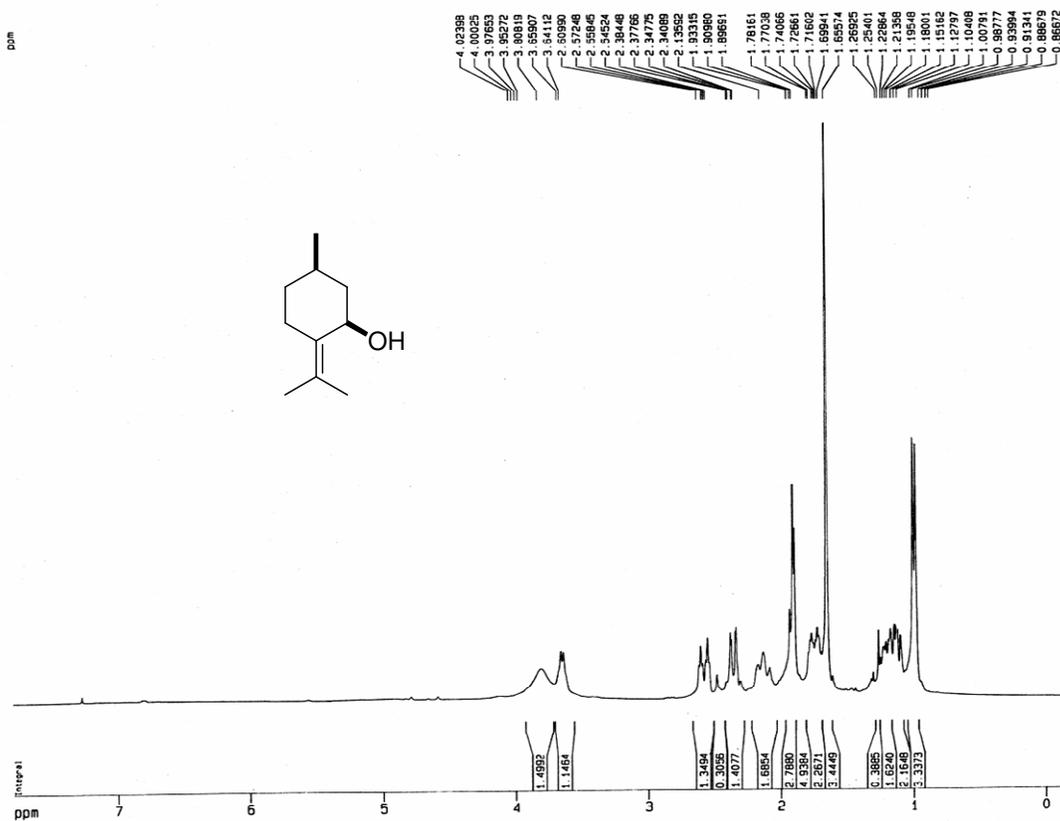


(80a)

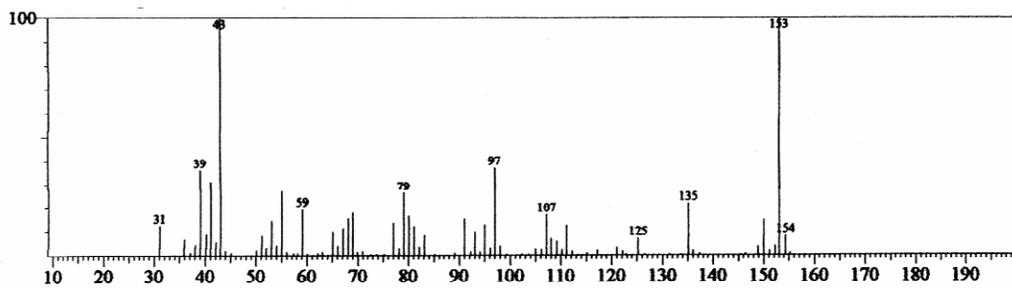


(80b)

Figura 80. (80a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de $14'$; (80b) Espectro EIMS de $14'$.



(82a)



(82b)

Figura 82. (82a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de 15'; (82b) Espectro EIMS de 15'.

5.6.1.4. Biorreduções com cetonas cíclicas

O composto **16** (ciclohexanona) produziu uma mistura de dois produtos, o álcool previsto **16'a** (ciclohexanol) com 64%, e um inesperado cetal **16'b** (ciclohexanona-2,3-butileno cetal) com 36%. A formação de **16'b** pode ser atribuída à presença de butano-2,3-diol, identificada por CG/EM na composição química da água-de-coco (ACC) (FONSECA et al., 2007; FONSECA et al., 2009). Estes resultados foram examinados através de um estudo cinético, **Fig. 83, p. 105**, onde a conversão máxima **16'a** foi observada após 72h, visto que para **16'b** o rendimento foi obtido após 48h, com uma diminuição a zero até 72h.

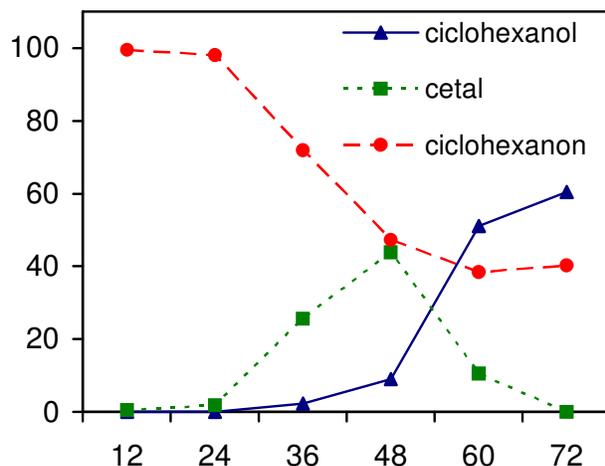
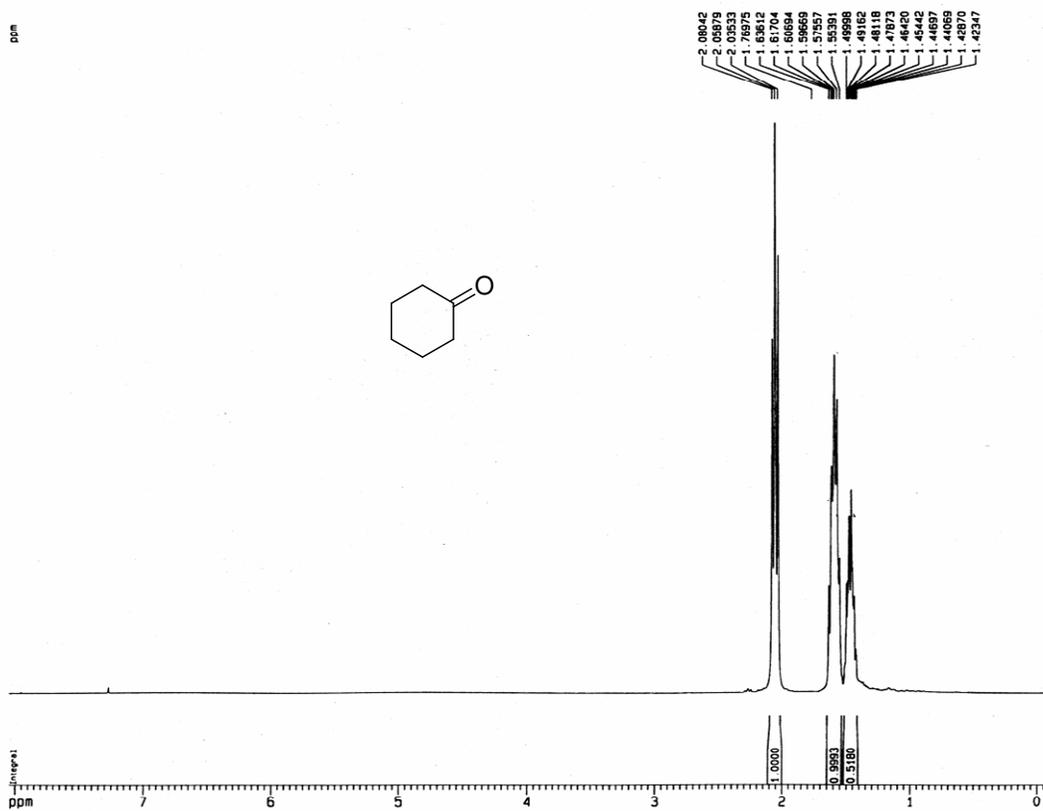


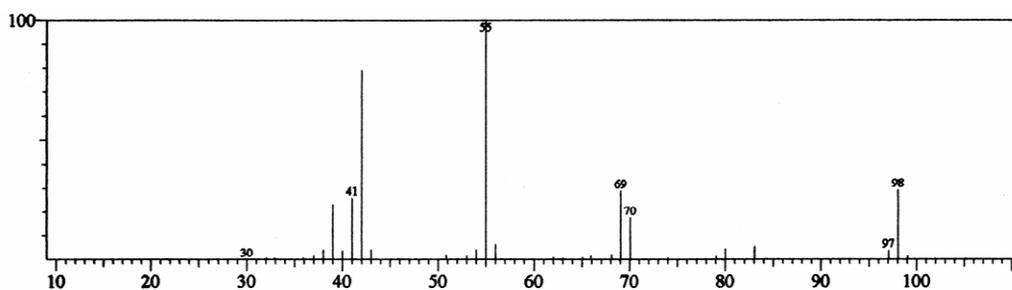
Figura 83. Bioconversão da ciclohexanona (**16**): ao correspondente álcool (ciclohexanol **16'a**), e um cetal (ciclohexanona-2,3-butileno cetal **16'b**) usando ACC na temperatura ambiente.

A formação do cetal **16'b** apresenta um máximo com 48 horas e 43% e a partir deste período apresenta uma redução. Já o álcool **16'a** tem com 48 horas um rendimento de 9% e apresenta seu máximo de rendimento de 62% com 72 horas. Porém com a outra cetona cíclica, a ciclopentanona **17**, só foi observado a formação do ciclopentanol, **17'**. A seguir estão relacionados os espectros de RMN ^1H dos compostos de partida (**16-17**) (cetonas) e dos respectivos alcoóis

obtidos por redução e os espectros de massa dos produtos resultantes da biorredução dos compostos (16'a/16'b-17') (Figuras 84-88, p. 106-110).



(84a)



(84b)

Figura 84. (84a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de **16**; (84b) Espectro EIMS de **16**.

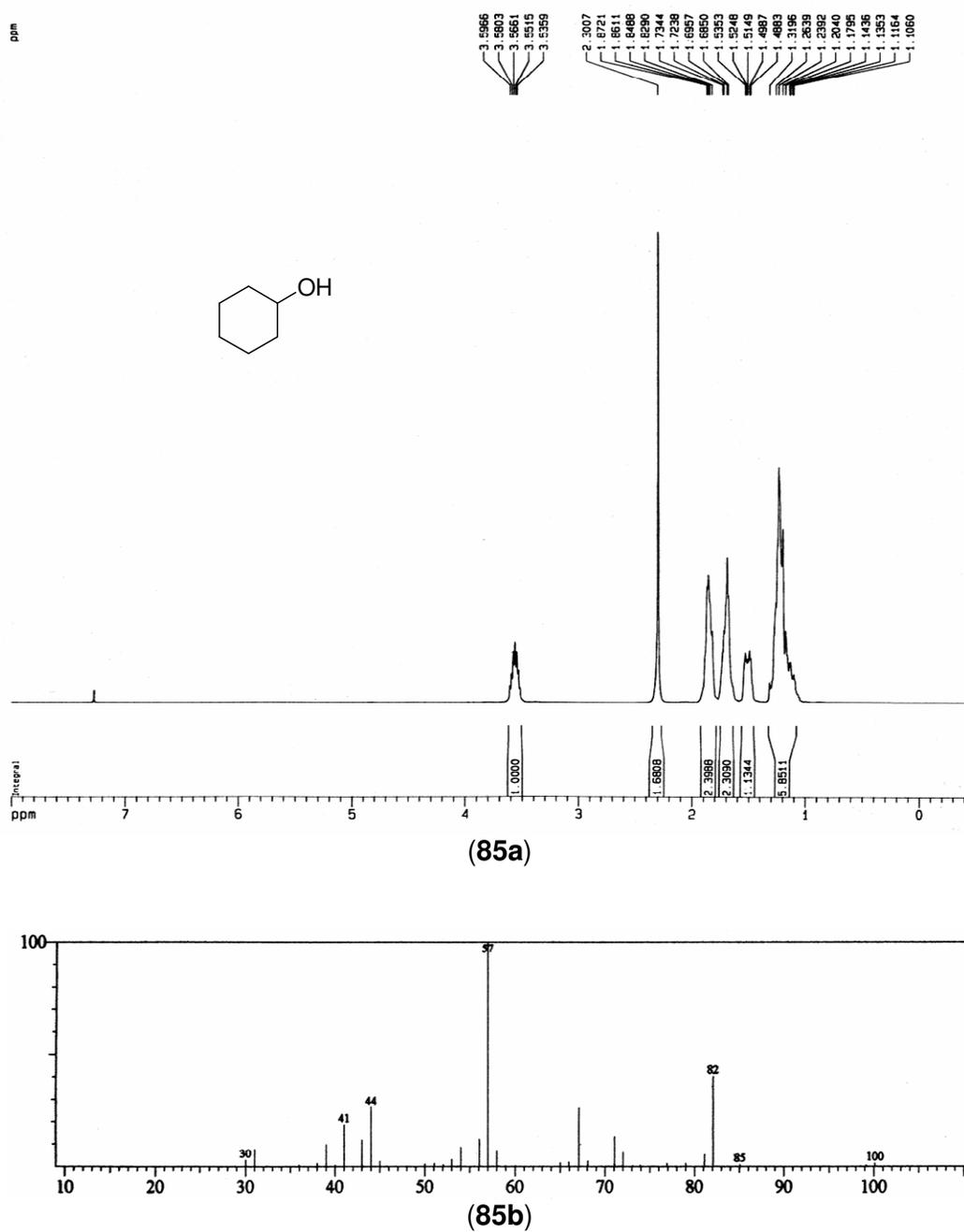
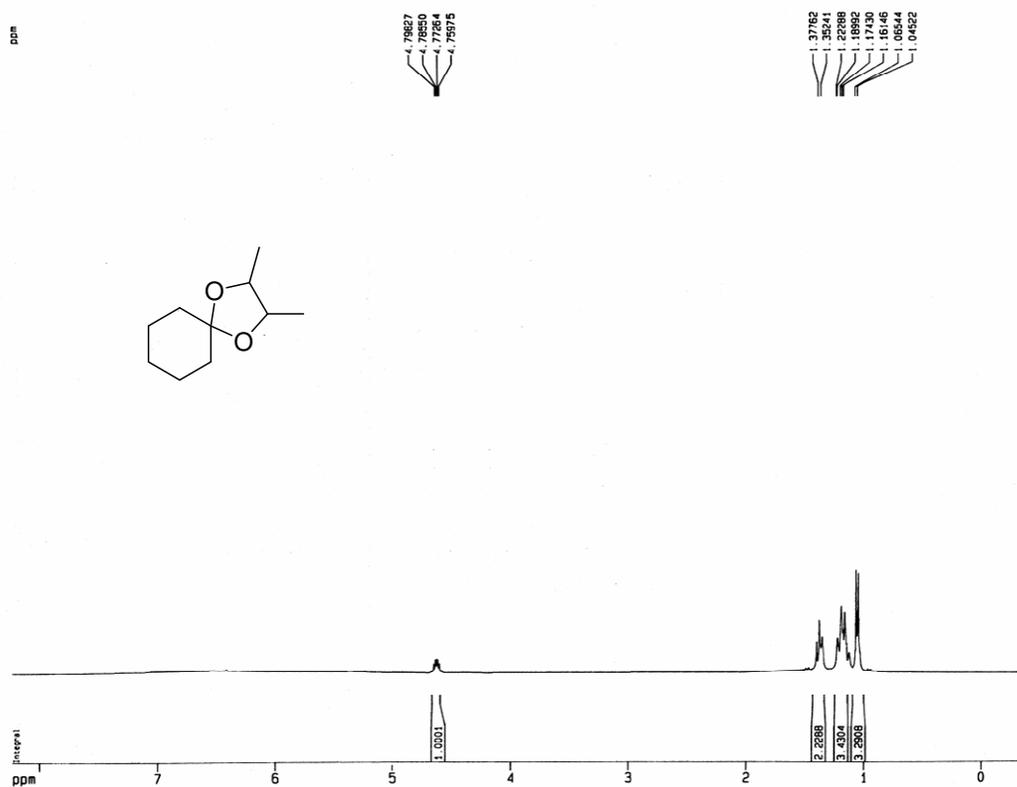
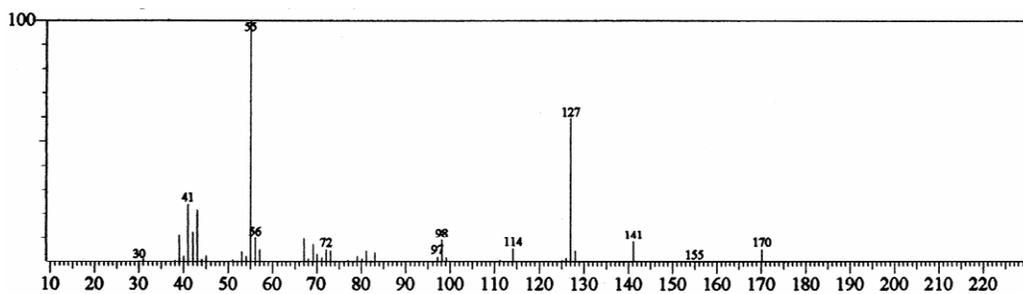


Figura 85. (85a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em CDCl_3) de 16'a; (85b) Espectro EIMS de 16'a.

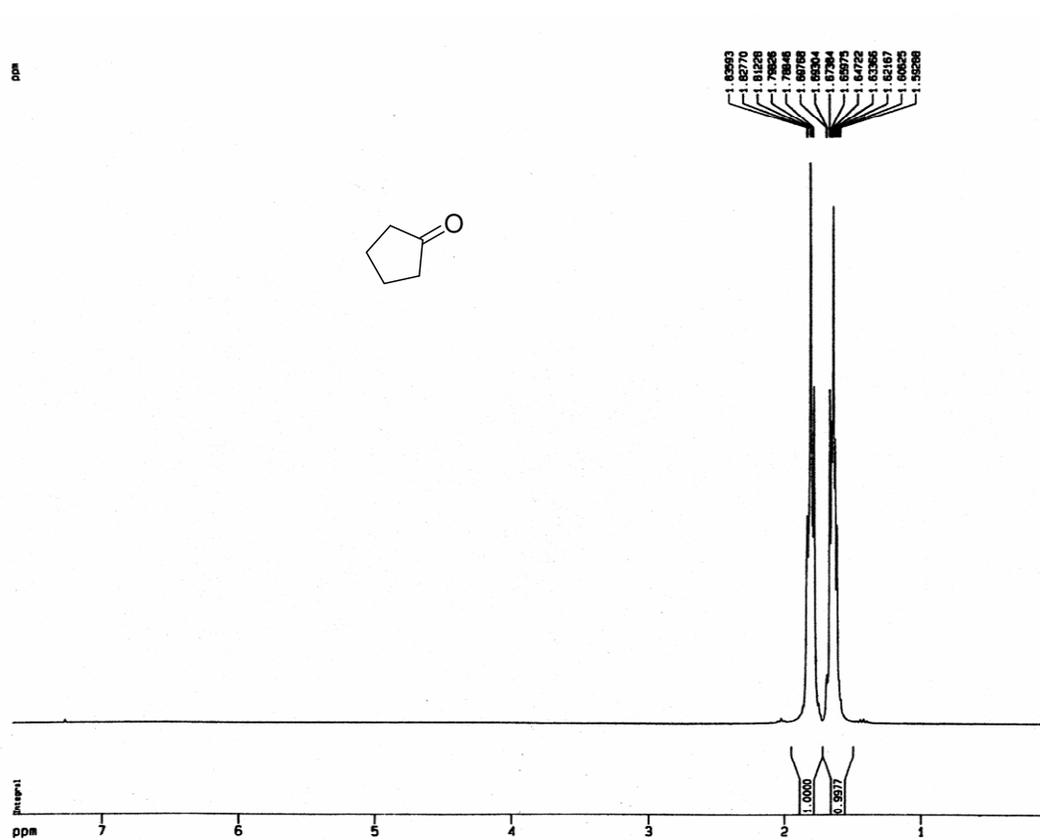


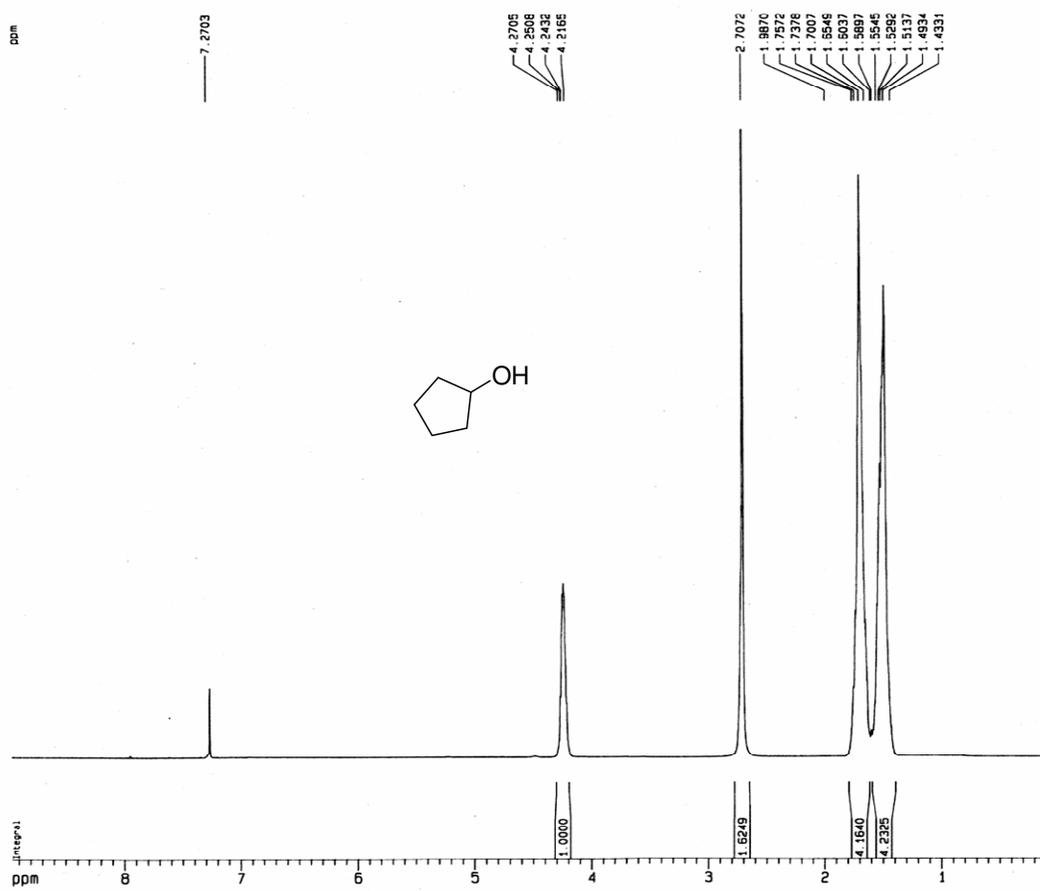
(86a)



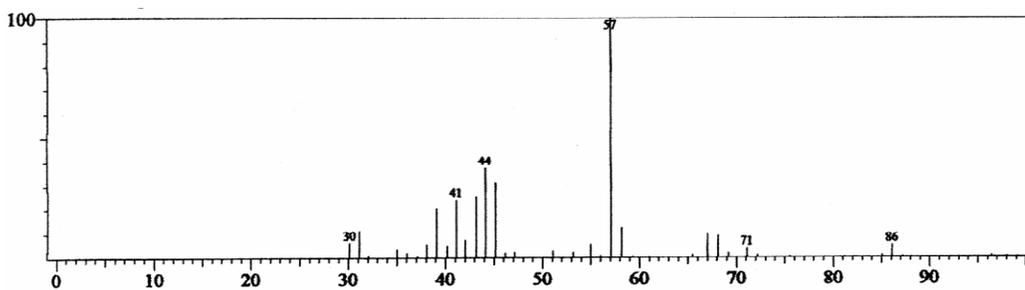
(86b)

Figura 86. (86a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em CDCl_3) de **16'b**; (86b) Espectro EIMS de **16'b**.





(88a)

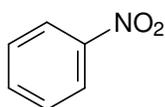
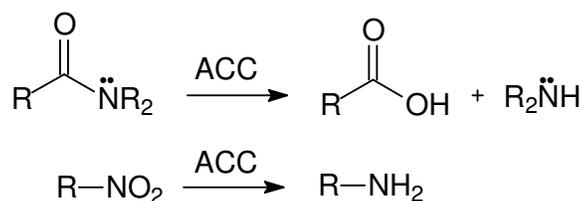


(88b)

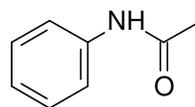
Figura 88. (88a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de $17'$; (88b) Espectro EIMS de $17'$.

5.6.1.5. Biorreduções com nitrocompostos e amidas

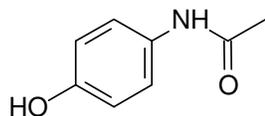
As reações de bioconversões usando água-de-coco foram então expandidas para compostos contendo grupo nitro e amidas. Foram eles: nitrobenzeno **18**, acetanilida **19**, 4-hidroxiacetanilida **20**, 4-nitroacetanilida **21** e a benzamida **22**. Para as amidas, o objetivo foi a formação do ácido carboxílico e/ou aminas correspondentes. E o composto nitro, a possível redução do grupo nitro.



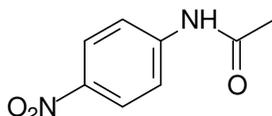
nitro benzeno



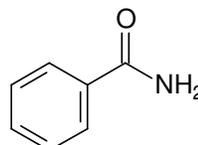
acetanilida



4-hidroxiacetanilida



4-nitroacetanilida

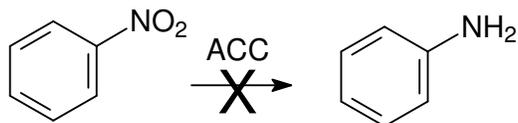


benzamida

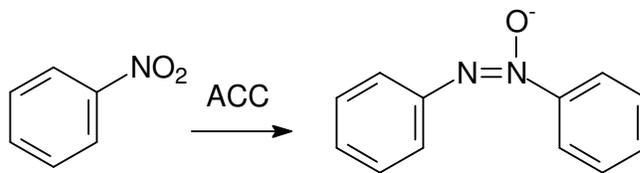
Os experimentos foram realizados semelhantes aos descritos para reação de redução e são discutidos a seguir.

5.6.1.5.1. Biorredução de grupos Nitro e Amidas.

Continuando o estudo de conversão usando água-de-coco, selecionadas desta vez o nitrobenzeno **18**, objetivando verificar a redução ao grupo amino.



A reação foi realizada usando metodologia empregada para reduções. Neste caso específico não observamos a redução do nitro e foi obtido um inesperado produto que foi identificado como um derivado azoxi dimérico **18'** (diazeno difenil-1-óxido).



O produto obtido foi identificado como um produto de dimerização do composto nitrado com obtenção do novo composto azo-derivativo.

Não existe na literatura nenhum registro de dimerização usando células íntegras. Este produto não tem sido relatado previamente de nenhum processo biocatalítico, e foi identificado com os dados espectroscópicos de 1D/2D RMN e EMIE, que estão relacionados a seguir os seus valores de HSQC e HMBC na **Tabela 10, p. 113** e nas **Figuras 89-95 (p.114-120)**.

Tabela 10. Dados de *gHSQC* e *gHMBC* do composto **18'** (em CDCl_3)

	<i>gHSQC</i>		<i>gHMBC</i>	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\delta_{\text{CH}}$	$^3\delta_{\text{CH}}$
C				
1	148,60		H-2/H-6	H-3/H-5
1'	144,25		H-2'/H-6'	H-3'/H-5'
CH				
2/6	123,95	8,32 (m)		H-4
3/5	130,40	7,53 (m)		
4	133,19	7,58 (m)		H-2/H-6
2'/6'	127,12	8,18 (m)		H-4'
3'/5'	130,30	7,50 (m)		
4'	131,21	7,41 (m)		H-2'/H-6'

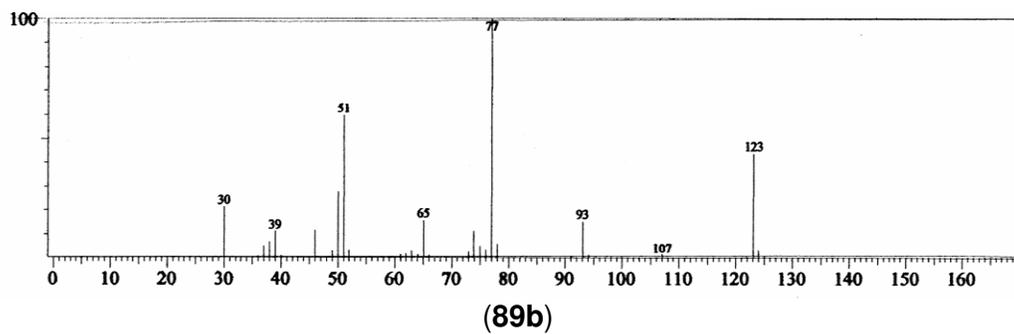
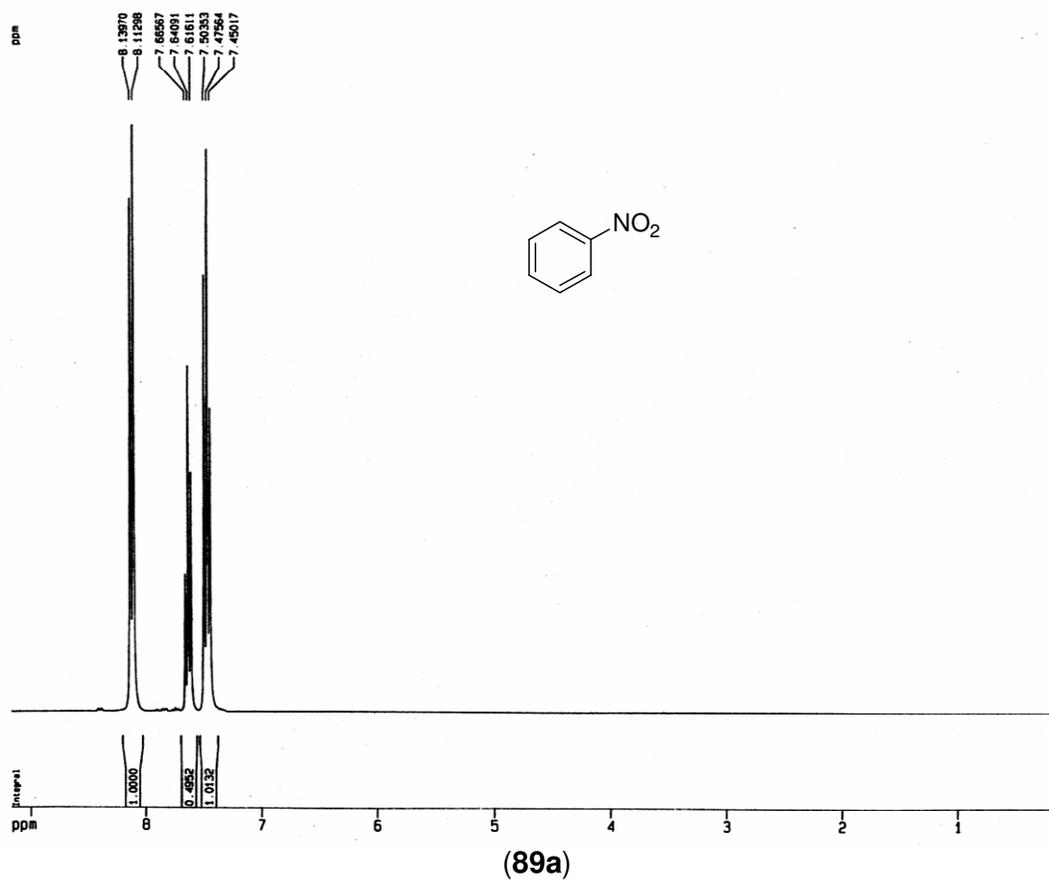
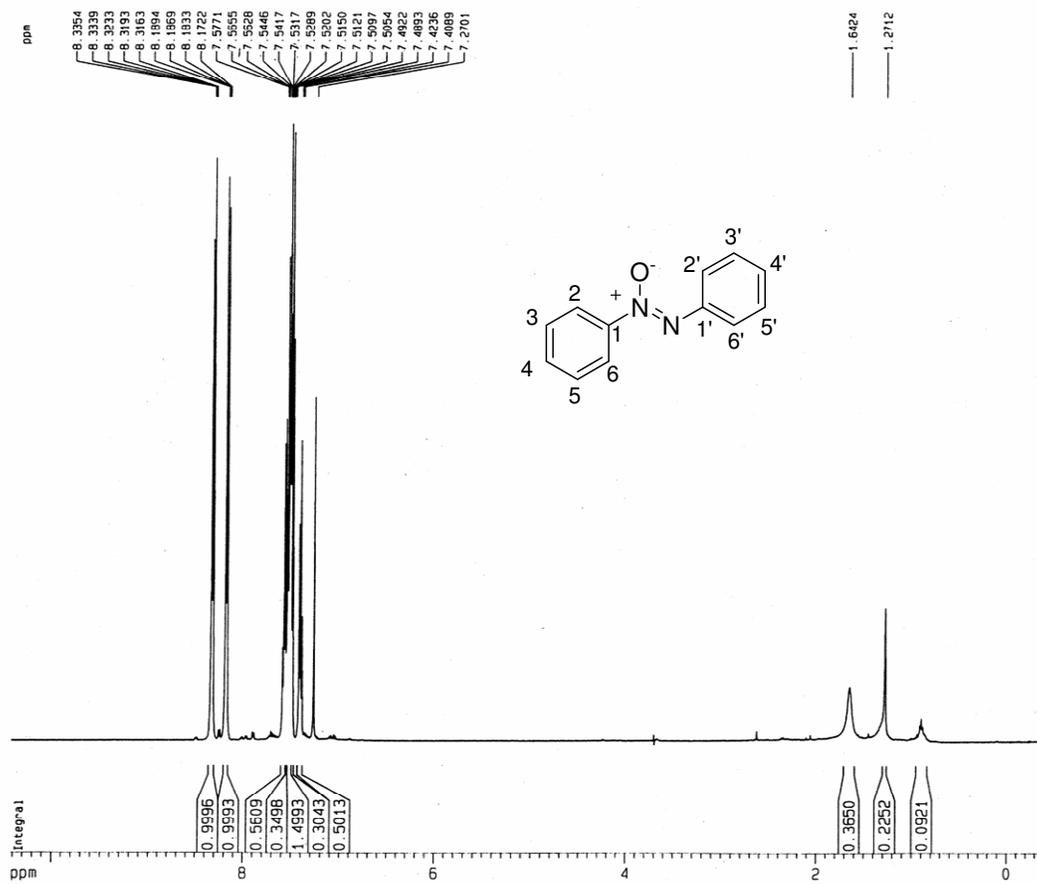
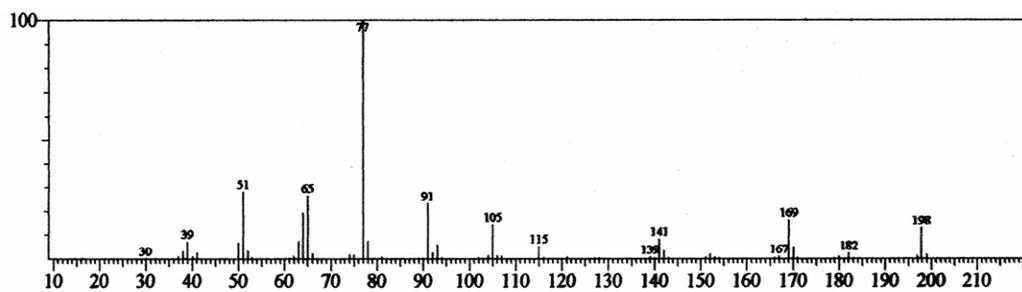


Figura 89. (89a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de **18**; (89b) Espectro EIMS de **18**.



(90a)



(90b)

Figura 90. (90a) Espectro de RMN H^1 (500 MHz, em $CDCl_3$) de $18'$; (90b) Espectro EIMS de $18'$.

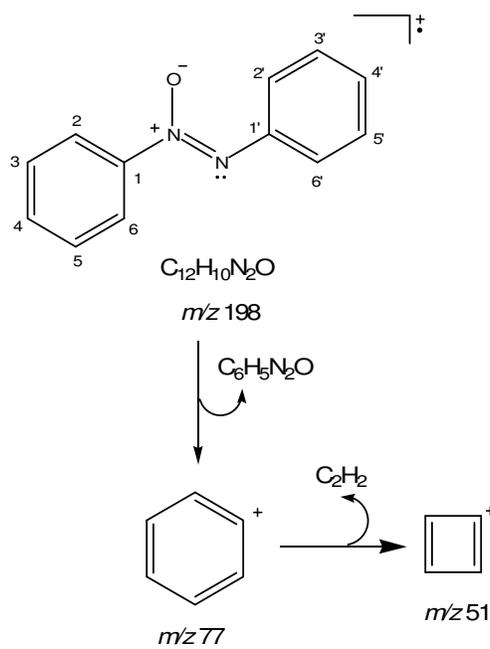


Figura 91. Fragmentações de **18'**.

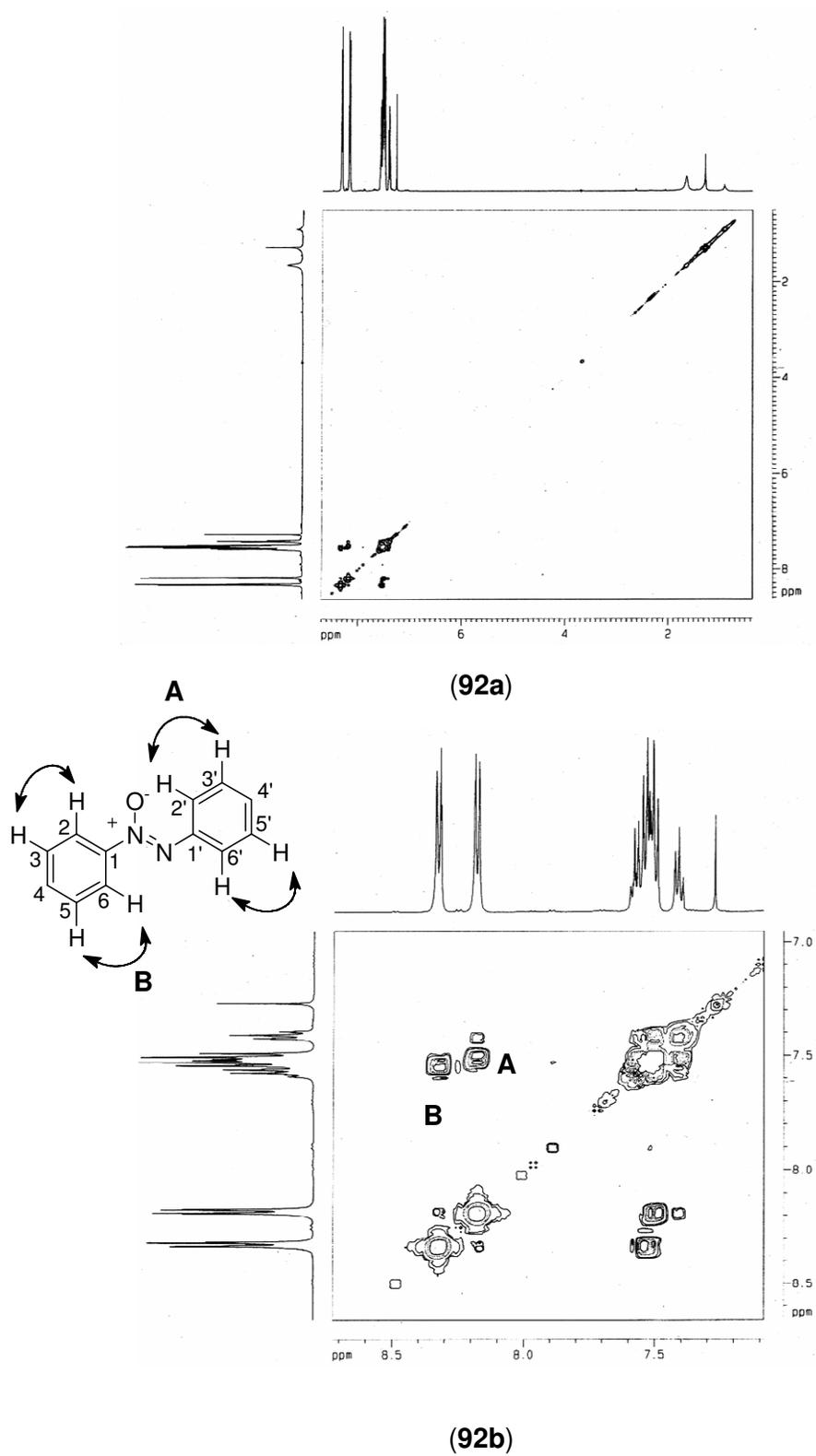


Figura 92. (92a) e (92b) Espectro COSY (500 MHz, CDCl₃) de 18'.

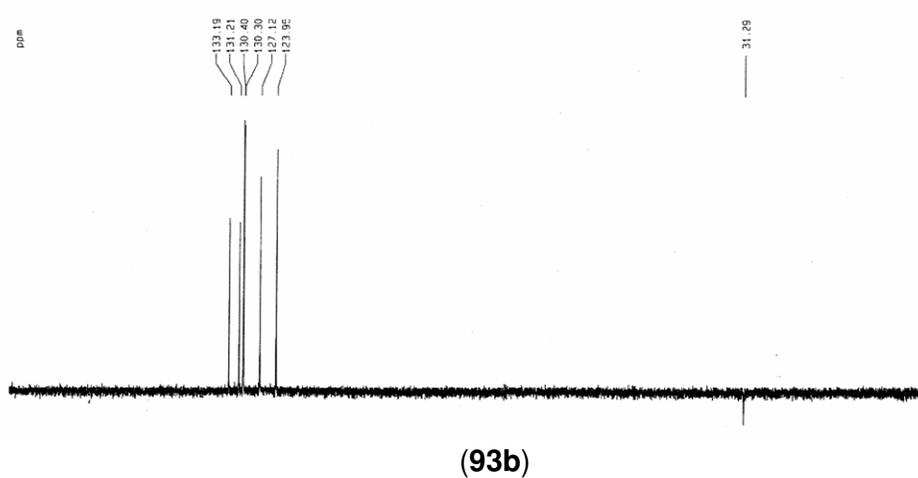
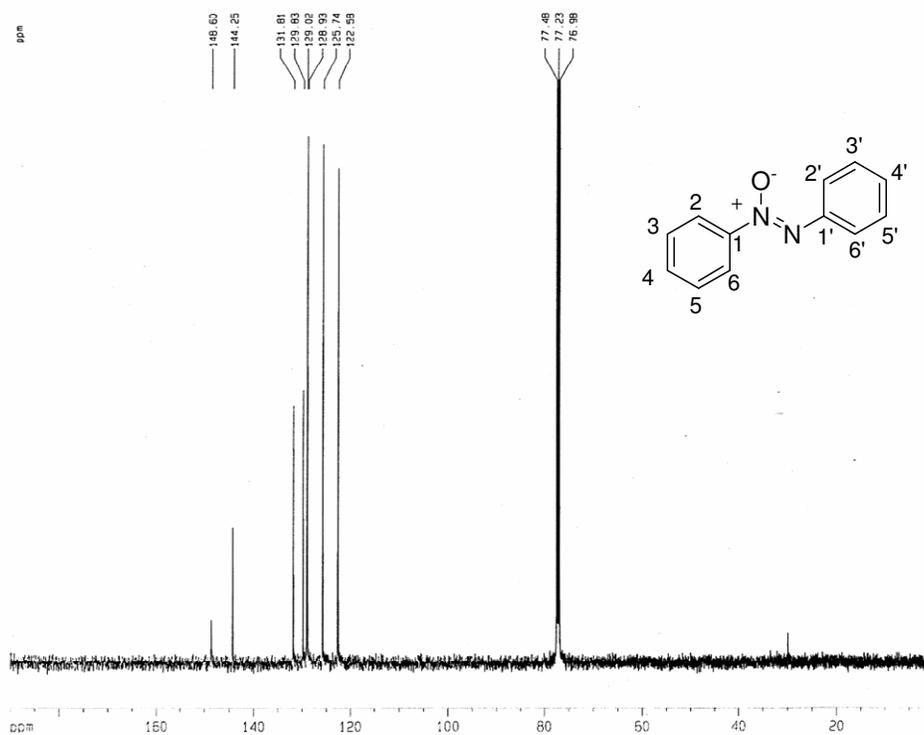


Figura 93. (93a) Espectro RMN C^{13} -BB (500 MHz, $CDCl_3$) de **18'**; (93b) Espectro RMN C^{13} -DEPT135 (500 MHz, $CDCl_3$) de **18'**.

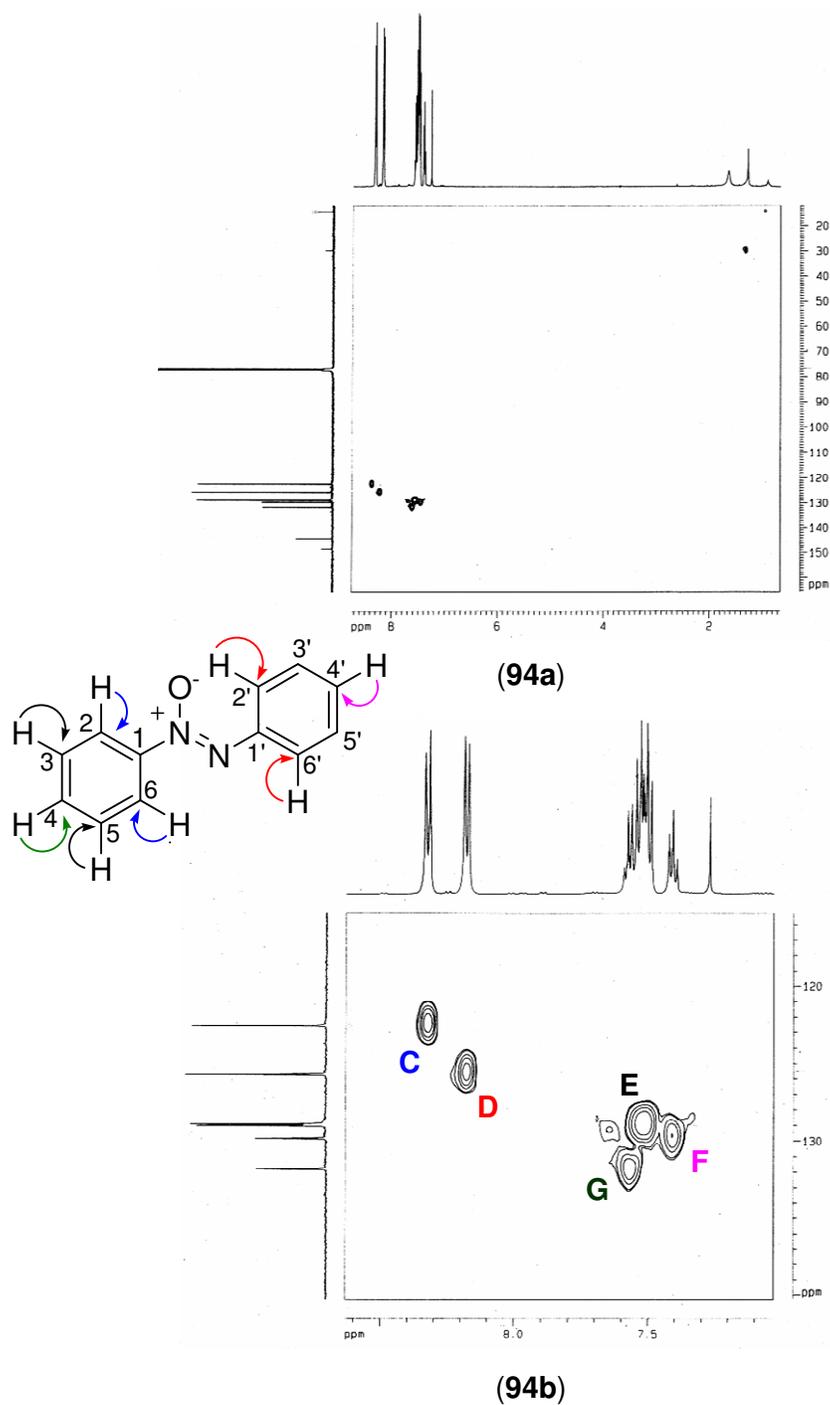


Figura 94. (94a) e (94b): Espectro RMN HSQC (500 MHz, CDCl₃) de 18'.

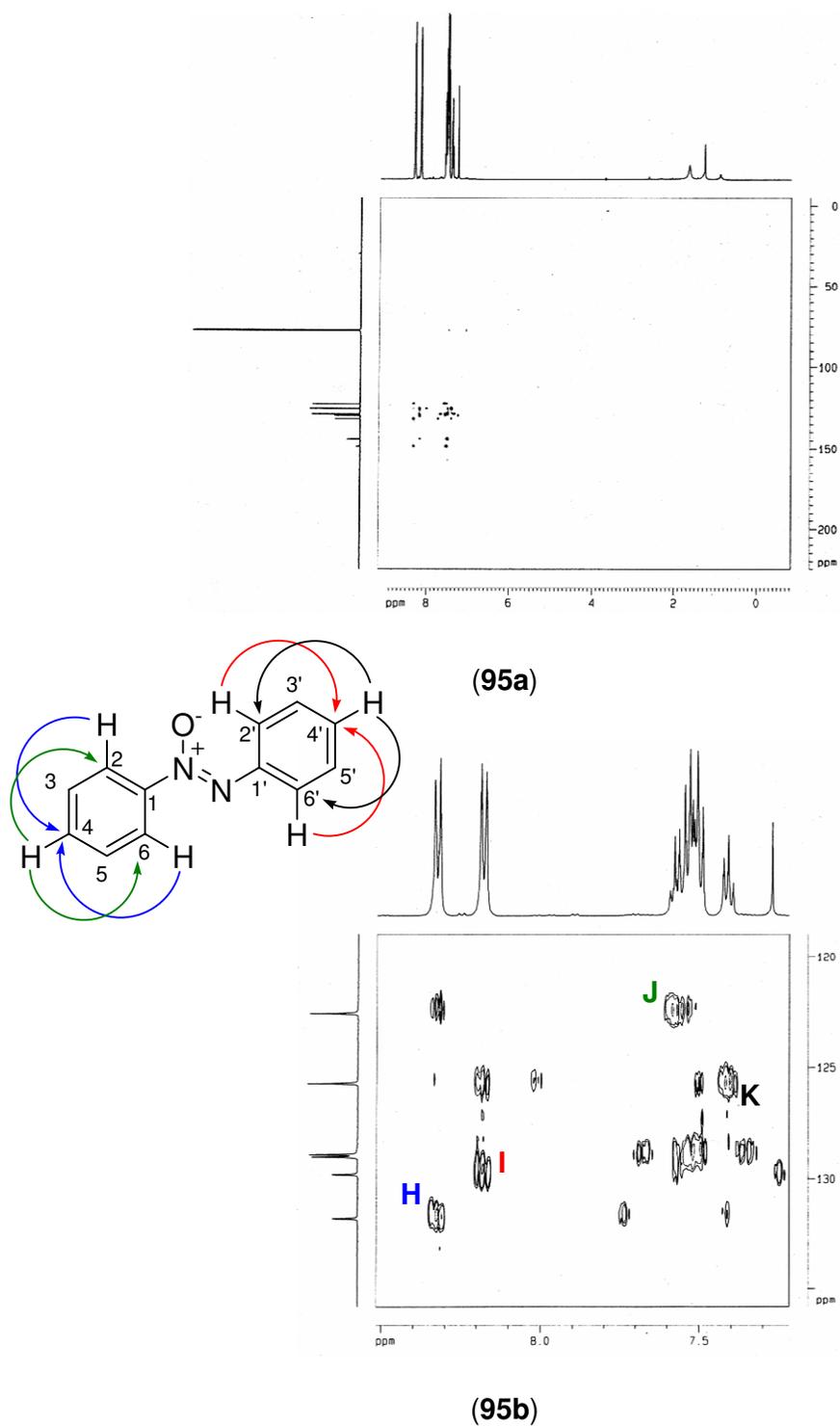
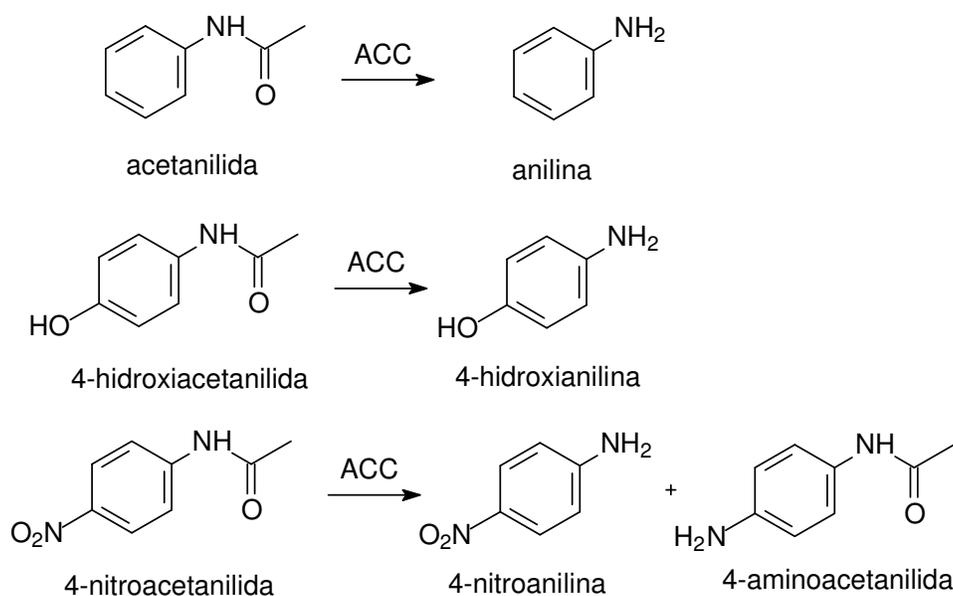
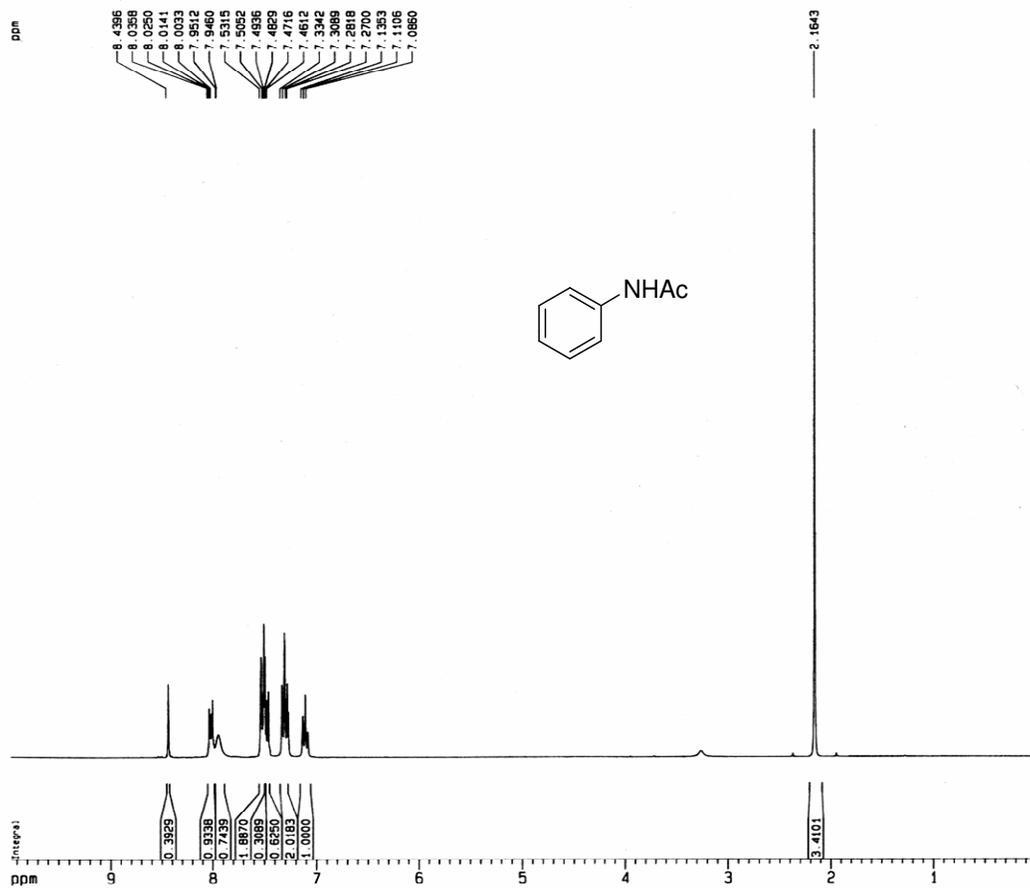


Figura 95. (95a) e (95b): Espectro RMN HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) de **18'**.

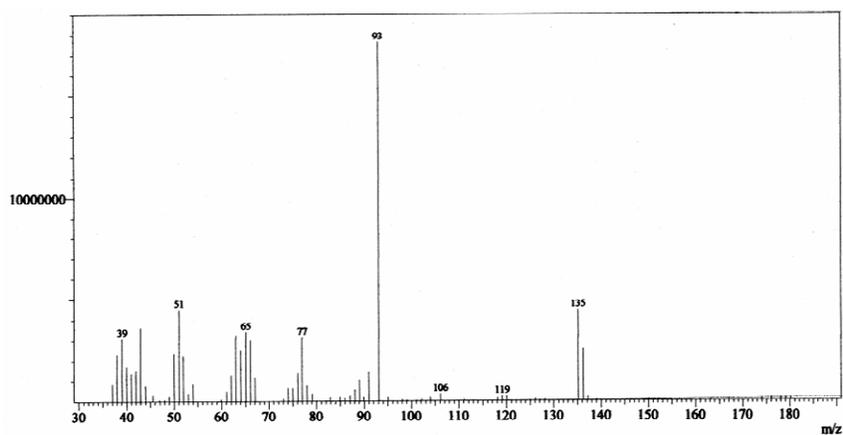
A amida acetanilida **19** produziu a anilina **19'**, com rendimento de 22%. A 4-hidroxiacetanilida **20**, gerou a 4-hidroxianilina **20'**, com redução do grupo amida para amina em 99% e a 4-Nitroacetanilida **21**, rendeu dois produtos, **21'a/21'b**, identificados como a nitroanilina e o 4-aminoacetanilida, respectivamente na razão de 60:40. Como resultado podemos dizer que as enzimas presentes na água-de-coco foram capazes de hidrolizar a função amida mantendo o grupo nitro, no caso do composto **21**, sem alterar a função amida. Portanto atuando seletivamente.



A seguir estão relacionados os espectros de RMN ¹H dos compostos de partida (**19-21**) (amidas) e dos respectivas aminas obtidas por redução e os espectros de massa dos produtos resultantes da biorredução dos compostos (**19'**, **20'** e **21'a/21'b**) (Figuras 96-102, p. 122-128).



(96a)



(96b)

Figura 96. (96a) Espectro RMN H^1 (500 MHz, $CDCl_3$) de **19**; (96b) Espectro EIMS de **19**.

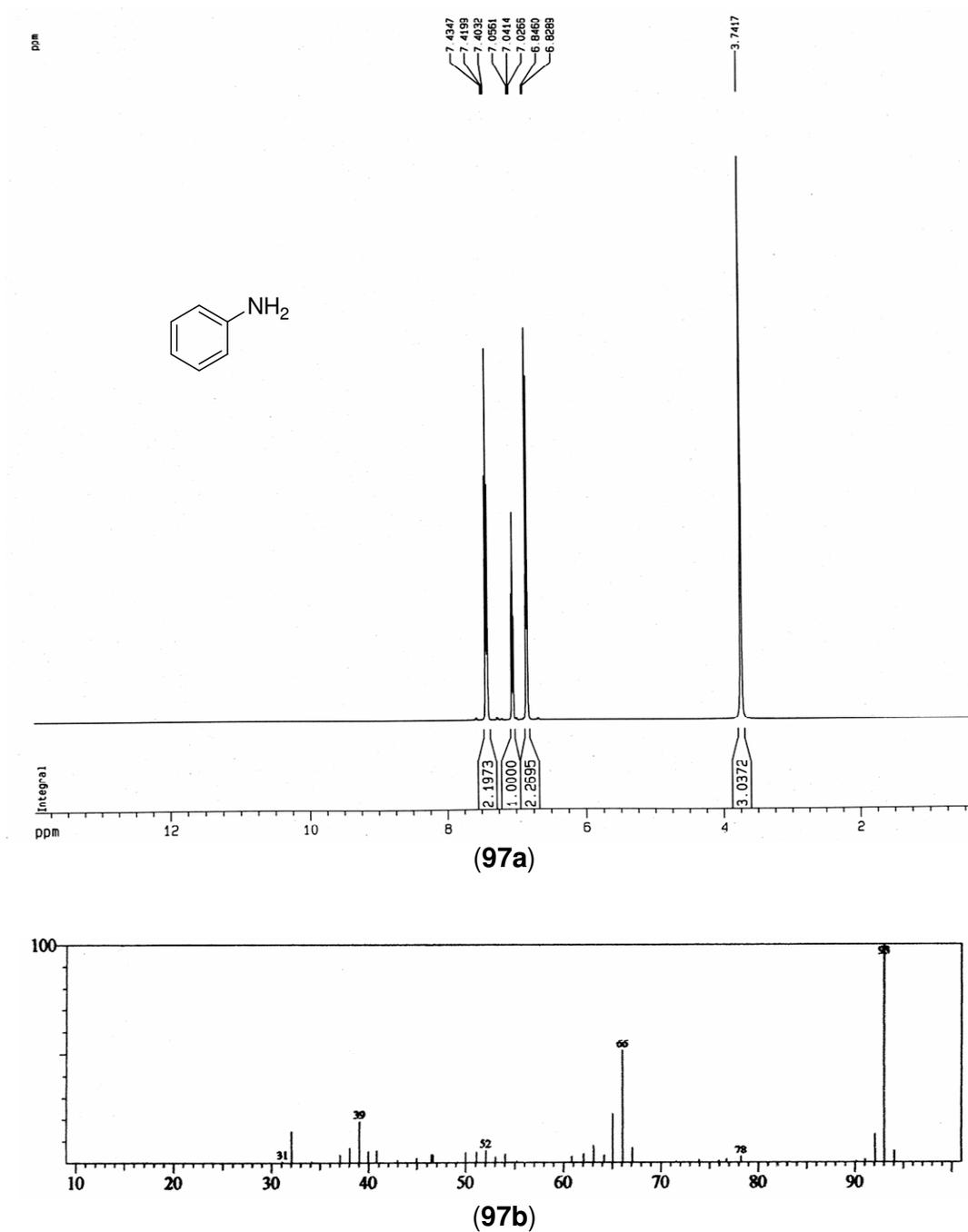


Figura 97. (97a) Espectro RMN H^1 (500 MHz, CDCl_3) de 19'; (97b) Espectro EIMS de 19'.

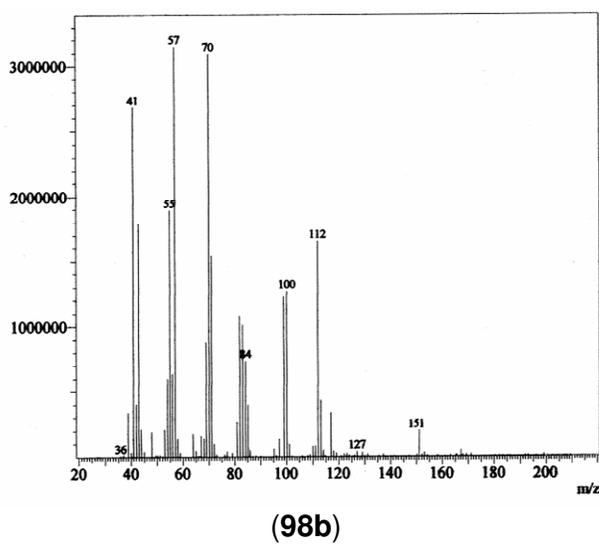
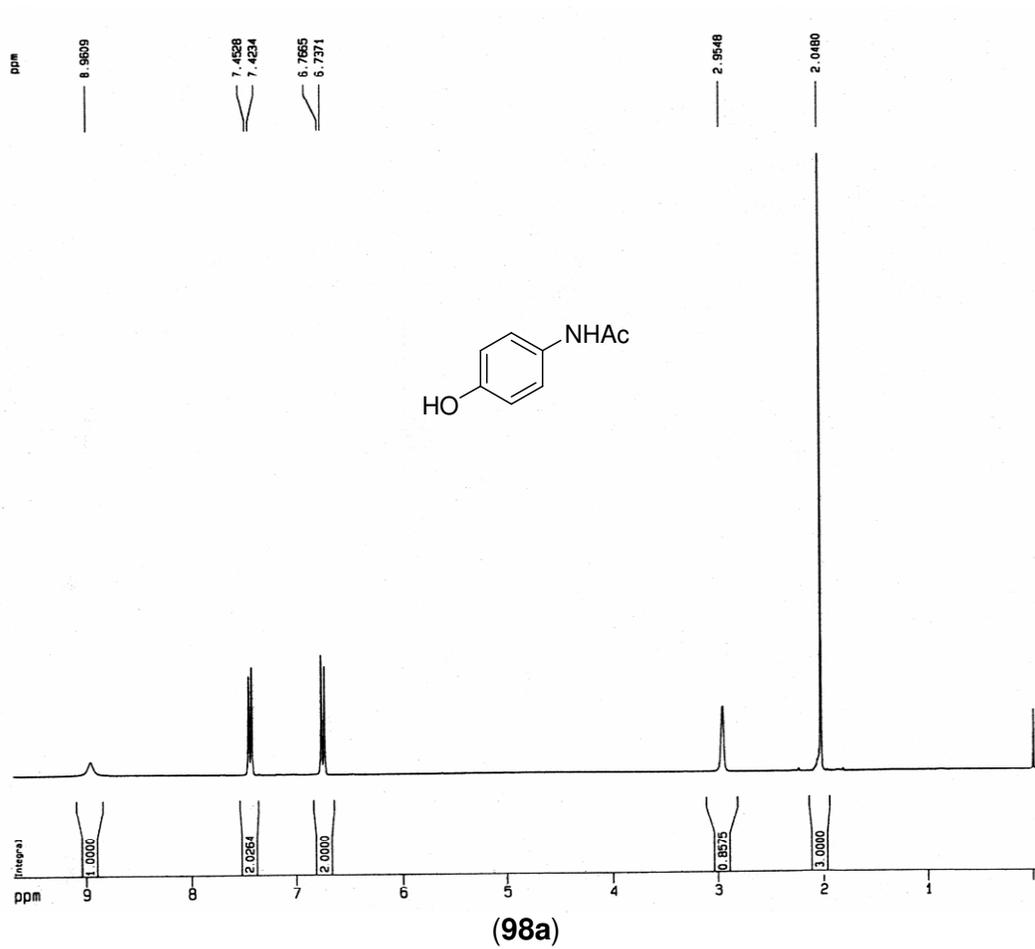


Figura 98. (98a) Espectro RMN H^1 (500 MHz, $CDCl_3$) de **20**; (98b) Espectro EIMS de **20**.

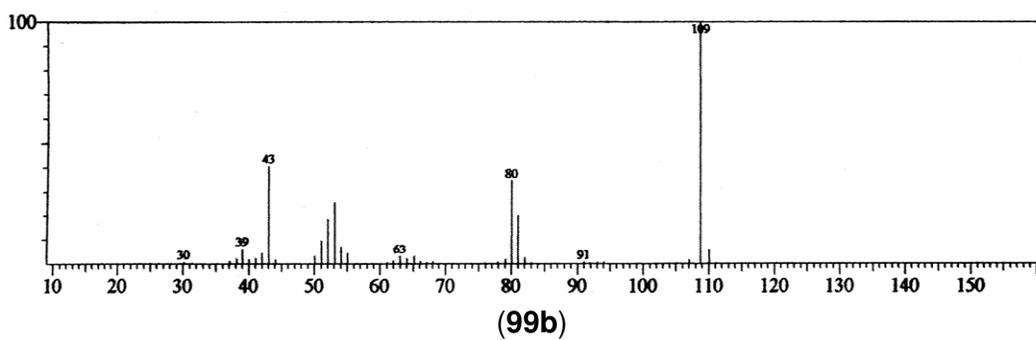
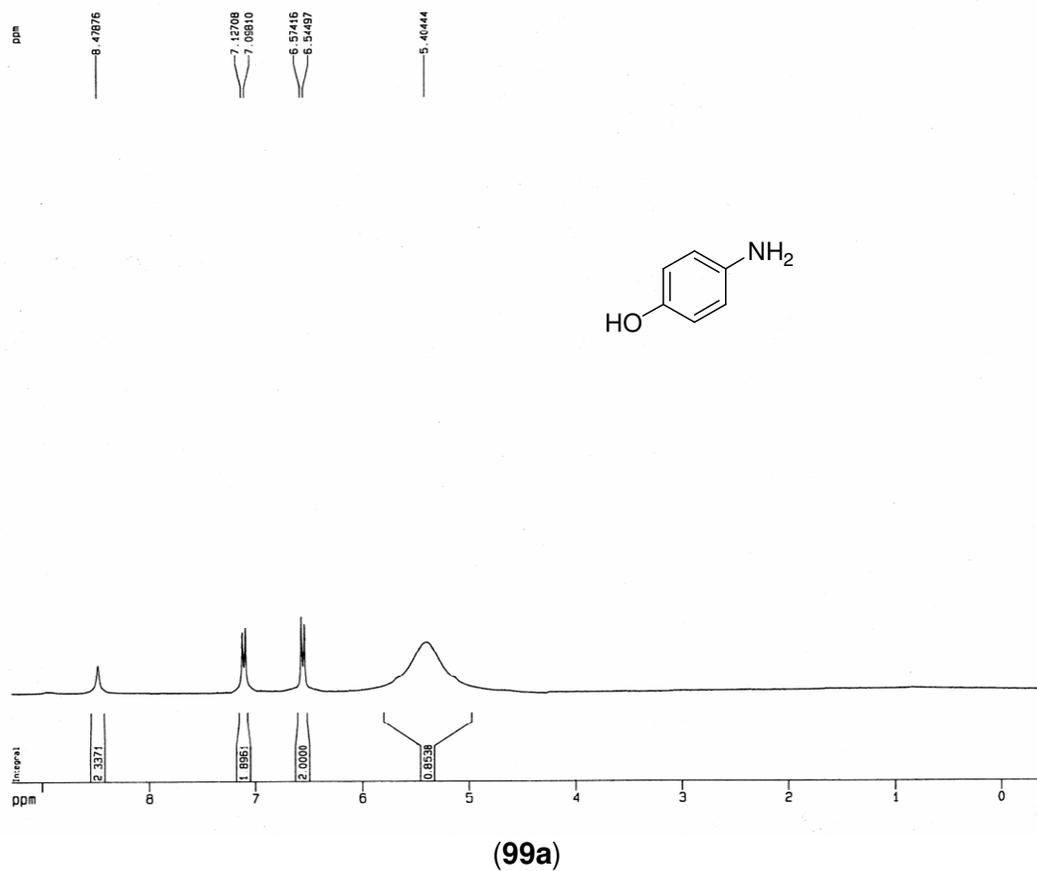
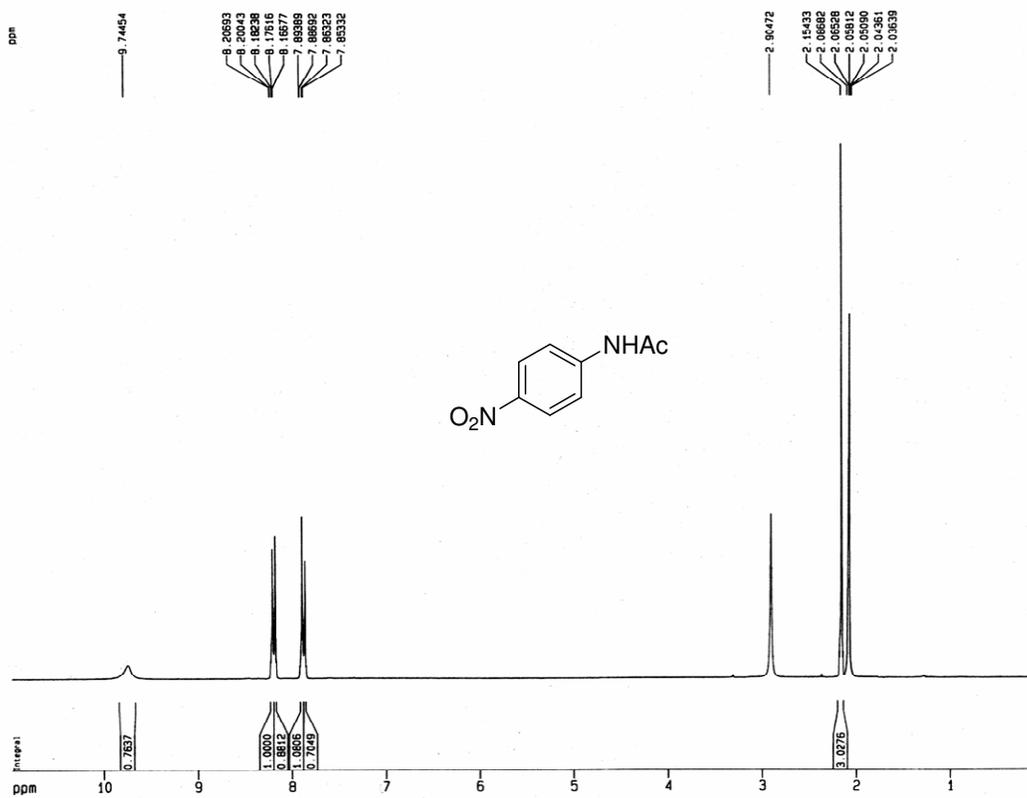
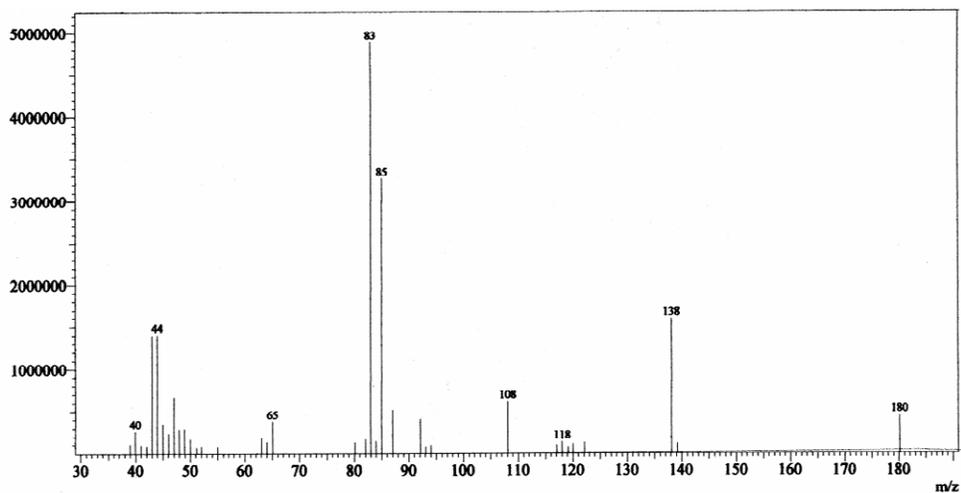


Figura 99. (99a) Espectro RMN H^1 (500 MHz, CDCl_3) de 20'; (99b) Espectro EIMS de 20'.

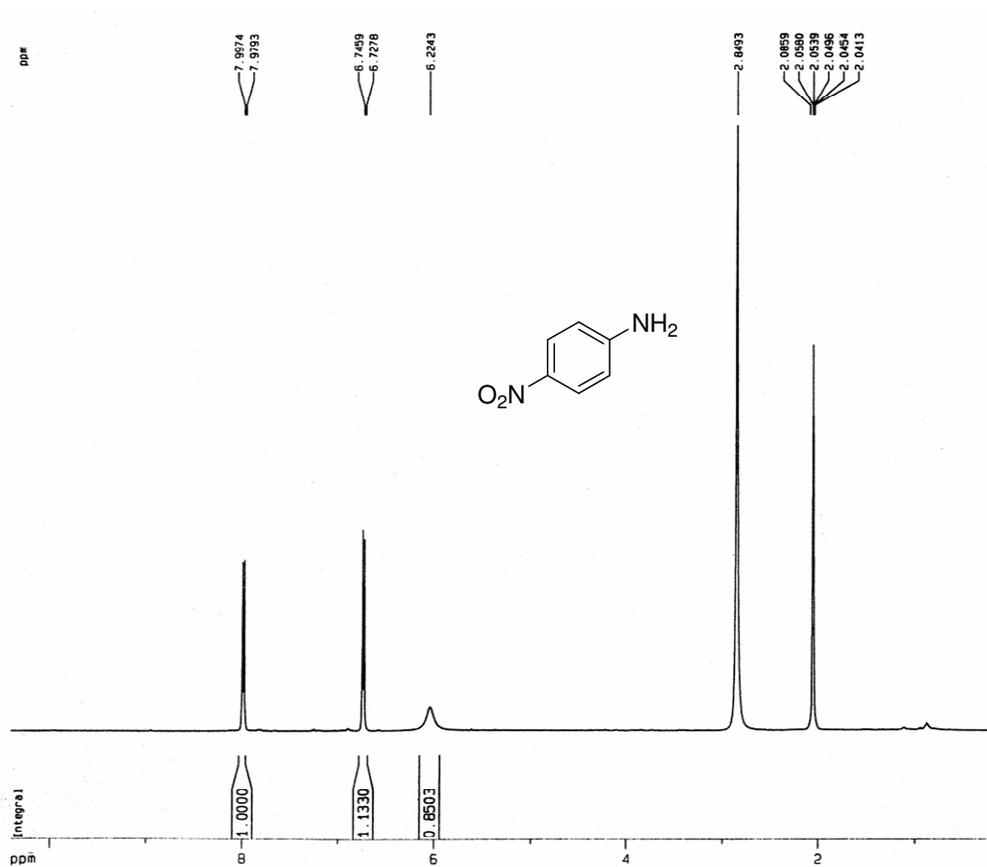


(100a)

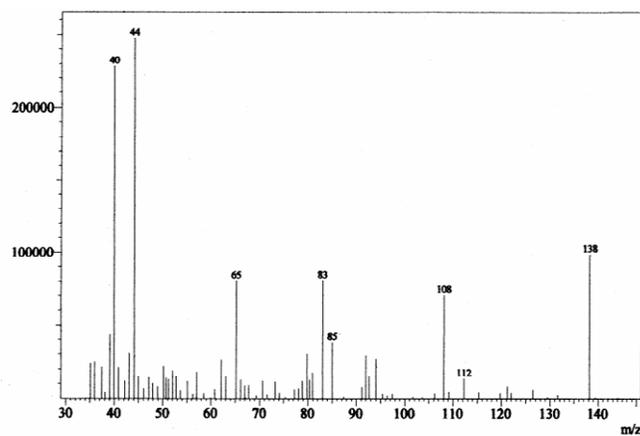


(100b)

Figura 100. (100a) Espectro RMN H^1 (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) de **21**; (100b) Espectro EIMS de **21**.

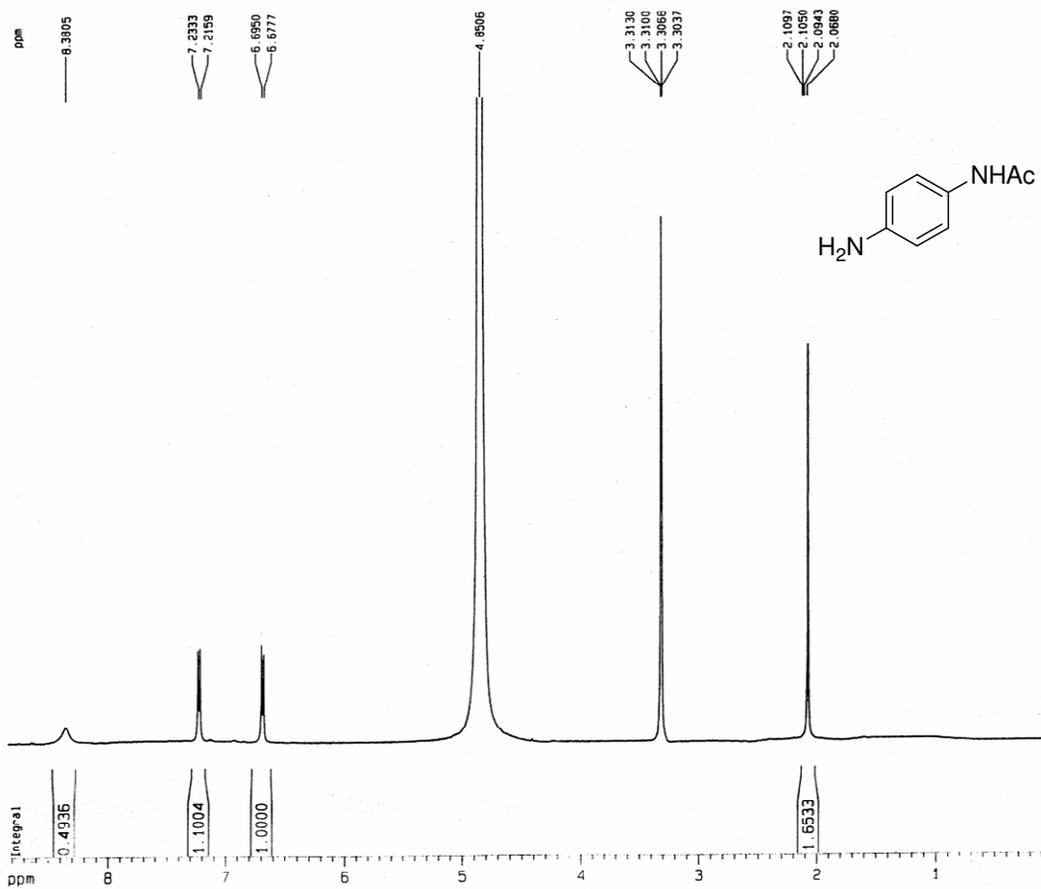


(101a)

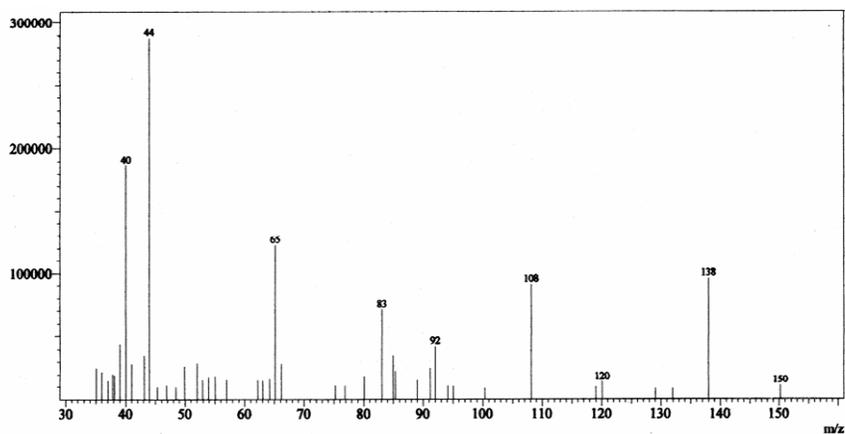


(101b)

Figura 101. (101a) Espectro RMN H^1 (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) de **21'a**; (101b) Espectro EIMS de **21'a**.



(102a)

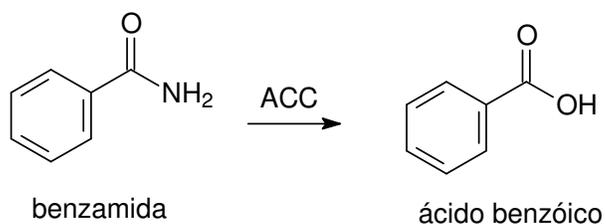


(102b)

Figura 102. (102a) Espectro RMN H^1 (500 MHz, CD_3OD) de **21'b**; (102b) Espectro EIMS de **21'b**.

5.6.1.5.2. Hidrólise de Amidas.

A hidrólise da benzamida **22**, procedeu em um rendimento muito mais baixo com a benzamida produzindo o ácido benzóico **22'** com rendimento de somente 34% e não uma benzilamina como seria previsto. A seguir estão relacionados os espectros de RMN ^1H do composto de partida (**22**) (amida) e do respectivo ácido obtido por hidrólise e os espectros de massa do produto resultantes da biorredução do composto (**22'**) (**Figuras 103-104, p. 130-131**).



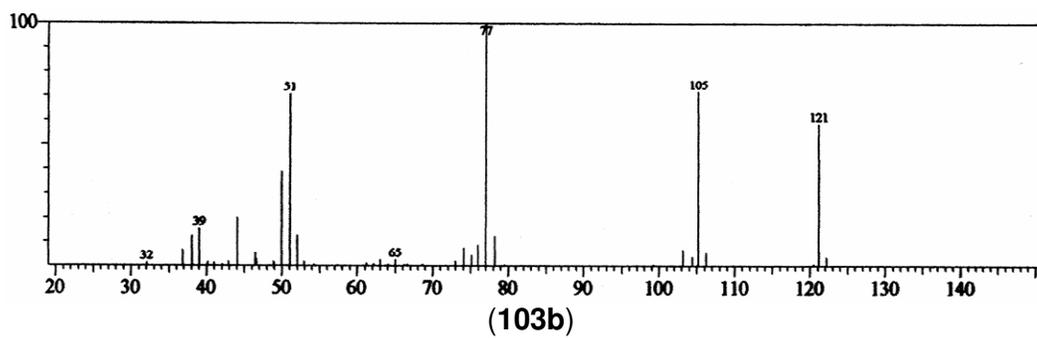
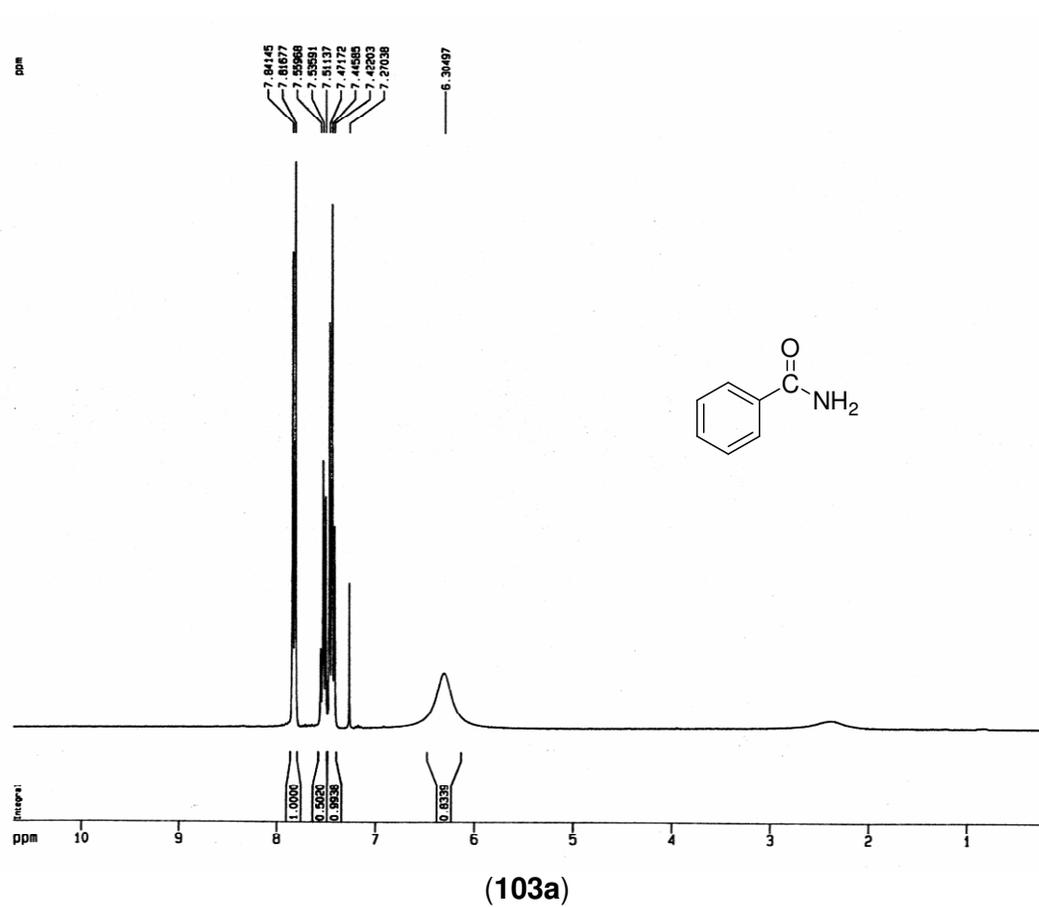


Figura 103. (103a) Espectro RMN H^1 (500 MHz, CDCl_3) de **22**; (103b) Espectro EIMS de **22**.

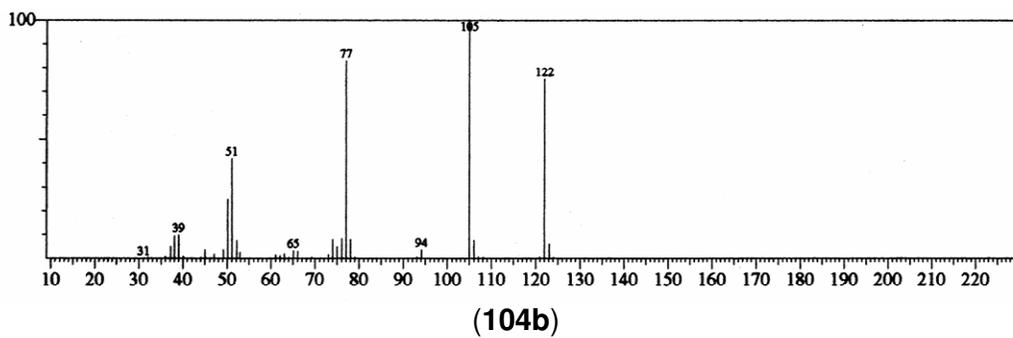
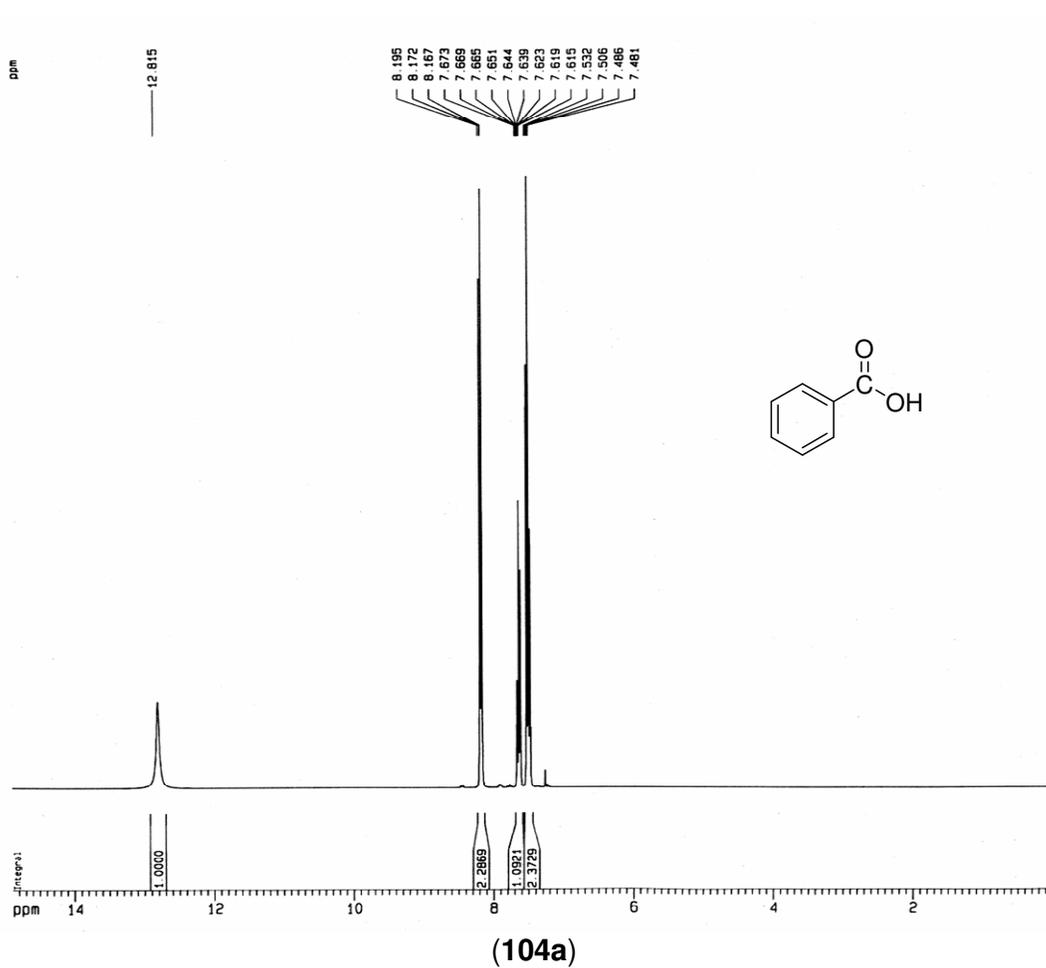


Figura 104. (104a) Espectro RMN H^1 (500 MHz, CDCl_3) de **22'**; (104b) Espectro EIMS de **22'**.

5.7. Experimentos de bioconversão versus tempo I

O rendimento máximo da bioconversão foi observado após 3 dias para os compostos selecionados: um aldeído **10** (citral), uma cetona **11** (2-butanona), um éster **12** (butirato de etila), e uma amida **19** (acetanilida). Como esperado, os aldeídos foram mais reativos do que as cetonas. Além disso, a reação de hidrólise do butirato de etila **12** mostrou uma taxa mais rápida da reação quando comparada com as taxas de bioredução das cetonas e dos aldeídos. Alíquotas foram analisadas por CG-EM com os tempos de reação que variaram de 12, 24, 36, 48, 60 a 72 horas. Os experimentos foram executados em duplicata e os resultados são apresentados na **Figura. 105** (p. **132**).

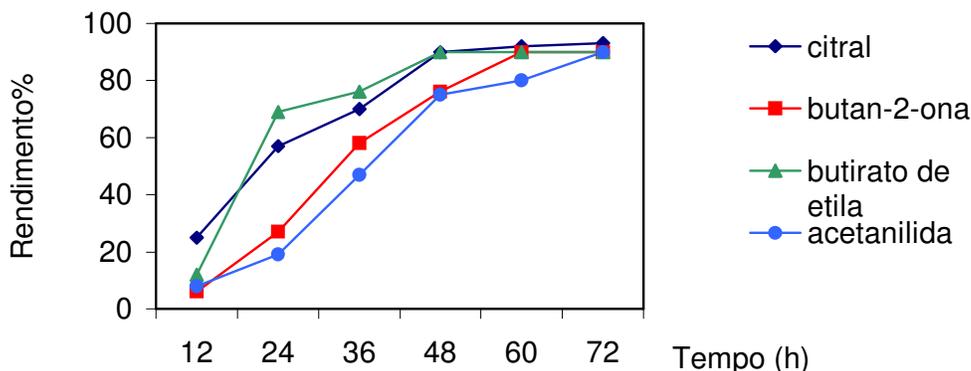
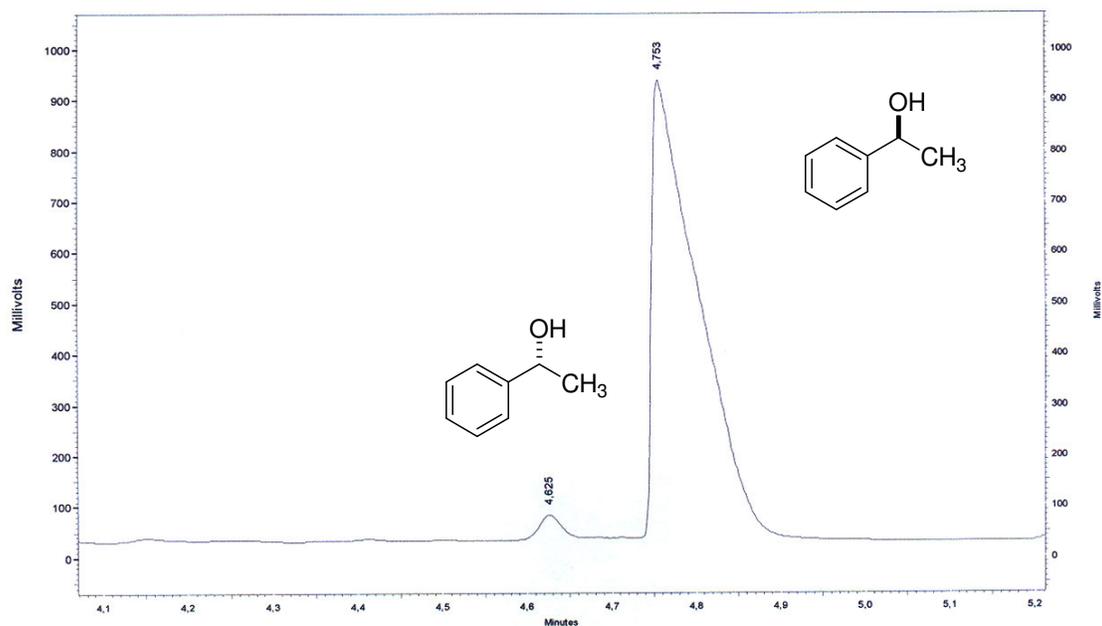


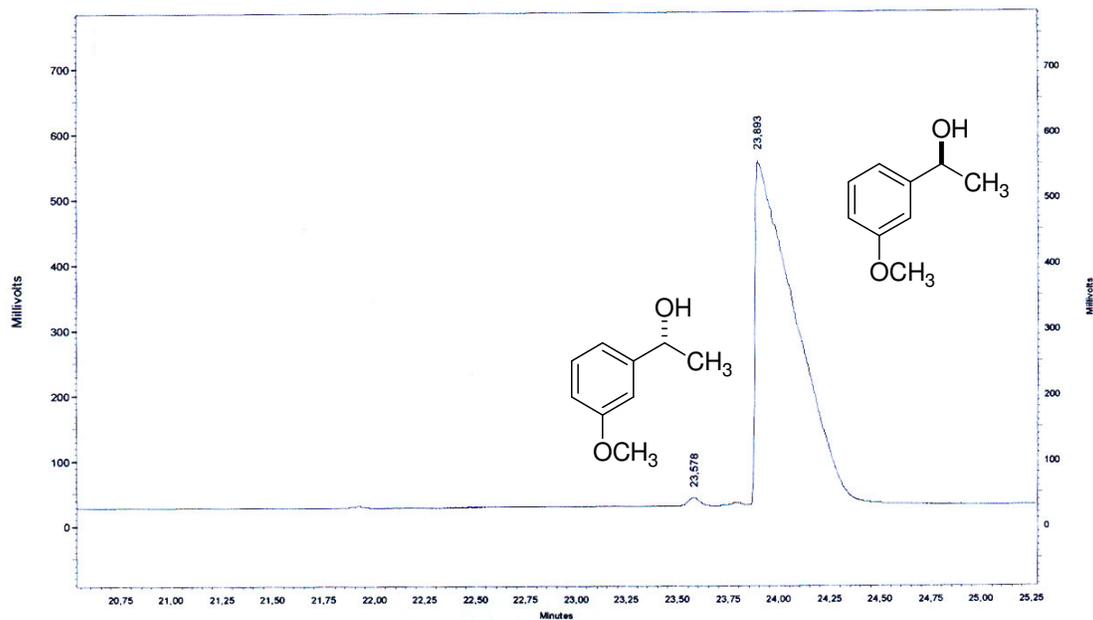
Figura 105. Bioconversão do citral **10**, butan-2-ona **11**, butirato de etila **12** e acetanilida **19** usando ACC na temperatura ambiente.

5.8. Determinação do excesso enantiomérico dos compostos **1'**, **2'**, **13'**, **14'**, e **15'**.

Os racêmicos comercialmente disponíveis: **1'** (S-(-)-1- fenil-etanol), **2'** (S-(-)-3-metoxi-fenil-etanol), **13'** (3-S-(+)-hidróxi-butirato de etila), **14'** (S-(-)-carveol), **15'** (R-(+)-pulegol), e produtos de reação obtidos por redução com água-de-coco: **1'** (S-(-)-1- fenil-etanol), **2'** (S-(-)-3-metoxi-fenil-etanol), **13'** (3-S-(+)-hidróxi-butirato de etila), **14'** (S-(-)-carveol), **15'** (R-(+)-pulegol), foram analisados separadamente por CG/FID e os excessos enantioméricos foram determinados como 95%, 99%, 95%, 99%, 99%, e 56%, respectivamente. Para ambas os compostos, condições de CG: 40°C (10 min), 2°C/min, 160°C (10 min); tR (R) 4,625 min, tR (S) 4,753 min para **1'**, tR (R) 23,578 min, tR (S) 23,893 min para **2'**, tR (R) 5,220 min, tR (S) 5,270 min para **13'**, tR (R) 5,60 min, tR (S) 5,952 min para **14'** e tR (R) 5,610 min, tR (S) 5,802 min para **15'**. Onde podemos ver seus FID's nas **Figuras 106a/106b (p. 134)**, **107a/107b (p. 135)** e **108a/108b (p. 136)**.

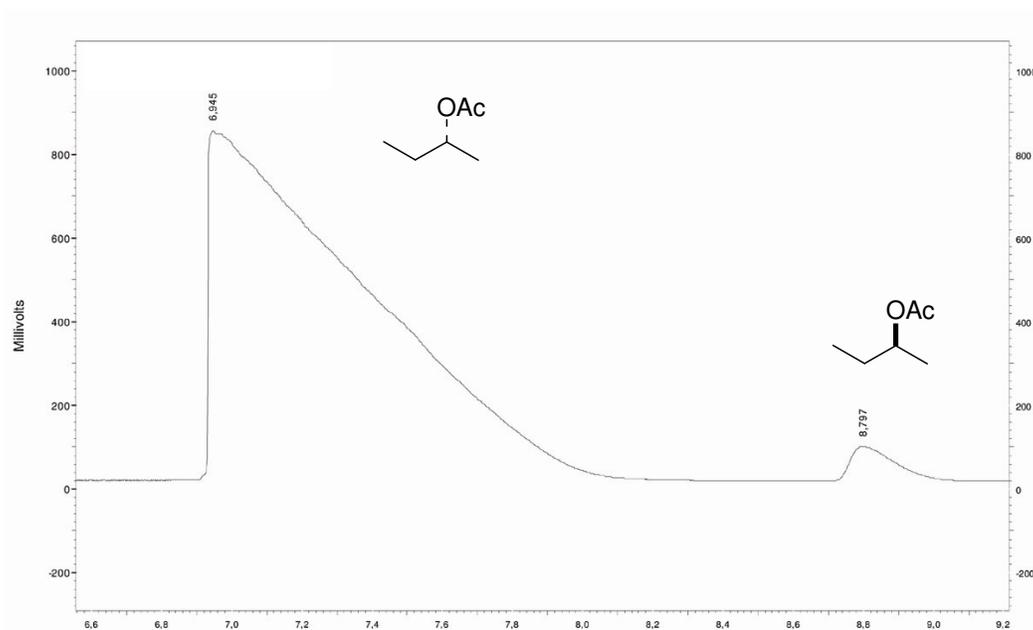


(106a)

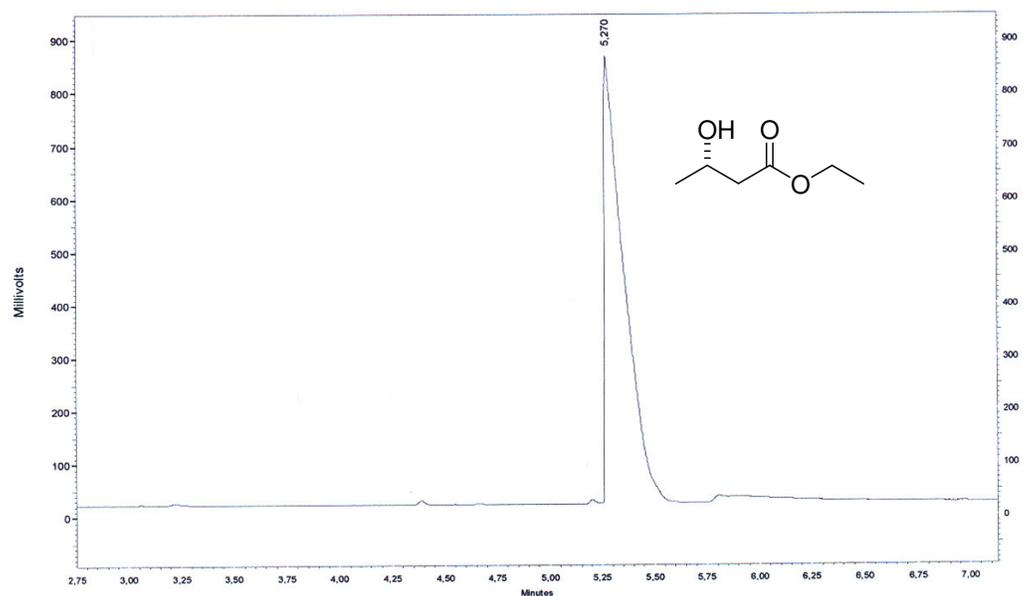


(106b)

Figura 106. (106a) CG-FID (Chirasil-Dex CB) do S-(-)-1-fenil-etanol (**1'**) com 95%;(106b) CG-FID (Chirasil-Dex CB) do S-(-)-3-metoxi-fenil-etanol (**2'**) com e.e. >99%.

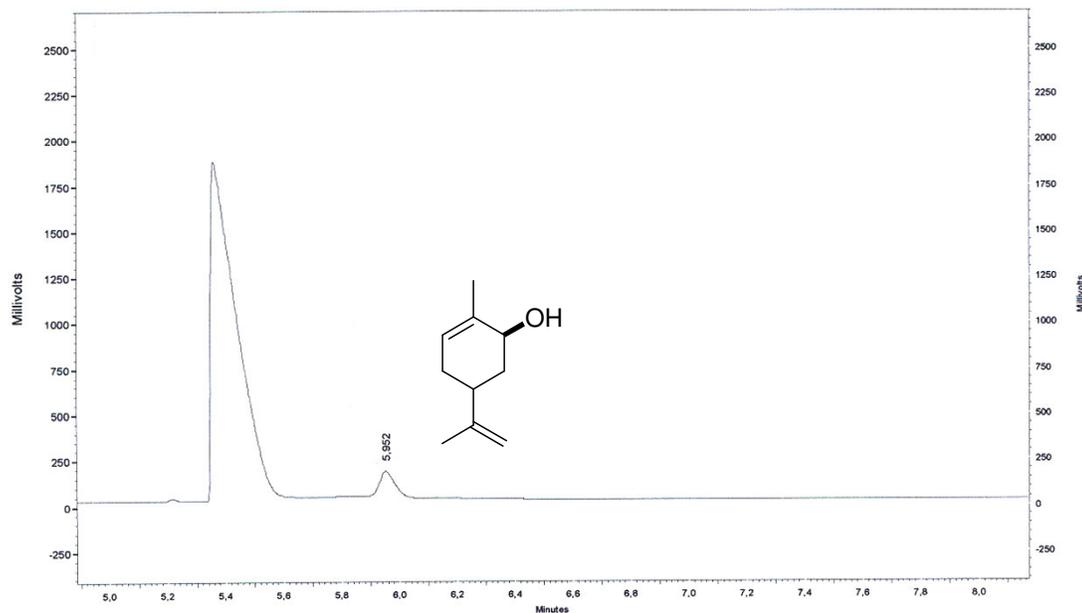


(107a)

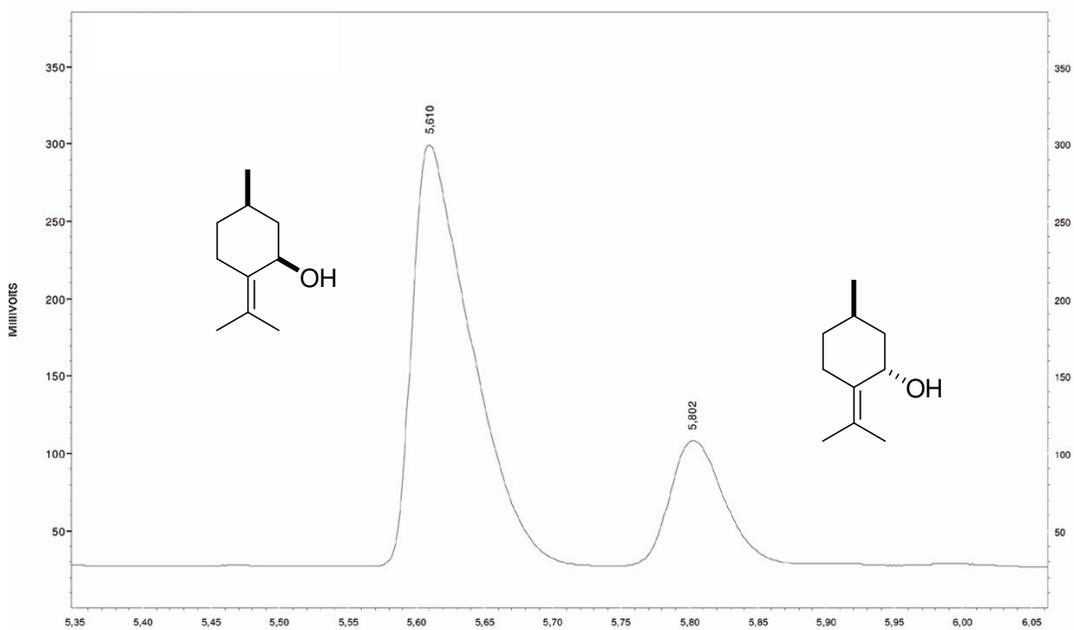


(107b)

Figura 107. (107a) CG-FID (Chirasil-Dex CB) do R-(+)-butan-2-ol acetilado (**11'acil**) com e.e. 95%; (107b) CG-FID (Chirasil-Dex CB) do butirato de 3-S-(+)-hidroxi-etila (**13'**) com e.e. > 99%.



(108a)



(108b)

Figura 108. (108a) CG-FID (Chirasil-Dex CB) do S-(-)-carveol (14') com e.e.>99%; (108b) CG-FID (Chirasil-Dex CB) do R-(+)-pulegol (15') com e.e. 56%.

5.9. Bioacetilações Utilizando as Enzimas Imobilizadas de água-de-coco do Ceará (ACC)

5.9.1. Imobilizações Enzimáticas

As enzimas são catalisadores extremamente eficientes e são sensíveis à inativação por fatores como temperatura, solvente, pH, entre outros. Assim, um mecanismo de proteção das enzimas é essencial para que seu potencial catalítico se mantenha. Várias técnicas de imobilização foram e estão sendo desenvolvidas com a finalidade de fornecer maior estabilidade, facilitar a recuperação e reutilização desses catalisadores (VILLENEUVE et al., 2000).

A aplicação de enzimas ou complexos enzimáticos imobilizados, cresceu bastante nos últimos anos. As indústrias de medicamentos, detergentes, couros e panificação, entre outras (PANDEY et al., 1999; SALUNKHE e NAIR, 2000), já utilizam enzimas imobilizadas em seus processos.

5.9.1.1. Imobilização da água-de-coco em alginato de sódio

Após extensivo estudo com compostos contendo grupos carbonílicos, entre estes cetonas, aldeídos, amidas, ésteres e β -ceto ésteres, onde evidenciou-se a presença de redutases e hidrolases na água-de-coco, partimos então para a imobilização das enzimas presentes na ACC em alginato de sódio.

A escolha deste suporte foi feita baseada na facilidade de imobilização da mistura enzimática em alginato pelo baixo preço deste polímero e ainda por experiência já obtidas com imobilização na manípueira (MACHADO et. al, 2008) e do caldo-de-cana (ASSUNÇÃO et. al, 2008).

A imobilização do ACC (água-de-coco do Ceará) foi feita seguindo o procedimento de obtenção das esferas conforme pode ser visto no **item 4.8.4 (p. 37)**. As esferas foram caracterizadas usando microscopia de varredura

eletrônica (MEV), tendo-se observado diâmetro das partículas estimado em 756 μm . Ver **Figuras 109-113** (p.138-140).

Para a imobilização das enzimas foi utilizado o processo de Kalogeris (KALOGERIS, et al., 2006) (**Ítem 4.8.4, p. 37**). Primeiramente, uma leitura no espectrofotômetro de UV foi efetuada a partir do ACC e que foi utilizada para determinar o teor (1,2%) total de proteínas através de uma curva de calibração obtida utilizando soluções padrões de albumina bovina. O ACC (água-de-coco do Ceará), ao qual foi adicionado alginato de sódio para imobilização das enzimas, foi gotejado sobre uma solução de cloreto de cálcio (5% m/v). O material precipitado (as esferas) foi separado por filtração e a partir do filtrado foi efetuada uma leitura no espectrômetro. O valor dessa leitura foi dividido pelo valor da primeira e multiplicado por 100, obtendo-se assim, a percentagem de proteínas não imobilizadas. Esta percentagem foi subtraída de 100 fornecendo a percentagem (99,2%) de enzimas imobilizadas da água-de-coco do Ceará (EIACC).

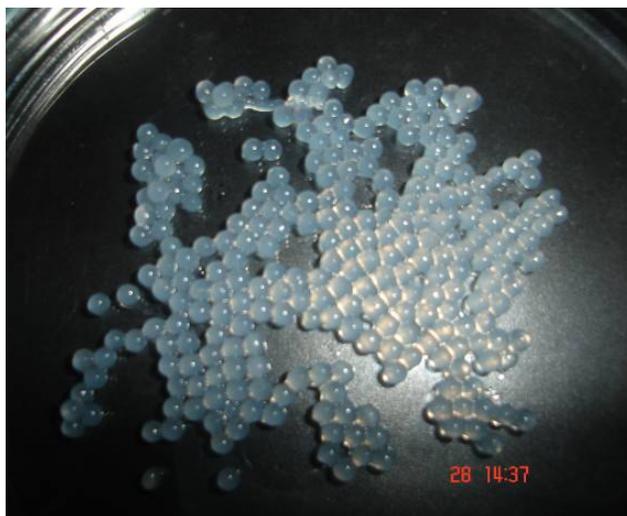


Figura 109. Fotografia das enzimas imobilizadas da água-de-coco após filtração e lavagem.



Figura 110. Fotografia das enzimas imobilizadas da água-de-coco após secagem à 32°C.

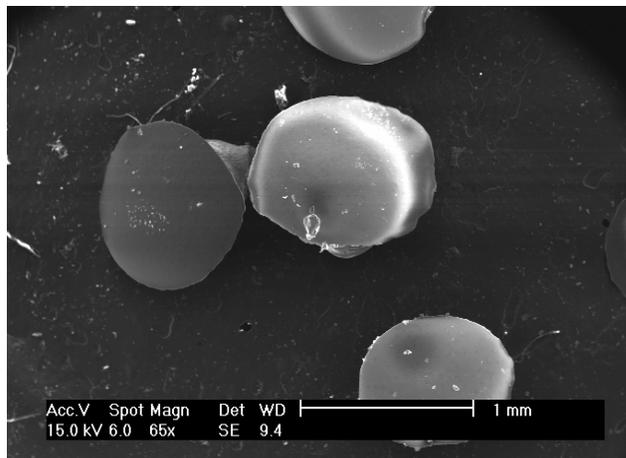


Figura 111. Fotografias MEV com 65X de aumento de três partículas de (EIACC).

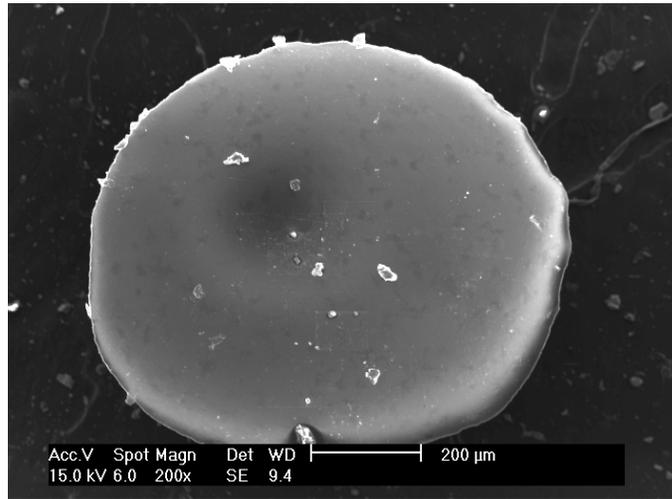


Figura 112. Fotografias MEV com 200X de aumento de uma partícula de (EIACC).

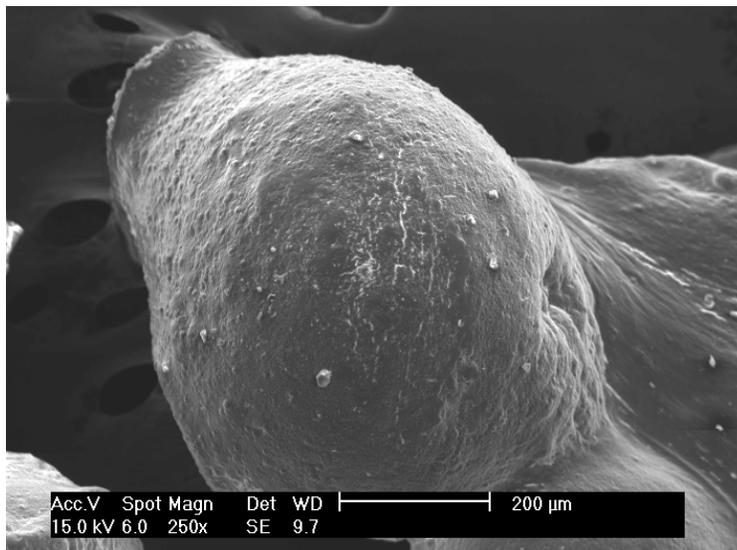
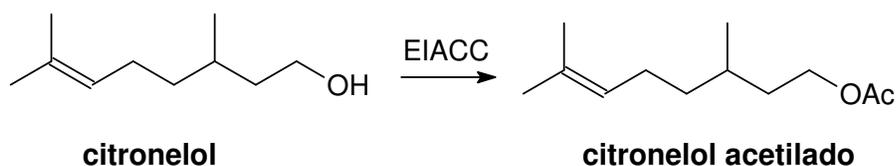


Figura 113. Fotografias MEV com 250X de aumento de uma partícula de (EIACC).

Inicialmente, o potencial biorredutor (reação de redução) da EIACC (enzima imobilizada da água-de-coco) foi investigada, utilizando um aldeído (benzaldeído **3**) e uma cetona (acetofenona **1**) como substratos, onde foram observados indícios de baixa reatividade. Mas a ausência de cofatores (perdido no processo de imobilização) poderia explicar este fato, uma vez que as redutases necessitam dessas espécies para atuarem. Posteriormente, EIACC foi testado como biocatalisador na reação de acetilação do citronelol, apresentando um bom resultado (70%) reação mostrada abaixo. As lipases (enzimas que catalisam esse tipo de reação), segundo a literatura (DALLAVECCIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004), não necessitam de cofatores na catálise de reações. O citronelol (álcool primário) foi o substrato selecionado para ser utilizado na otimização das condições reacionais de acetilação deste álcool com EIACC como biocatalisador.



A seguir estão relacionados os espectros de RMN ^1H dos compostos do citronelol e do respectivo éster obtidos por acetilação e os espectros de massa do produto resultante da bioacetilação dos citronelol.

5.10. Lipases

São enzimas hidrolíticas muito utilizadas em síntese orgânica, capazes de catalisar reações de **esterificação**, transesterificação, aminólise e tiotransesterificação em solventes orgânicos anidros, sistemas bifásicos e em solução micelar com alta especificidade. Apresentam diversas vantagens, tais como: **não necessitam de cofatores**, atuam em uma faixa de pH relativamente grande, são muito estáveis em meio orgânico, apresentam especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade, baixo custo e grande disponibilidade (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004).

5.10.1. Influência da Quantidade Enzimática

Inicialmente foi realizada a otimização da quantidade de biocatalisador (EIACC). Neste estudo, foram utilizados sempre 200 mg (1,46 mmol) de citronelol, 148 mg (1,45 mmol) de anidrido acético, 20 mL de hexano, sob agitação mecânica de 150 rpm, à temperatura de 30 °C, durante 72 horas de reação. A quantidade enzimática foi variada de 50 a 400 mg fornecendo rendimentos na faixa 43,2 a 68,2%. Os resultados encontram-se expostos na **Figura 118 (p. 145)**.

De acordo com os resultados obtidos, foi observado que o rendimento reacional se eleva gradativamente quando a quantidade enzimática varia de 50 a 200 mg (variação de 29% no rendimento). Entretanto, em quantidades acima de 200 mg de EIACC o rendimento varia muito pouco, demonstrando que a melhor relação EIACC /substrato, mantendo os demais parâmetros, foi de 200mg/250mg. Assim, 200 mg foram tomadas como quantidade padrão de EIACC para os próximos testes.

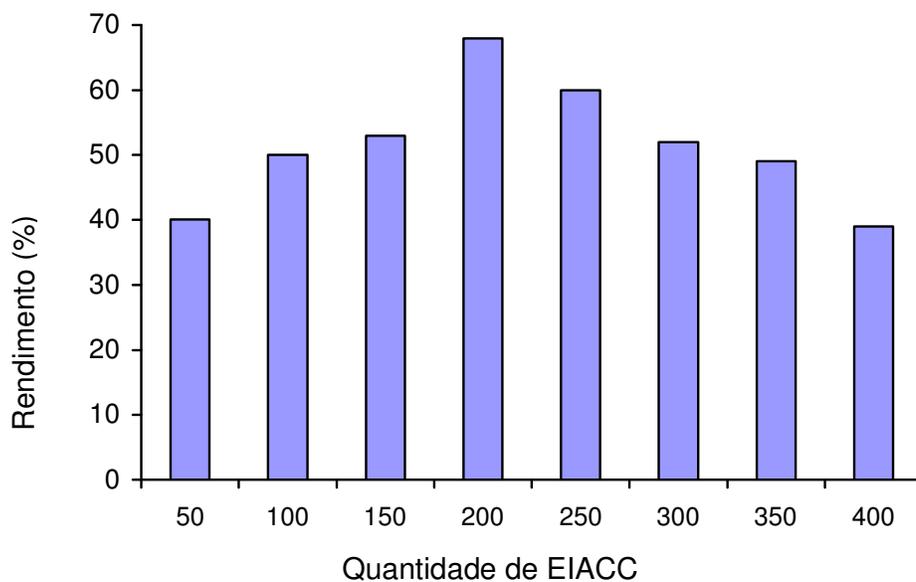


Figura 118. Rendimentos reacionais das acetilações do citronelol obtidos pela variação da quantidade de EIACC.

5.10.2. Influência do Tempo Reacional

Conhecida a quantidade ideal de EIACC (200 mg), foram iniciados os testes para otimização do tempo de reação. Os rendimentos reacionais foram calculados entre 12 e 48 horas, em intervalos de 12 horas. As condições foram: 200 mg de citronelol, 148 mg de anidrido acético, 20 ml de hexano, velocidade de agitação de 150 rpm e temperatura de 30°C. Os resultados deste estudo encontram-se listados na **Figura 119, p. 146**.

Os resultados demonstraram que o rendimento se eleva gradativamente no início da reação (entre 12 e 48 horas) e se estabiliza após 60 horas. Este fato indicou que, possivelmente, o equilíbrio dinâmico é atingido com 60 horas reação pois em 72 h permaneceu quase que constante e, portanto, sendo este o melhor tempo.

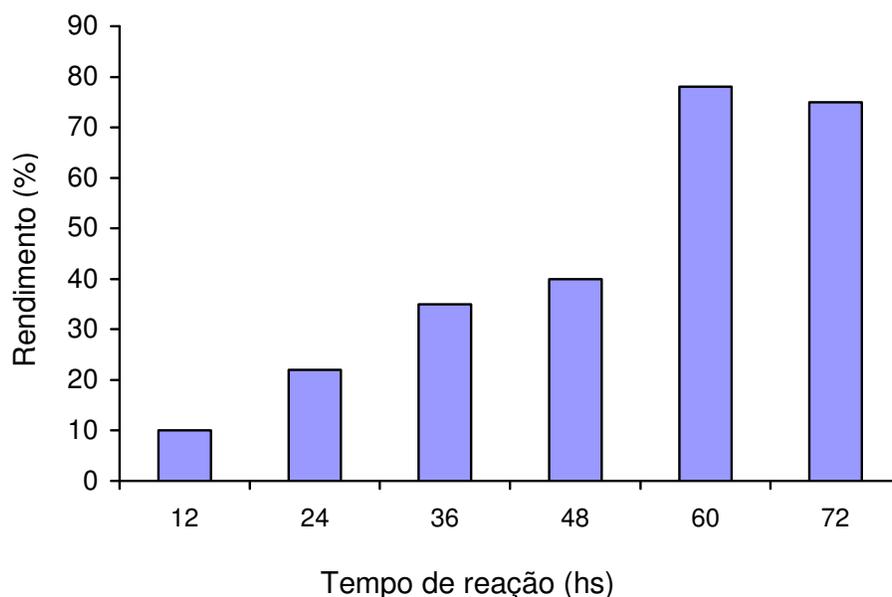


Figura 119. Rendimentos reacionais das acetilações do citronelol com EIACC obtidos pela variação do tempo reacional.

5.10.3. Influência do Solvente

O tipo de solvente é, provavelmente, um dos fatores mais decisivos em reações catalisadas por enzimas, podendo causar a desnaturação ou desativação da enzima. Reações em meio orgânico são atrativas por melhorar a solubilidade do substrato e diminuir a possibilidade de reações laterais com a água.

DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004 mostram que a quantidade de água é o componente mais relevante quando o biocatalisador é utilizado em meio orgânico. As enzimas necessitam de uma pequena quantidade de água para manter sua conformação tridimensional ativa, retendo a polaridade do sítio ativo e estabilizando a molécula da proteína, sendo, contudo, a quantidade de água no meio orgânico dependente do tipo de solvente utilizado. Entretanto, o excesso de água pode favorecer a reação de hidrólise, reação inversa da esterificação, onde a acetilação seria um exemplo.

O parâmetro mais utilizado para descrever quantitativamente o efeito do solvente em reações de biocatálise é o log P (logaritmo do coeficiente de partição do solvente no sistema octanol/água). Segundo dados da literatura (LIMA e ANGNES, 1999) o log P é utilizado para medir quantitativamente a polaridade de solventes. Assim, solventes que apresentam $\log P \leq 2$ são considerados hidrofílicos (polares), log P entre 2 e 4 moderadamente hidrofílicos e $\log P > 4$ hidrofóbicos (apolares).

Os solventes hidrofílicos (polares) são inadequados para o uso em biocatálise porque perturbam fortemente a interação água-biocatalisador (absorvem a camada de hidratação da enzima, desativando-a) (LIMA e ANGNES, 1999). Por isso, os solventes hidrofóbicos são mais eficientemente utilizados em biocatálise (PARIDA e DORDICK, 1999).

Uma série de solventes, com polaridades variadas, foram testados na acetilação enzimática do citrônolol utilizando a EIACC como biocatalisador. Nesses experimentos foram utilizados 200 mg de substrato, 148 mg de anidrido acético, agitação mecânica de 150 rpm, temperatura de 30°C, tempo reacional de 60 horas e 20 mL do solvente. A **Fig. 120, p. 147**, ilustra os resultados obtidos.

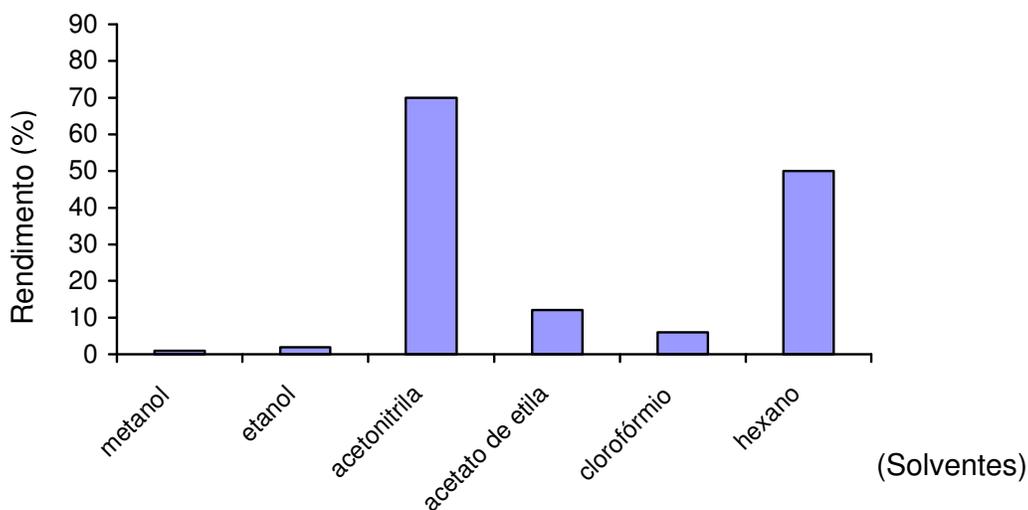


Figura 120. Rendimentos reacionais das acetilações do citrônolol com EIACC obtidos pela variação do solvente.

Os resultados observados neste estudo corroboram com aqueles reportados na literatura (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004; LIMA e ANGNES, 1999), onde dos solventes hidrofóbico, o hexano, foi o que apresentou o melhor rendimento (50%). Com os solventes mais hidrofílicos, metanol e etanol, não foram observadas nenhuma reatividade. Já naqueles de polaridade moderada, acetonitrila e acetato de etila, houve uma boa reatividade com em relação a acetonitrila (70%). De acordo com os valores de log P registrados na literatura (LIMA e ANGNES, 1999) para esses solventes [metanol (-0,76), etanol (-0,24), acetonitrila (-,033), acetato de metila (0,16, semelhante ao acetato de etila), clorofórmio (2,00) e hexano (3,50)], os resultado obtidos para acetilação enzimática com EIACC podem ser explicados com base neste parâmetro.

5.10.4. Influência da Quantidade de Substrato

A quantidade do substrato (citronelol) utilizado, foi variada com o objetivo de verificar a melhor relação substrato/enzima. Quantidades de 50 a 300 mg do álcool foram submetidas à acetilação, fornecendo rendimentos entre 12,4 e 65%. As condições reacionais, foram: agitação mecânica (150 rpm), temperatura (30 °C), tempo reacional (60 horas), solvente (20 mL) e quantidade equimolar de anidrido acético. Os resultados encontram-se descritos na **Fig. 121, p. 149**. Examinando-os pôde-se concluir que 300 mg (65% de rendimento) é realmente a quantidade ideal quando são utilizados 200 mg de EIACC, ou seja, 200 mg/300 mg é a melhor relação enzima/substrato.

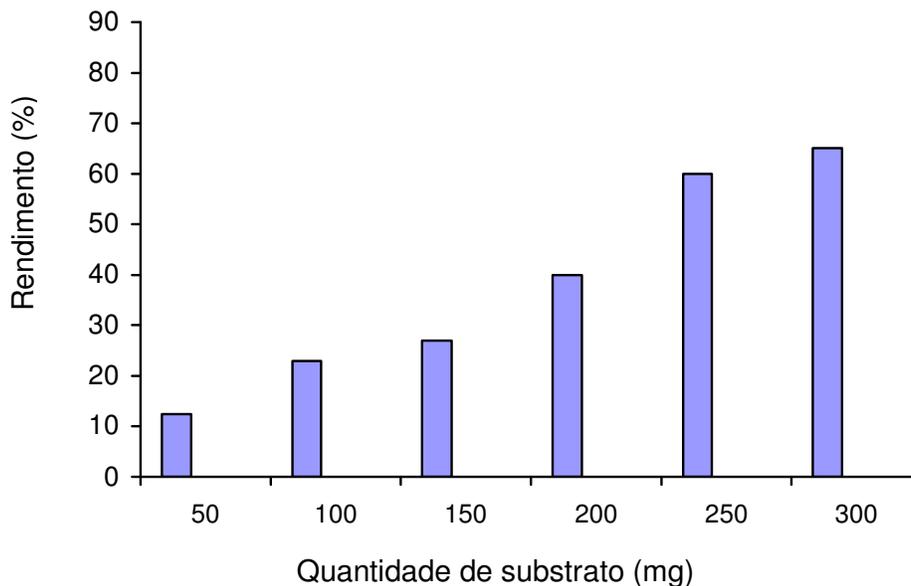


Figura 121. Rendimentos reacionais das acetilações do citronelol com EIACC obtidos pela variação da quantidade do substrato.

5.10.5. Influência da Temperatura

As moléculas de água que se encontram em torno das enzimas, exercem um importante papel na estabilidade térmica da proteína. Desta maneira, todas as reações que provocam terminativação irreversível de enzimas envolvem água livre e a desnaturação induzida pelo calor, necessitam de uma ampla mobilidade conformacional (AHM e KLIBANOV, 1985; ZALE e KLIBANOV, 1986).

Ao serem submetidas por um longo período de tempo a temperaturas elevadas, as enzimas sofrem modificações, expondo seus grupos reativos e áreas hidrofóbicas mais internas. Todo esse processo acarreta modificações químicas irreversíveis, conduzindo a um estado de desordenamento molecular da enzima (LIMA e ANGNES, 1999), podendo ocorrer deaminação 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 conduzem à inativação da enzima (VOLKIN e KLIBANOV, 1989). Esses processos exigem a participação de moléculas de água e, portanto, não devem ocorrer em ambientes livres de água como em solventes orgânicos anidros. Diversos trabalhos demonstraram a termoestabilidade de suspensões enzimáticas em solventes orgânicos, muito superior, que em soluções aquosas. Zaks e Klibanov (1984) demonstraram que a lipase pancreática de suínos em soluções aquosas a 100°C foi completamente inativada em menos de dois minutos, ao passo que nesta mesma temperatura, mantém elevada atividade por várias horas, se o percentual de água não superar 0,4%.

Visando otimizar o rendimento da reação de bioacetilação do citronelol, bem como avaliar a termoestabilidade de EIACC (complexo enzimático da ACC), foram realizados experimentos em outras temperaturas (40 e 60°C). As condições reacionais utilizadas nestes testes foram: EIACC (200 mg), citronelol (300 mg), anidrido acético (148 mg) e hexano (20 mL). Para cada temperatura os rendimentos foram monitorados em entre 1 e 24 horas de reação. Os resultados obtidos nas temperaturas de 40°C e 60°C encontram nos **Figuras. 122 e 123, p. 150-151**, respectivamente.

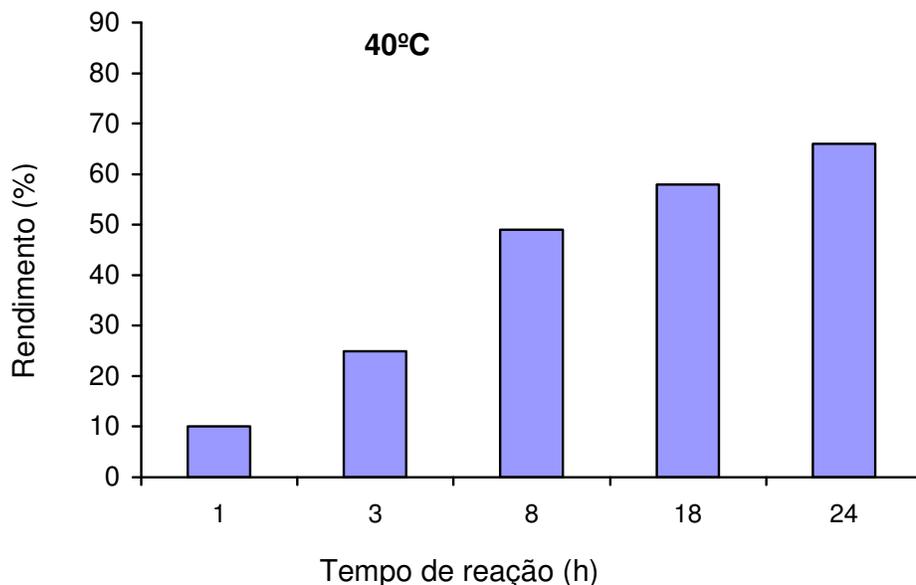


Figura 122. Rendimentos reacionais das acetilações do citronelol com EIACC obtidos a 40°C, com relação ao tempo de reação

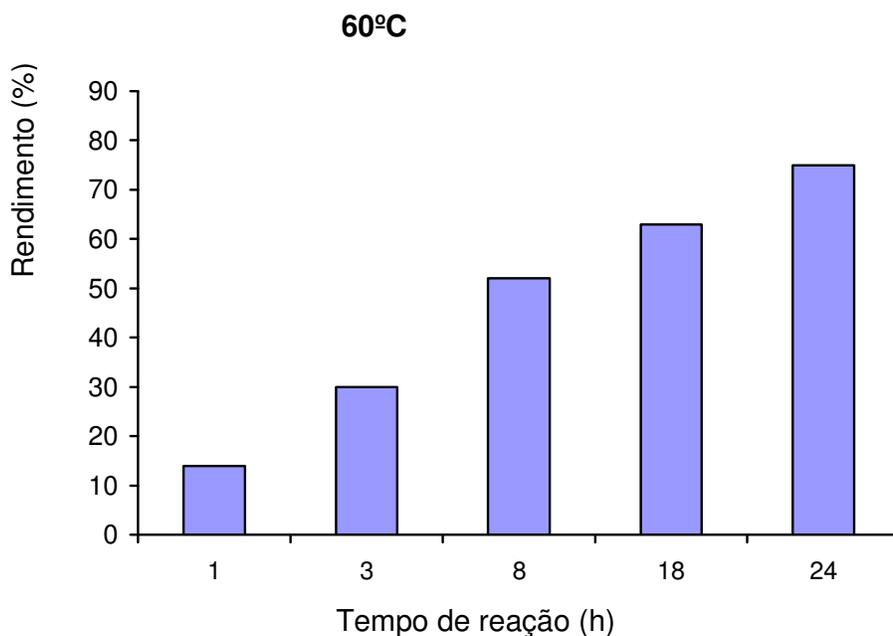


Figura 123. Rendimentos reacionais das acetilações do citronelol com EIACC obtidos a 60°C, com relação ao tempo de reação.

Observou-se um aumento considerável no rendimento reacional com a elevação da temperatura. A 40°C (**Figuras 122, p. 150**), foi detectado um rendimento de 10% com apenas 1 hora de reação. O valor (58%) obtido em somente 18 horas de reação a 40°C foi próximo daquele (70%) obtido em 72 horas de reação a 30°C. Com 24 horas de reação a 40°C verificou-se um leve aumento no rendimento (66%), indicando que o equilíbrio químico e, conseqüentemente, o rendimento máximo para essa temperatura, foram alcançados. O rendimento reacional máximo (75%) a 60°C (**Figuras 123, p. 151**) também foi observado após 24 horas de reação, mostrando-se um pouco superior a aquele obtido a 40°C (66%), um aumento percentual de 8%. Através dos referidos resultados foi concluído que rendimentos excelentes (75%) podem ser obtidos, em menor tempo, quando a reação de bioacetilação do citronelol com EIACC se processa a 70°C, indicando, também, uma boa termoestabilidade do complexo enzimático imobilizado.

5.11. Métodos para Determinação de Proteínas

O desenvolvimento de metodologias para determinação de proteínas vem experimentado surpreendente crescimento em virtude de sua fundamental importância em diversas áreas destacando-se na em estudos de nutrição humana (GANONG, 1995) e animal (McDONALD, EDWARDS e GREENHALGH, 1995), análises clínicas (GANONG, 1995), tecnologia de alimentos (FENNEMA, 1976), entre outras.

As proteínas desempenham papéis extremamente relevantes na maioria dos processos biológicos, atuando inclusive como enzimas. Assim, a determinação de proteínas pode servir como uma estimativa do potencial enzimático de um material biológico (ZAIA, ZAIA, LICHTIG, 1998).

As metodologias mais conhecidas utilizam a espectrofotometria no Ultravioleta-Visível (UV-Vis) como ferramenta para determinação de proteínas totais. Essas metodologias podem ser divididas em dois grupos:

- ❖ *Reação química com as proteínas*: Métodos de Lowry, Método do ácido bicincônico (BCA), Método do Ftaldeído-mercaptoetanol, Método de Biureto e Método da p-Benzoquinona.

- ❖ *Fixação de corantes às proteínas*: Método de Bradford, Método de Fixação da prata, Método do ouro coloidal e Marcação radioativa.

Todos esses métodos devem apresentar alguns aspectos imprescindíveis para que possam ser utilizados com eficiência e confiabilidade, tais como: alta sensibilidade, especificidade, baixo custo, rapidez e fácil manuseio.

Os métodos mais comumente utilizados em rotinas de laboratórios foram aplicados na determinação do conteúdo de proteínas da água-de-coco (ACC),

ou sejam, o Método de Lowry, modificado por Hartree (HARTREE, 1972). O método se baseia em uma reação química com as enzimas.

5.11.1. Determinação de Proteínas no ACC pelo Método de Lowry

É o método mais utilizado e baseia-se na redução do reagente de Folin-Ciocalteu (molibdato, tungstato e ácido fosfórico) quando posto em contato com a proteína, na presença de cobre (II), produzindo um composto com absorção máxima em 650 nm (ZAIA, ZAIA, LICHTIG, 1998).

Segundo CHOU e GOLDSTEIN (1960), que estudaram extensivamente o mecanismo de redução do reagente de Folin-Ciocalteu por enzimas, peptídeos ou aminoácidos, esta reação deveria ocorrer através das cadeias laterais de alguns aminoácidos (tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina), que contribuem com quatro elétrons, ou através da retirada de dois elétrons de cada unidade dos peptídeos e proteínas, sendo facilitada pelo quelato cobre (II)-peptídeo/proteína.

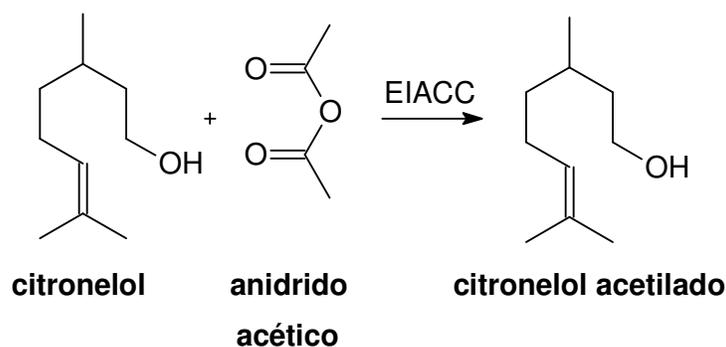
A principal vantagem do método de Lowry é sua alta sensibilidade, embora diversos interferentes possam diminuir essa característica. Compostos fenólicos, lipídeos, detergentes, ácido úrico, guanina e xantina, sulfato de amônio, melanina, açúcares, entre outros, interferem na determinação de proteínas por este método (LUCARINI e KILIKIAN, 1999).

Este método foi utilizado na determinação do conteúdo de proteínas do ACC, sendo encontrado um teor de 1,2% de proteínas totais, superior aos registrados na literatura (1%) para outras espécies vegetais (NASSAR, 1986) e 0,7% (MACHADO, 2004). O resultado obtido sugeriu que o ACC poderia apresentar uma boa atividade biocatalítica, visto que, em geral, o teor de enzimas pode ser refletido pelo de proteínas.

5.12. Reações de esterificação usando enzimas imobilizadas da água-de-coco.

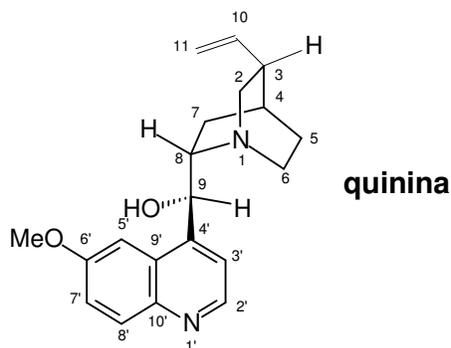
A reação selecionada para usar as enzimas imobilizadas da ACC foi de acetilação baseado em resultados anteriores com Manihot (MACHADO et. al, tetrahedron, 2008).

Visando verificar a eficiência do sistema imobilizado da água-de-coco em alginato de sódio, testou-se as enzimas inicialmente com reação de acetilação do citrionelol. Numa primeira condição, foram utilizados 200 mg (1,28 mmol) do álcool, 130,6 mg (1,28 mmol) de anidrido acético (doador de grupo acila) em 20 mL de hexano PA, sob agitação mecânica com velocidade de 150 rotações por minuto (rpm) à temperatura de 30°C e tempo de reação de 72 horas. O rendimento reacional foi bastante satisfatório, 55%.



Analisou-se vários parâmetros como quantidade de enzima, substrato usado, solvente e temperatura. Criando-se uma otimização do sistema enzimático, o qual foi capaz de imobilizar o citrionelol com rendimento de 70%. Nas seguintes condições de otimização: a temperatura foi de 60°C, quantidade enzimática de 200 mg, quantidade de substrato 300 mg (1,92 nmol), quantidade de reagente acetilante de 1,92 nmol, solvente: hexano (hidrofílico) e/ou acetonitrila (polaridade moderada) e tempo de reação ideal de 60 horas. Todos esses parâmetros estão presentes nas **Figuras 118-123 (p. 145-151)**.

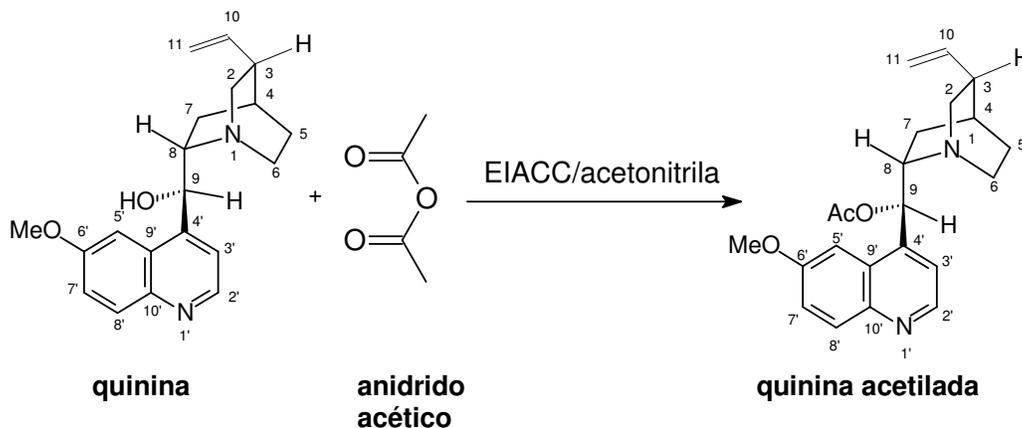
Completado a otimização da reação de acetilação do citrionelol, passou-se a verificar o sistema enzimático do ACC em outras moléculas. Neste estudo selecionou-se a quinina, um alcalóide natural pertencente ao grupo dos alcalóides quinolidínicos, comumente encontrado nas espécies da *Cinchona* spp (MORELAND et. al. 1974). A quinina apresenta hidroxila secundária possível de ser acetilada além de outras grupos funcionais. Este alcalóide apresenta como uma de suas principais funções biológicas, atividade no tratamento contra a malária, doença infecciosa aguda ou crônica causada por protozoários parasitas do gênero *Plasmodium*, especialmente a espécie *Plasmodium falciparum* transmitidos pela picada do mosquito *Anopheles*, e a vantagem do uso da quinina no tratamento da malária em relação a outras drogas é o fato de não causar resistência ao parasita (BACKER et al. 1965; SHIBUYA et.al. 2003). A malária é uma doença endêmica da região amazônica o qual mata 3 milhões de pessoas por ano (MANUAL DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA MALÁRIA, 2005), uma taxa só comparável à da SIDA/AIDS, e afeta mais de 500 milhões de pessoas todos os anos.



As reações de acetilação usando a quinina e as enzimas imobilizadas foi feita usando metodologia já desenvolvida em nossos laboratórios (MACHADO et. al, 2008) e utilizou-se como agente acilante o anidrido acético.

5.12.1. Curvas de calibração do benzilado e acetilado da quinina

A reação de bioacetilação da quinina foi realizada usando procedimento semelhante ao desenvolvimento para a acetilação do citrônolol:



A quantificação desta reação foi feita por CLAE e pode ser vista no **Gráfico 1 (p. 157)**. De acordo com a curva de calibração obteve-se um rendimento de 73,70% de acetilação. Para o caso específico de quinina a acetilação foi regioseletiva acetilando somente a função álcool, mantendo a função amina inalterada.

Foram feitas as curvas de calibração para ambos a quinina acetilada e a quinina benzilada nas seguintes condições: fluxo:1 mL/min; Fase móvel: MeOH: Acetonitrila (9:1) com $\lambda = 254$ nm.

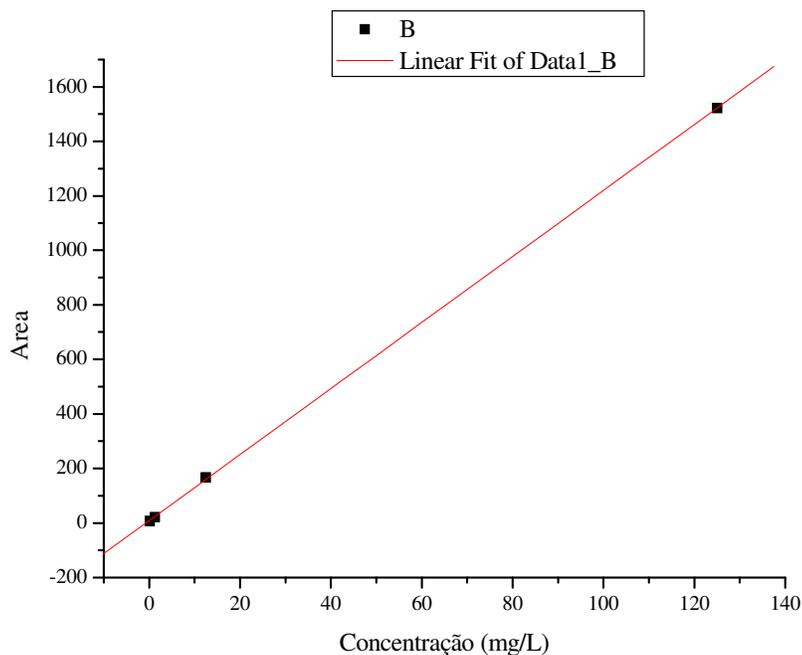
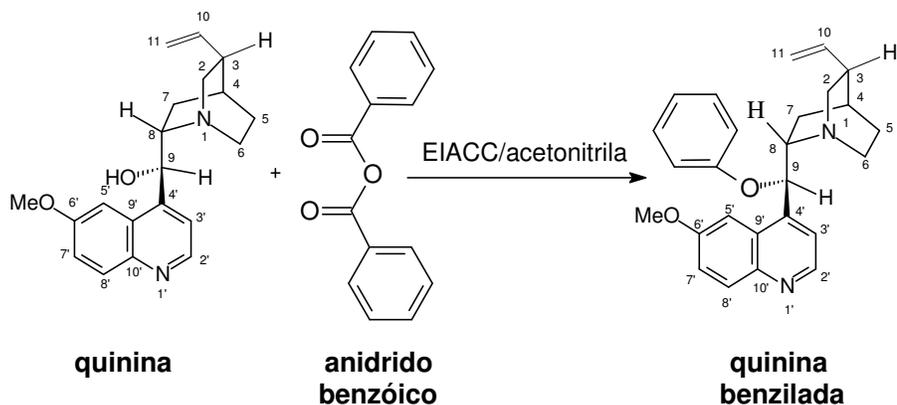


Gráfico 1. Curva da quinina acetilada nas seguintes condições $y=9,24034+12,10679x$, com $R=0,99678$; concentração da mistura reacional: 40 mg/L; concentração do acetilado na mistura: 29,48 mg/L e porcentual: 73,70 %.

Dando continuidade à obtenção de derivados esterificados da quinina e por termos encontrado resultados satisfatórios com acetilação, usou-se ainda as enzimas imobilizadas de ACC (EIACC) em reação de benzilação da quinina com a seguinte equação:



a quantificação do derivado benzilado foi feito por CLAE, usando curva de calibração, no **Gráfico 2** (p. 158).

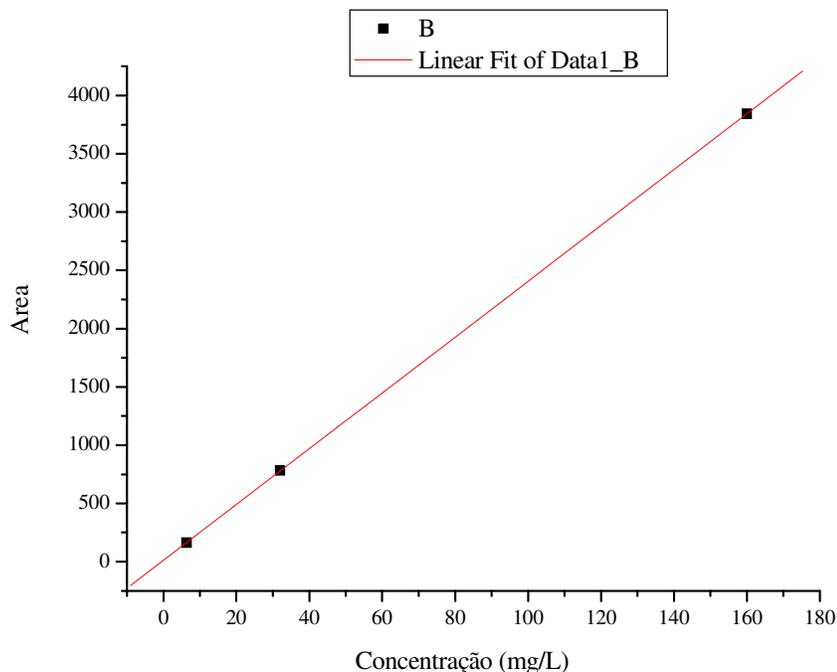


Gráfico 2. Curva da quinina benzilada nas seguintes condições: $y=10,45712+23,9499x$, com $R=0,997562$; concentração da mistura reacional: 120 mg/L; concentração do benzilado na mistura: 42,95 mg/L e porcentual: 35,79%.

Para a reação de benzilação obteve-se um rendimento de 35,79%. Mais uma vez a reação foi regioseletiva, benzilando apenas a função álcool presente na quinina e mantendo a função amina inalterada.

5.12.2. Conversão da quinina **23** em quinina acetilada **23'acil** a partir da enzima imobilizada da água-de-coco.

A quinina acetilada foi obtida na forma um filme com solubilidade em clorofórmio. A quantificação da quinina acetilada feita também por RMN ^1H , usando-se o procedimento do **Ítem 4.8.2, p. 35**. e curva de calibração no **ítem 5.12.1, p. 156**.

Por este método de quantificação foi possível obter a determinação estrutural do derivado acetilado **23'acil** que foi feita principalmente por análise dos dados de RMN ^1H e ^{13}C .

As amostras foram analisadas através de RMN ^1H e EMIE, onde para a RMN, foi usada a área de integração do singlete do hidrogênio metílico do grupo acetil em δ_{H} 2,17 de **23'acil**, comparada ao dubleto formado pelo hidrogênio ligado diretamente ao carbono cabinólico em C-9 do **23**, δ_{H} 5,49 (d), dados adicionais de RMN estão presentes da **Tabela 11, p. 161**.

O espectro de RMN ^1H de **23'acil** (**Fig. 126a/126b, p. 164**) as principais absorções foram um singlete em δ_{H} 2,17 (s), relacionado a grupo metila ligado a acila, outra em 3,98 (s), equivalente a uma metoxila, e alguns sinais de aromáticos δ_{H} 8.68 (d), δ_{H} 7.28 (d), δ_{H} 7.43 (d), δ_{H} 7.36 (dd) e δ_{H} 8.01 (d) ppm, em comparação com o **23**, que só apresentou um singlete da metoxila em δ_{H} 3.85 (s) e os aromáticos δ_{H} 8.36 (d), δ_{H} 7.41 (d), δ_{H} 7.22 (d), δ_{H} 7.20 (dd) e δ_{H} 7.79 (d).

O espectro de RMN ^{13}C de **23'acil** (**Fig. 127a, p. 165**) nos informou a presença de 11 sinais de carbonos do tipo sp^2 onde 9 são de aromáticos e 2 são de carbonos olefínicos, onde em comparação com o RNM ^{13}C -dept135 (**Fig. 127b, p. 165**), foi possível detectar 5 carbonos não hidrogenados. Por se tratar de uma estrutura não muito comum, foram feitos também o COSY, HSQC e HMBC. Onde as possíveis correlações são mostradas na **Tabela 11 (p. 161)**, Figuras: **128a/128b** (COSY, **p. 166**),

129a/129b (HSQC, p. 167), **130** (HSQC, p. 168), **131a/131b** (HMBC, p. 169) e **132** (HMBC, p. 170).

De acordo com os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento, foi permitido confirmar que **23'acil** trata-se da quinina acetilada na posição da hidroxila em C-9.

Tabela 11. Dados de RMN ^1H , ^{13}C e bidimensionais da quinina **23** e quinina acetilada **23'acil**.

	23'acil , em CDCl_3				23 , em CDCl_3	
	HSQC		HMBC		δ_{C}	δ_{H}
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$		
C						
4'	144.17	-	H-9	H-2'; H-8'	148.33	-
6'	158.21	-	H-5'; H-7'	H-8'	157.44	-
9'	126.39	-		H-3'; H-9	126.16	-
10'	142.79	-		H-2'; H-5'; H-7'; H-9	143.79	-
AcO-9	169.21	-	Me, (δ_{H} 2.17)	H-9	-	-
C						
H						
3	38.30	2.45 (m)	2H-2; H-10	2H-11	39.76	2.20 (m)
4	27.42	1.92 (m)	2H-5; 2H-7	H-2a; H-6b	27.71	1.75 (m)
8	58.87	3.33	2H-7; h-9	2H-2; H-6b	59.85	3.04 (m)
9	72.12	6.74 (d, 3.3)		H-3'; 2H-7	71.51	5.49 (d, 2.3)
10	139.72	5.64 (m)	2H-11		141.66	5.66 (dd, 17.1, 10.3)
2'	146.74	8.68 (d, 4.5)	H-3'		147.01	8.36 (d, 4.5)
3'	117.90	7.28 (d, 4.5)	H-2'	H-9	121.09*	7.41 (d, 4.5)
5'	101.03	7.43 (d, 2.5)		H-7'	101.40	7.22 (d, 2.1)
7'	122.72	7.36 (dd, 9.2, 2.5)		H-5'	118.30*	7.20 (dd, 2.1, 9.1)
8'	131.24	8.01 (d, 9.2)			130.89	7.79 (d, 9.1)
CH₂						
2	55.11	3.23 (m), 2.78 (dd, 4.8, 2.5)		H-8	56.86	2.99 (dd, 13.6, 10.4), 2.57 (dl, 13.6)
5	26.25	1.85, 1.67	H-6a		27.46	1.71 (m), 1.43 (m)
6	42.33	3.33, 2.97 (m)		2H-2; H-4; H-8	43.00	3.48 (m), 2.54 (m)
7	21.75	1.82, 1.65			21.44	1.72 (m), 1.42 (m)
11	115.71	4.98 (d, 17.1), 4.95 (d, 10.4)			114.08	4.90 (d, 17.1), 4.85 (d, 10.3)
CH₃						
MeO	56.11	3.98 (s)			55.44	3.85 (s)
AcO-9	21.15	2.17 (s)			-	-

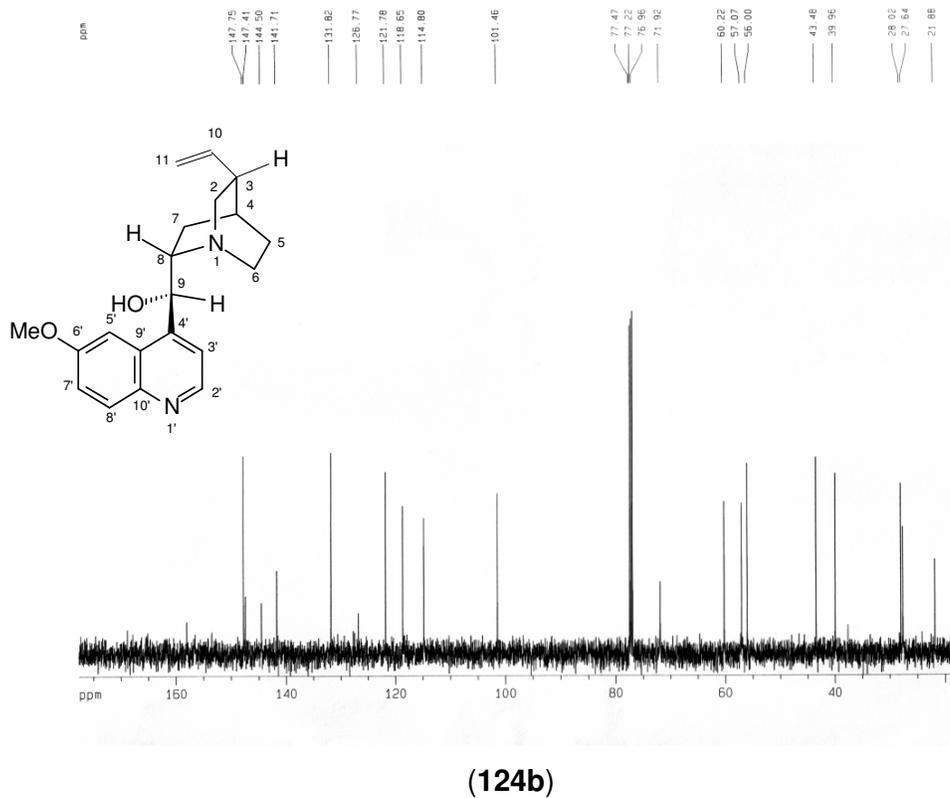
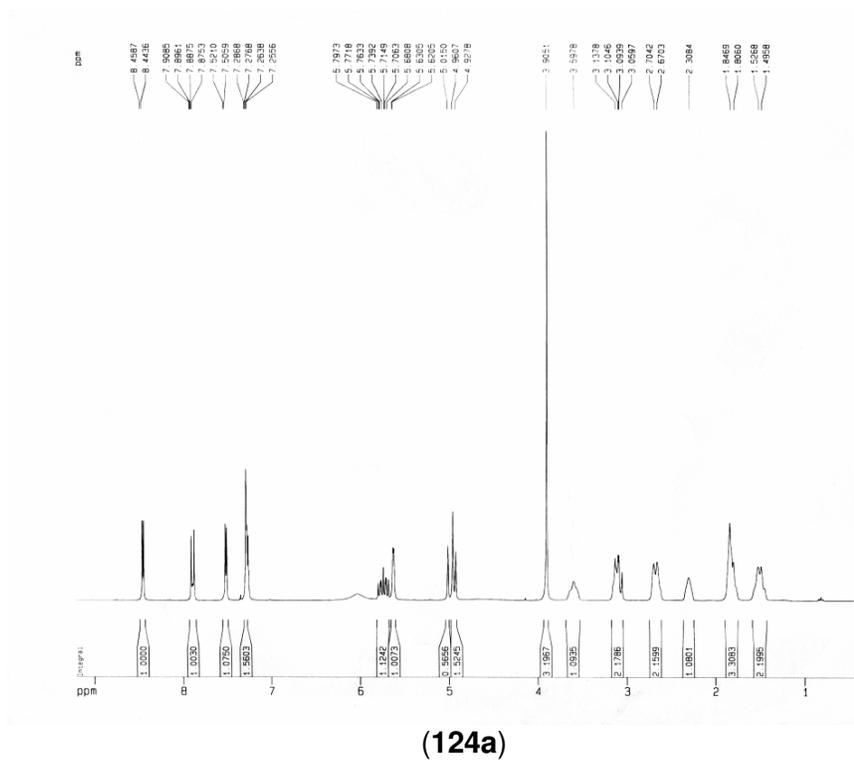
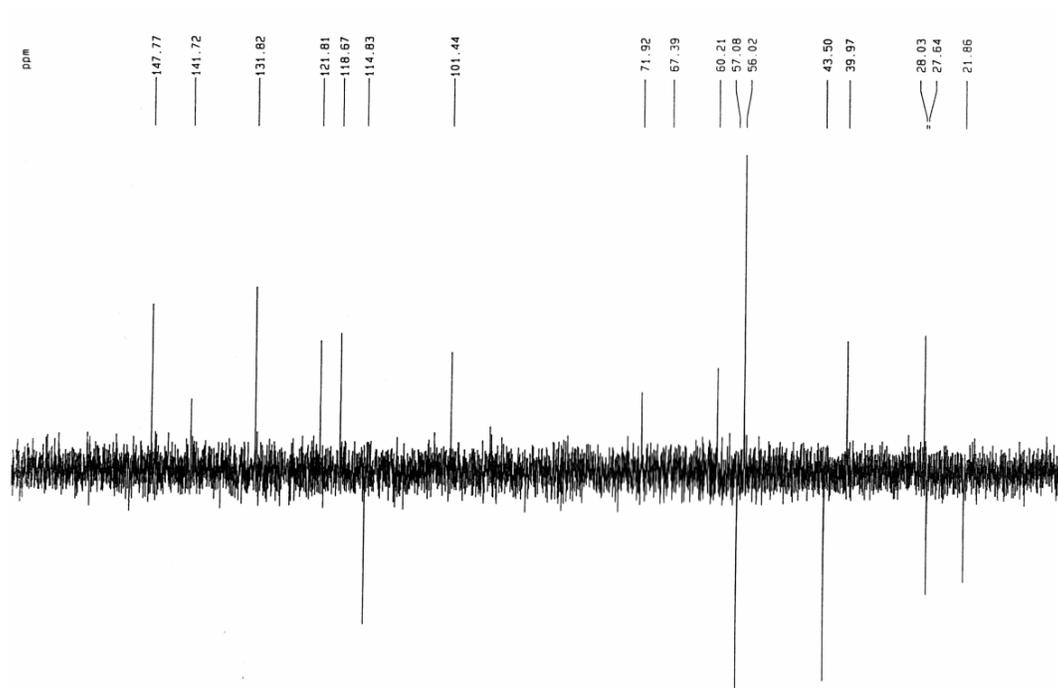
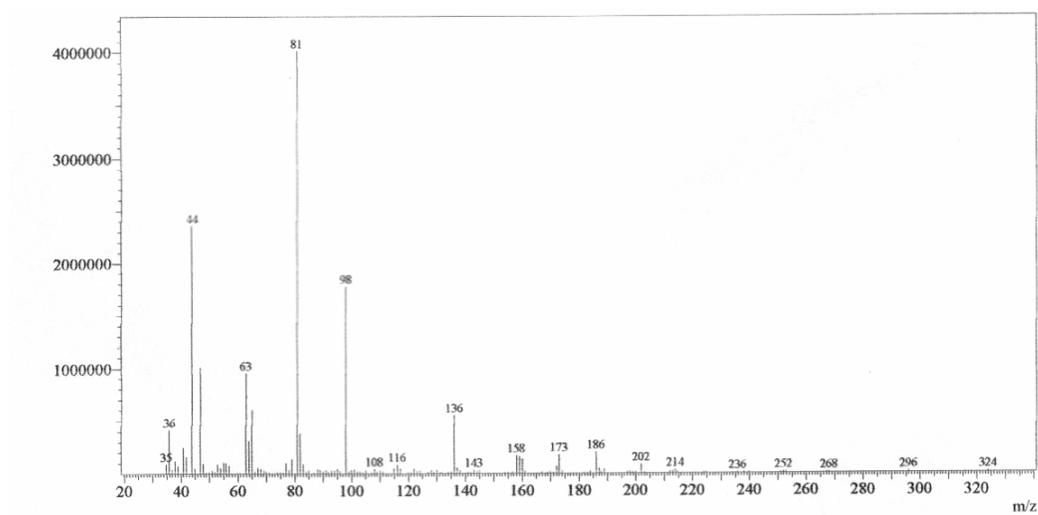


Figura 124. (124a) Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **23**; (124b) Expansão de RMN ^1H de **23**.



(125a)

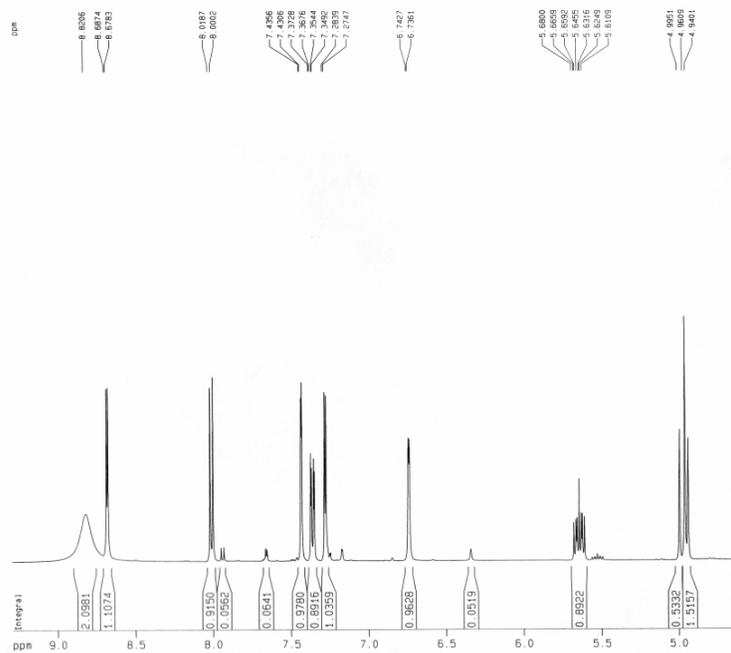


(125b)

Figura 125. (125a) Espectro RMN ^{13}C -DEPT135 (500 MHz, CDCl_3) de **23**; (125b) EIMS de **23**.

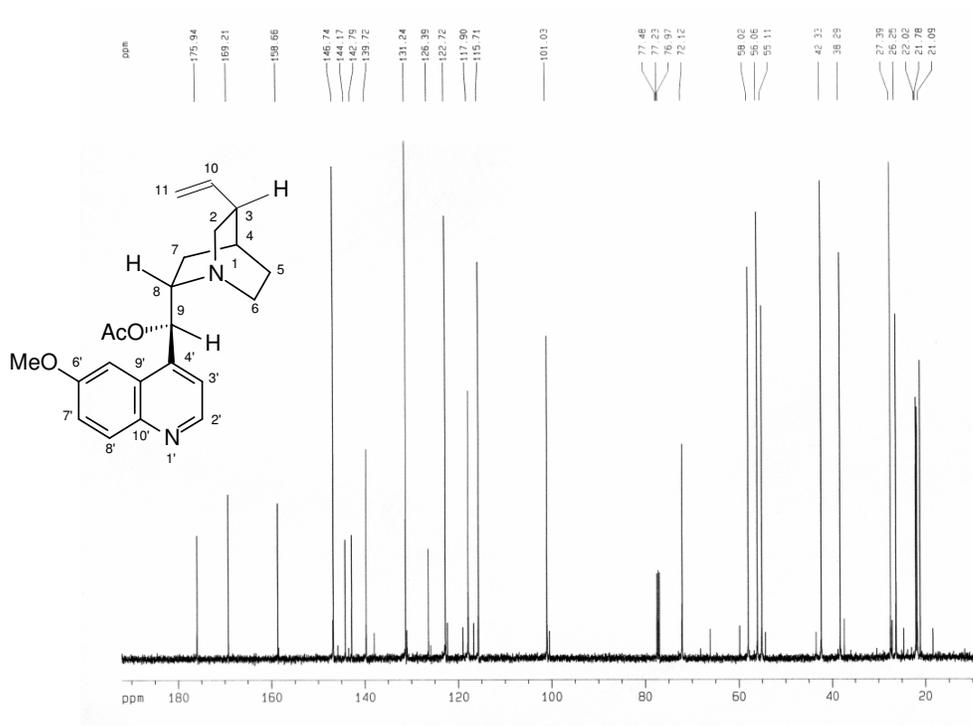


(126a)

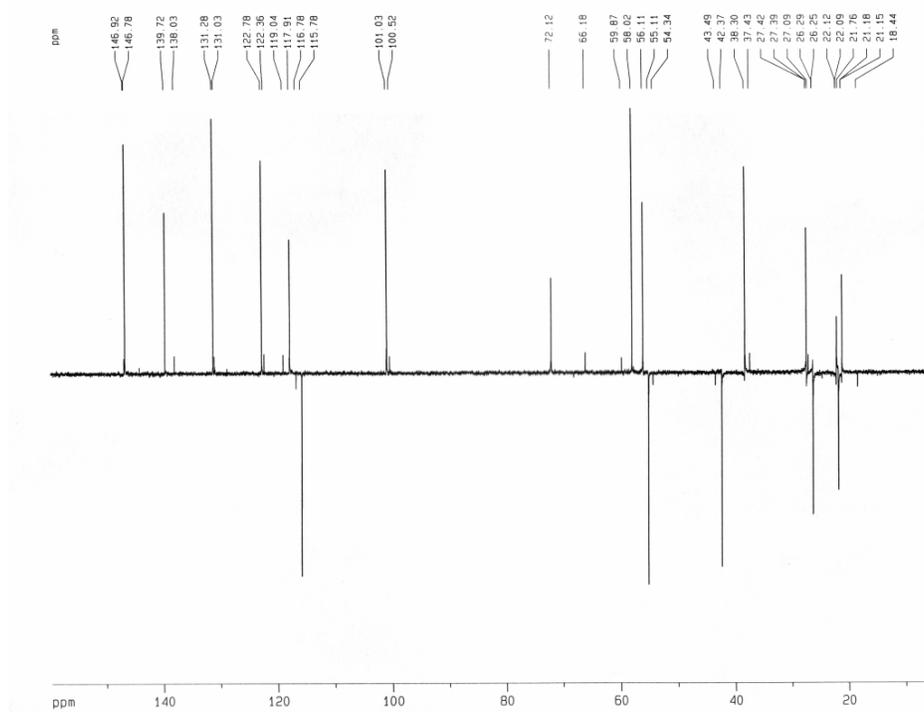


(126b)

Figura 126. (126a) Espectro RMN H^1 (500 MHz, CD_3OD) de 23'acil; (126b) Espectro RMN H^1 (500 MHz, CD_3OD) de 23'acil.

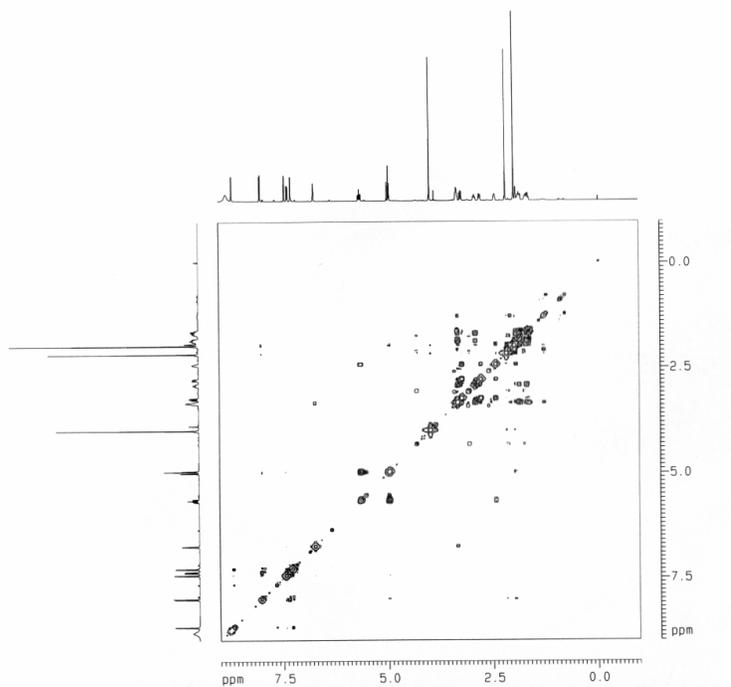


(127a)

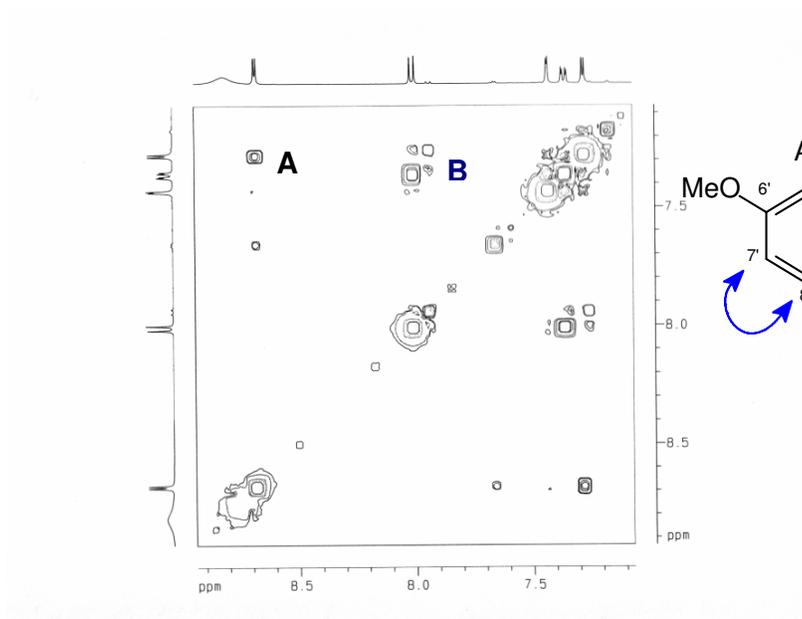


(127b)

Figura 127. (127a) Espectro RMN ^{13}C (500 MHz, CD_3OD) de **23'acil**;
 (127b) Espectro RMN ^{13}C (500 MHz, CD_3OD) **23'acil**.



(128a)



(128b)

Figura 128. (128a) Espectro total de COSY (500 MHz, CDCl_3) de **23'acil**;
(128b) Expansão de COSY (500 MHz, CDCl_3) de **23'acil**.

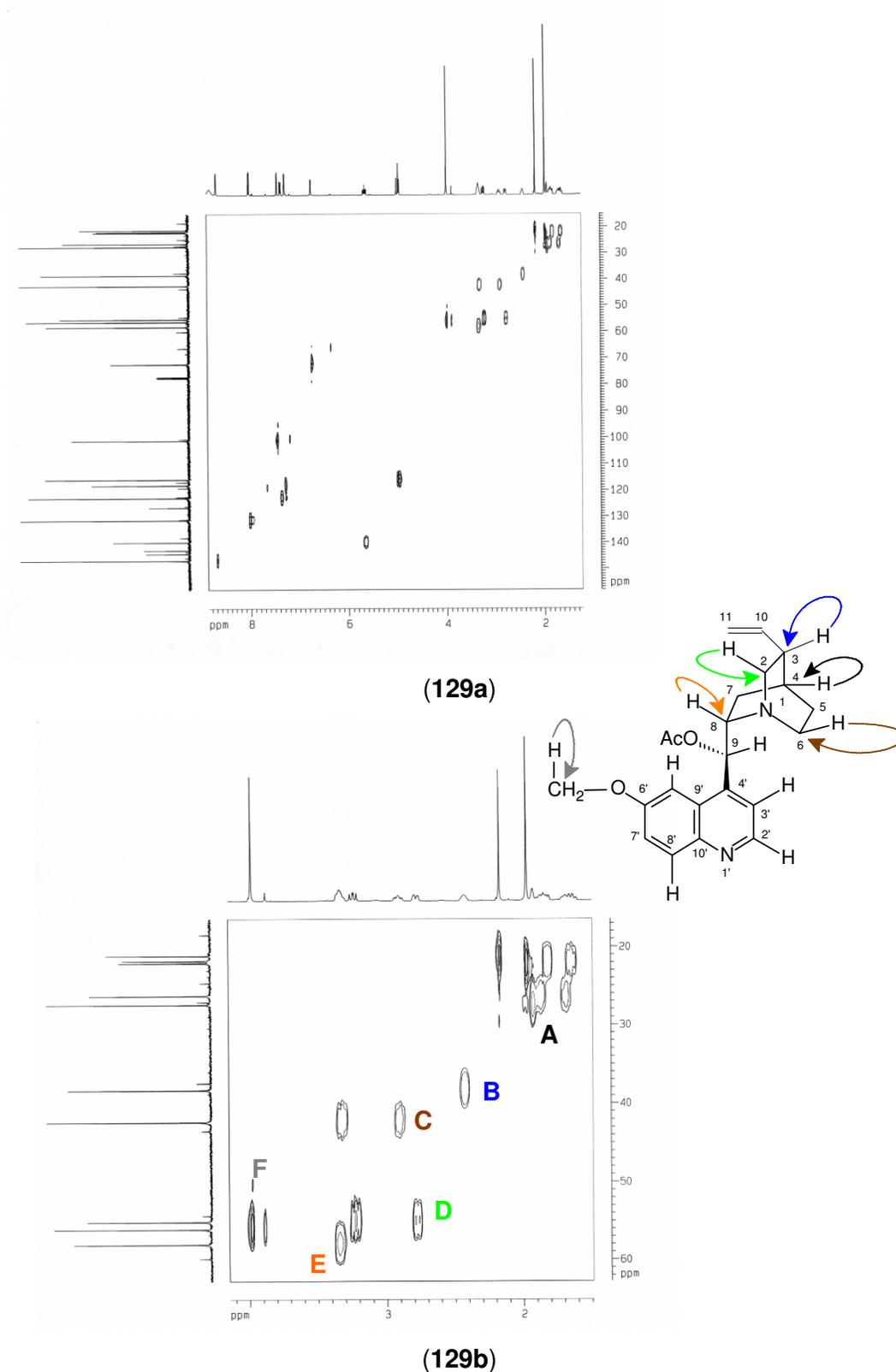


Figura 129. (129a) Espectro total de HSQC (500 MHz, CDCl_3) de **23'acil**; (129b) Expansão de HSQC (500 MHz, CDCl_3) de **23'acil**.

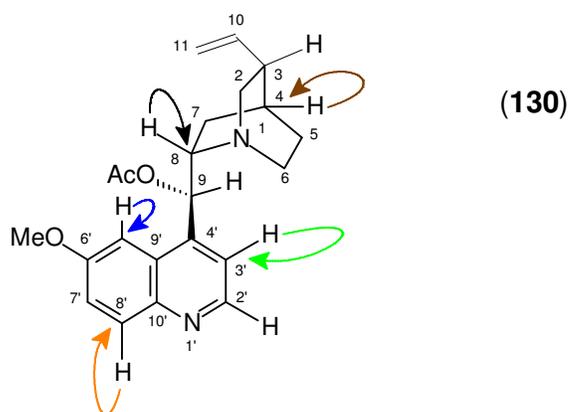
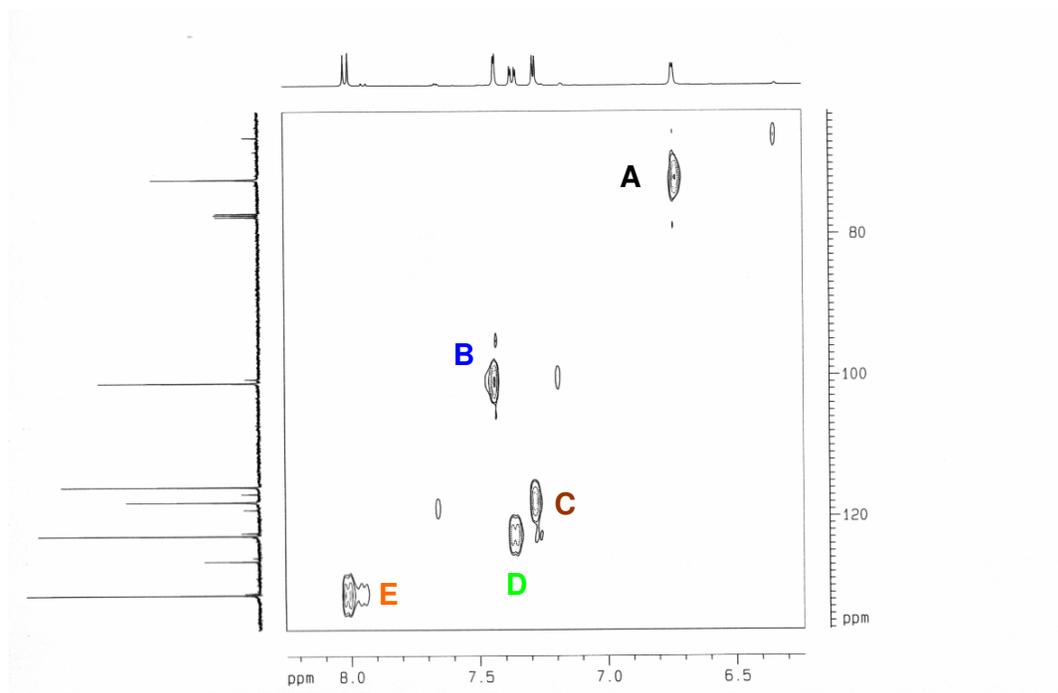


Figura 130. Expansão de HSQC (500 MHz, CDCl_3) de **23'acil**.

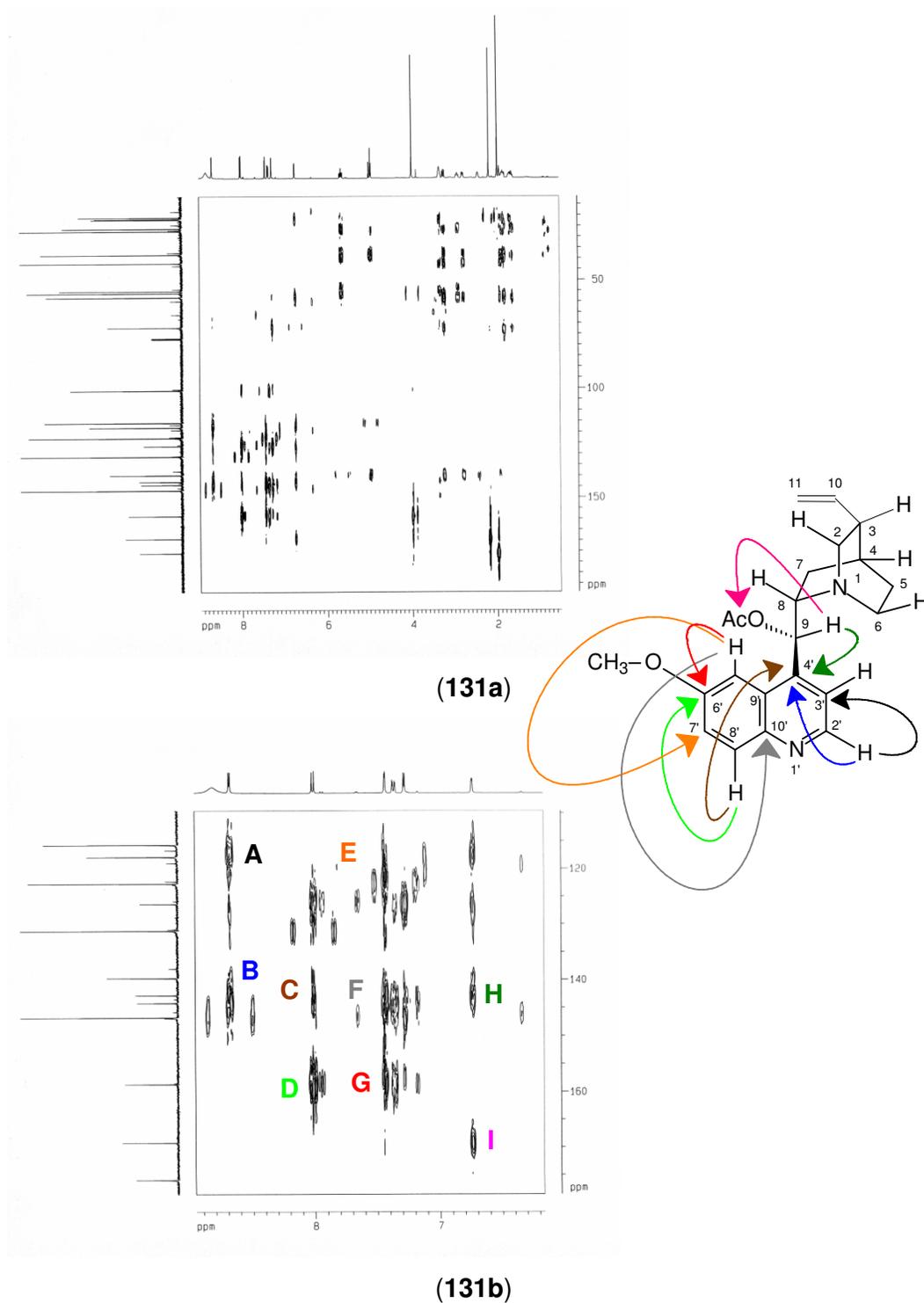
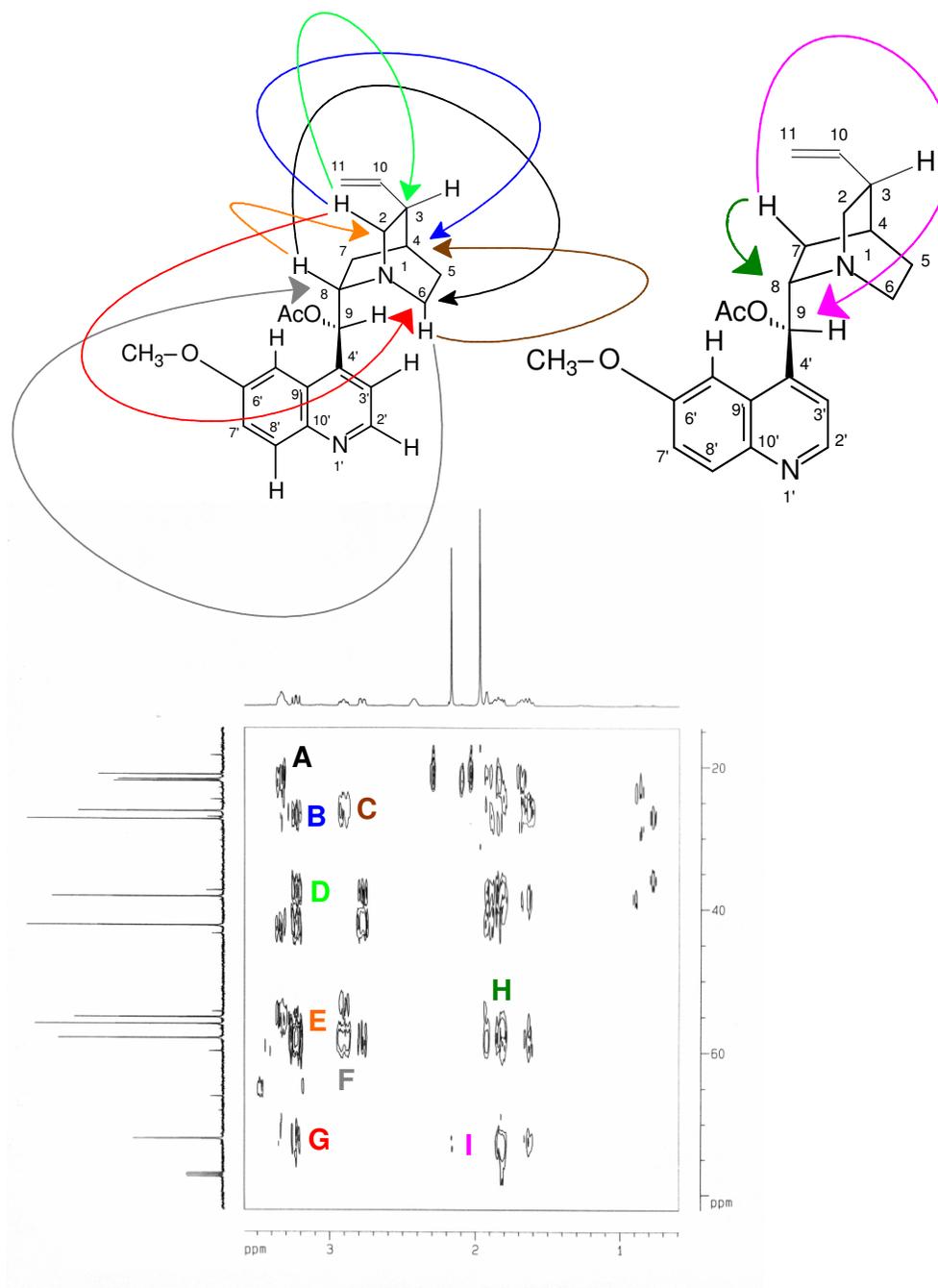


Figura 131. (131a) Espectro total de HMBC (500 MHz, CDCl_3) de **23'acil**; (131b) Expansão de HMBC de **23'acil**.



(132)

Figura 132. Expansão de HMBC (500 MHz, CDCl_3) de 23'acil.

5.12.3. Conversão da quinina **23** em quinina benzilada **23''** a partir da enzima imobilizada da água-de-coco.

Após caracterização do derivado acetilado da quinina, optamos então a benzilação da hidroxila da quinina, usando o anidrido benzóico como agente benzilante e enzimas imobilizadas do ACC.

A reação foi monitorada por CCD observando-se a formação de um composto de menor polaridade com característica de um filme incolor **23''**.

A amostra foi analisada através de RMN ^1H e CLAE, e para quantificação por RMN, foi usada a área de integração do singleto do hidrogênio metílico do grupo metoxila em δ_{H} 4,00 de **23''**, comparada ao também singleto formado pela metoxila de **23**, δ_{H} 3,85 (s), alguns outros dados adicionais estão presentes da **Tabela 12, p. 173**. Por essa técnica foi possível calcular o rendimento que foi de aproximadamente 35,79%.

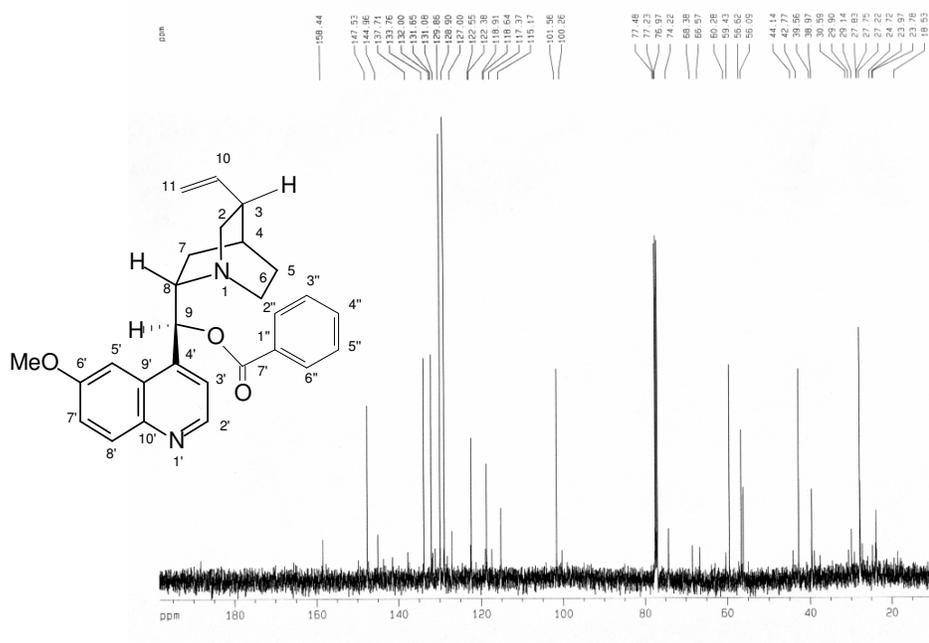
O espectro de RMN ^1H de **23''** (**Fig. 133, p. 174**) as principais absorções foram os hidrogênios em δ_{H} 8.11 (d, 7.8), δ_{H} 7.50 (t, 7.8) e δ_{H} 7.63 (t, 7.8), relacionados aos aromáticos do grupo benzila, além da metoxila em 4,00 (s) e alguns sinais de aromáticos do anel quinidínico, δ_{H} 8.71 (d, 4.5), 7.42 (d, 4.5), 7.56 (d, 2.1), 7.39 (dd, 9.2, 2.1), 8.03 (d, 9.2) ppm, em comparação com a quinina **23**, que só apresentou um singleto da metoxila em δ_{H} 3.85 (s) e os aromáticos δ_{H} 8.36 (d), δ_{H} 7.41 (d), δ_{H} 7.22 (d), δ_{H} 7.20 (dd) e δ_{H} 7.79 (d).

O espectro de RMN ^{13}C de **23''** (**Fig. 134a, p. 175**) também nos informou que existem 13 sinais de carbonos do tipo sp^2 sendo 10 de carbonos aromáticos, uma carbonila e 2 são de carbonos olefínicos, onde em comparação com o RNM ^{13}C -dept135 foi possível detectar 6 carbonos não hidrogenados. Por se tratar de uma estrutura diferente, foram feitos também o COSY, HSQC e HMBC. Onde as possíveis correlações são mostradas também na **Tabela 12 (p. 173)** e **Figuras: 135a/135b (COSY, p. 176), 136a/136b e (HSQC, p. 177)**.

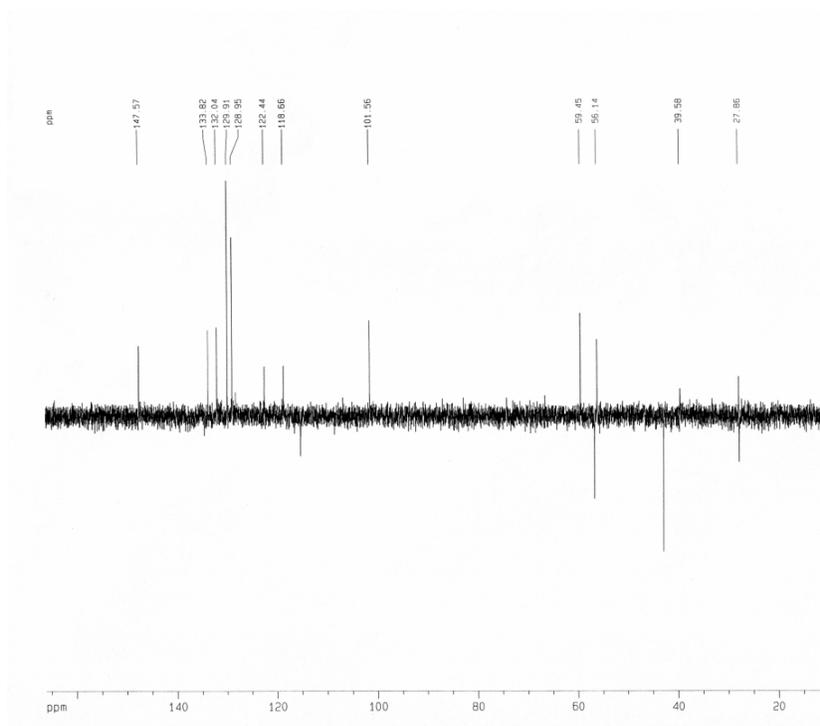
De acordo com os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento, foi permitido confirmar que **23** trata-se da quinina benzilada na posição da hidroxila em C-9, produzida na reação com a água-de-coco com o composto **23** através de uma benzilação com as enzimas da água-de-coco.

Tabela 12. Dados de RMN ^1H , ^{13}C e bidimensionais da quinina **23** e quinina benzilada **23''**.

	Quinbenzil, em CDCl_3				Literatura [1], em CDCl_3	
	HSQC		HMBC	II	III	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{C}
C						
4'	144.96	-	H-3'	H-2'; H-5'	148.33	144.26
6'	158.44	-	H-7'	MeO-6'; H-8'	157.44	157.44
9'	127.00	-		H-2' ($^4\text{J}_{\text{CH}}$); H-3'; H-8'	126.16	126.43
10'	143.39	-	H-8'	H-2'; H-7'	143.79	144.61
1''	137.71	-			-	-
7''	165.00	-		H-2''/H-6''		
CH						
3	39.56	2.37 (sl)	H-4; H-10	2H-11	39.76	39.62
4	27.83	1.95 (m)		H-10	27.71	28.11
8	59.43	3.51 (m)			59.85	61.32
9	74.22	6.87 (sl)		H-3'	71.51	71.17
10	141.31	5.81 (dd)	2H-11		141.66	141.18
2'	147.57	8.71 (d, 4.5)	H-3'		147.01	147.30
3'	118.91	7.42 (d, 4.5)	H-2'		121.09*	121.04*
5'	101.56	7.56 (d, 2.1)		H-7'; H-8' ($^4\text{J}_{\text{CH}}$)	101.40	102.47
7'	122.38	7.39 (dd, 9.2, 2.1)		H-5'	118.30*	119.87*
8'	132.00	8.03 (d, 9.2)			130.89	131.33
2''/6''	129.86	8.11 (d, 7.8)	H-3''/H-5''		-	-
3''/5''	128.90	7.50 (t, 7.8)	H-2''/H-6''; H-4''		-	-
4''	133.78	7.63 (t, 7.8)		H-2''/H-6''	-	-
CH₂						
2	56.62	3.17 (dd, 13.5, 10.5)		H-8; H-10	56.86	55.25
5	27.75	1.84 (m), 1.64 (m)			27.46	27.08
6	42.77	3.28 (m), 2.78 (m)		H-8	43.00	40.55
7	23.78	1.87 (m), 1.85 (m)	H-8		21.44	24.92
11	115.17	5.04 (d), 5.02 (d)			114.08	114.83
CH₃						
MeO	56.14	4.00 (s)			55.44	55.74



(134a)



(134b)

Figura 134. (134a) Espectro RMN ^{13}C -BB (500 MHz, CDCl_3) de **23''**; (134b) Espectro RMN ^{13}C -DEPT135 (500 MHz, CDCl_3) de **23''**.

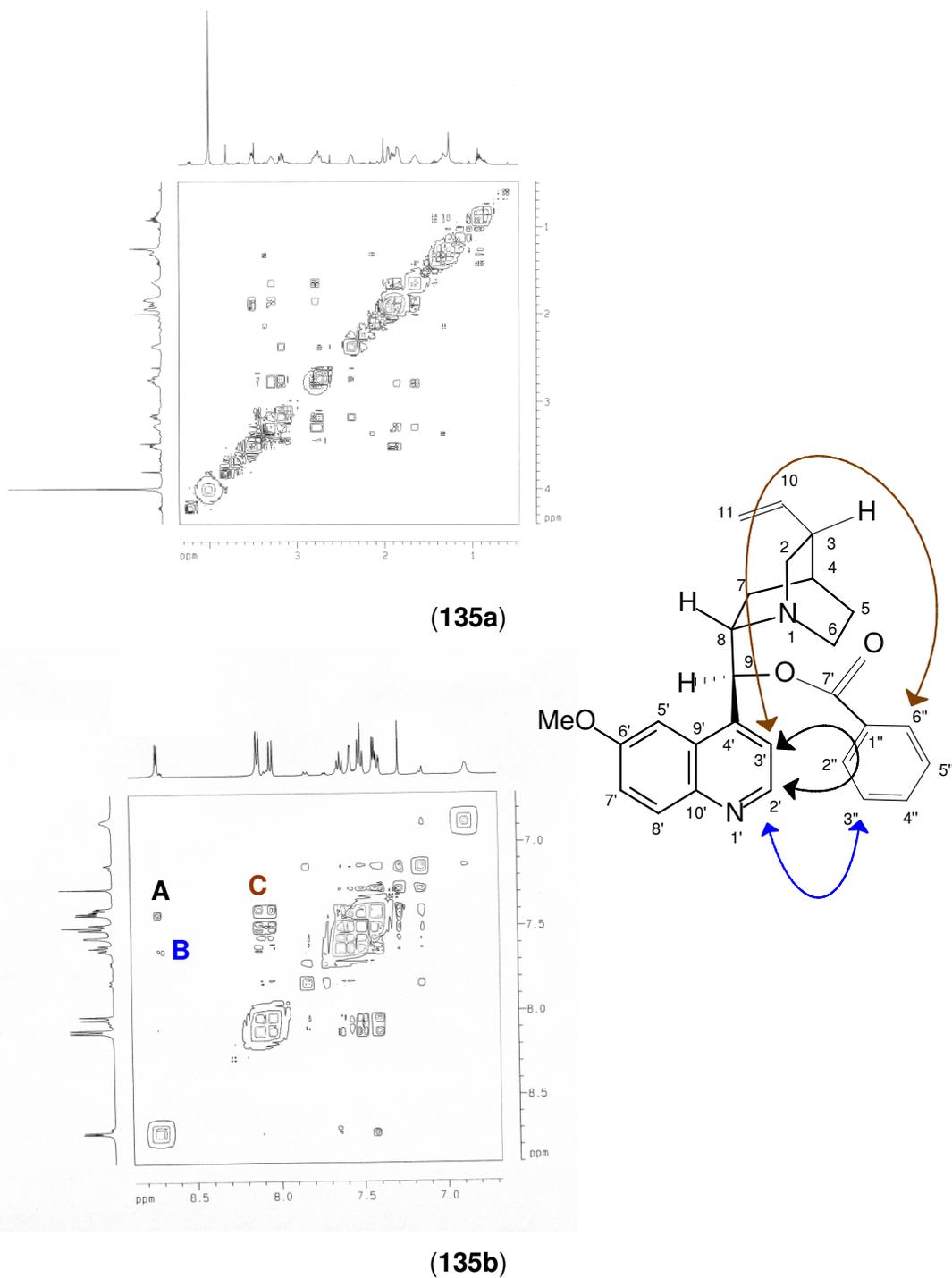


Figura 135. (135a) Espectro total COSY (500 MHz, CDCl₃) de 23''; (135b) Expansão de COSY (500 MHz, CDCl₃) de 23''.

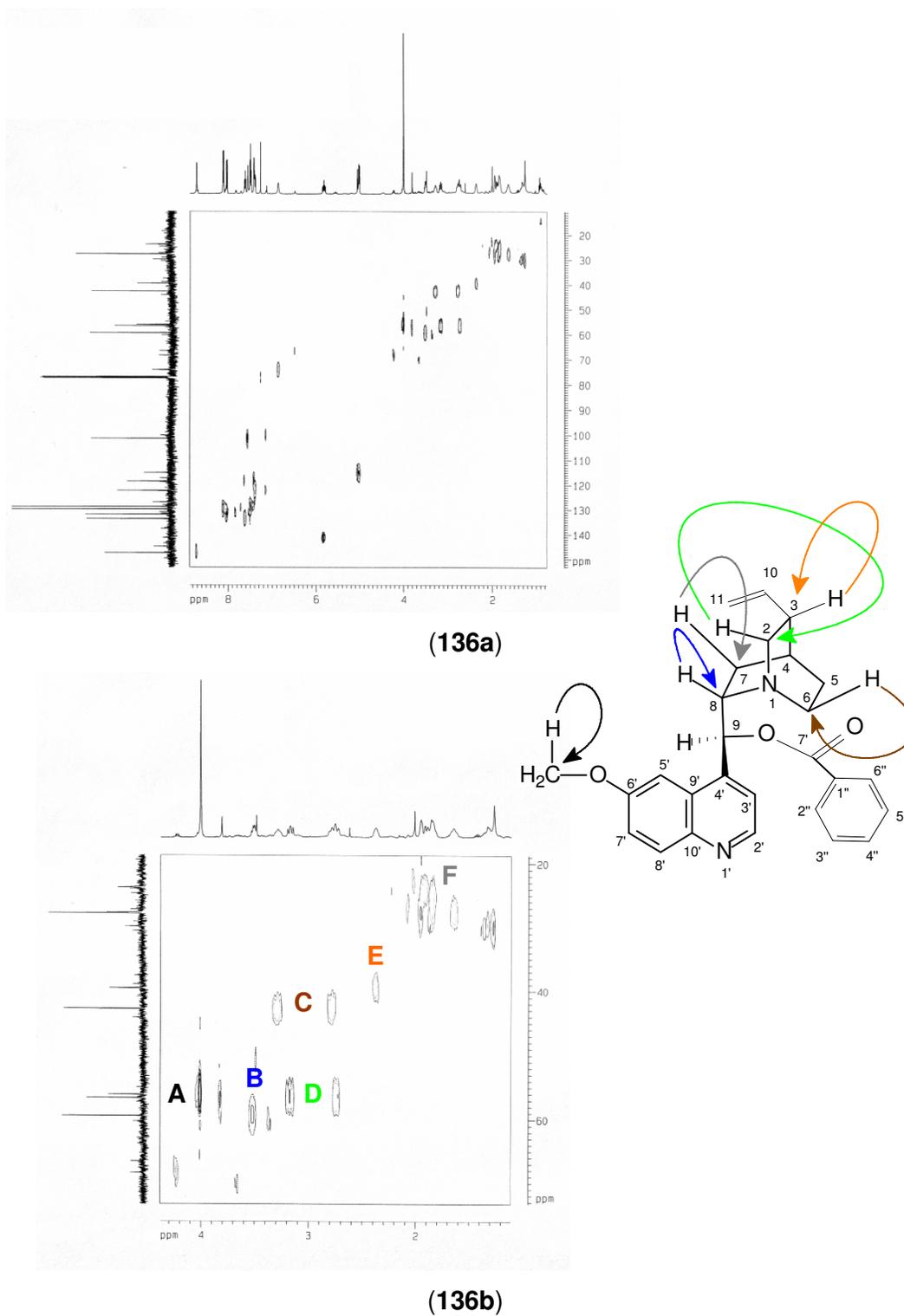


Figura 136. (136a) Espectro total de HSQC (500 MHz, CDCl₃) de 23''; (136b) Expansão de HSQC (500 MHz, CDCl₃) de 23''.

Capítulo 6



CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROSCÓPICOS

6. CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROSCÓPICOS DE COMPOSTOS ORGÂNICOS OBTIDOS A PARTIR DAS ENZIMAS ENCONTRADAS EM CÉLULAS ÍNTEGRAS E IMOBILIZADAS DA ÁGUA-DE-COCO (*Cocos nucifera*)

6.1. PROCEDIMENTOS SINTÉTICOS NA OBTENÇÃO DOS ÁLCOOIS POR NaBH₄

Sobre uma solução de (500 mg, 4,00 mmol) em MeOH seco (16 mL, 0,25 M) a baixa atmosfera de nitrogênio, adicionou-se a 0 °C NaBH₄ (452,4 mg, 12,00 mmol). A mistura reacional foi agitada a temperatura ambiente durante 3 horas, em seguida foi evaporado o solvente a baixa pressão reduzida. O grudo da reação foi dissolvido em água e em seguida particionados com 200 mL de CH₂Cl₂ a fase orgânica foi seca, com sulfato de sódio anidro e evaporado o solvente, a baixa pressão reduzida. O grudo foi então purificado por cromatografia de coluna em sílica gel (20% AcOEt/Hexano).

6.2. DADOS DOS COMPOSTOS OBTIDOS NA REDUÇÃO DE CETONAS E ALDEÍDOS E HIDRÓLISE DE ÉSTERES E AMIDAS

1.S(-)-1-Fenil-etanol (1'): 79% de rendimento, 133 mg

Fórmula empírica: C₈H₁₀O $[\alpha]_{25}^d = -17,00, (1,2) \text{ CHCl}_3$

Peso molecular: 122 g/mol

R_f (20% AcOEt/Hexano): 0,7

RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ 7,32 (m, 5H, H-2-6), 4,77 (q, 1H, H-7, *J* = 6,5 Hz), 1,39 (d, 3H, H-8, *J* = 6,5 Hz), 2,18 (s, 1H, OH).

EM (IE⁺, m/z): 122 (25%), 107 (80%), 79 (100%), 51 (43,8%).

Separação analítica usando as seguintes técnicas:

Coluna Chiralsil Dex-CB: 2°C/min (100-180°C) e 2°C/min (130-160°C).

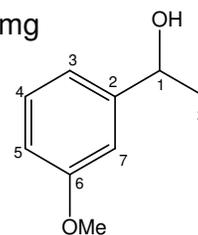
Tempo de retenção do isômero *R*: 4,625 min; Tempo de retenção do isômero *S*: 4,753 min; Tempo de retenção do álcool: 22,01 min; Tempo de retenção da cetona: 22,69 min.

2. S(-)-1-*m*-metoxifeniletanol (2'): 95% de rendimento, 120 mg

Fórmula empírica: C₉H₁₂O₂ $[\alpha]_{25}^d = -23,5, (1,2) \text{ CHCl}_3$

Peso molecular: 152,19 g/mol

R_f (20% AcOEt/Hexano): 0,4



RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ 7,25 (t, 1H, H-7), δ 6,92 (m, 2H, H-3, 5), δ 6,79 (q, 1H, H-4), 4,78 (q, 1H, H-7, *J* = 6,5 Hz), 1,44 (d, 3H, H-8, *J* = 6,5 Hz), 1,99 (s, 1H, OH).

EM (IE⁺, m/z): 152 (30%), 137 (35%), 109 (100%), 77 (32%), 43 (30%).

Separação analítica usando as seguintes técnicas:

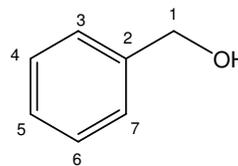
Coluna Chiralsil Dex-CB: 2°C/min (100-180°C) e 2°C/min (130-160°C).

Tempo de retenção do isômero *R*: 23,58 min; Tempo de retenção do isômero *S*: 23,89 min; Tempo de retenção do álcool: 9,76 min; Tempo de retenção da cetona: 9,97 min.

3. Álcool benzílico (3'): 88% de rendimento, 171 mg**Fórmula empírica:** C₇H₈O**Peso molecular:** 108,14 g/mol**R_f (20% AcOEt/Hexano):** 0,5**RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz):** δ 7,35(m, 1H, H-3/H-7), 4,66 (s, 2H, H-1), 2,06 (s, 1H, OH).**EM (IE⁺, m/z):** 107 (80%), 91 (30%), 79 (100%), 51 (60%).**Separação analítica usando as seguintes técnicas:**

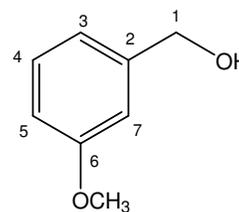
Coluna DB-1: 4 °C/min de 50 a 180°C e 20°C/min de 180 a 280°C

Tempo de retenção do álcool: 11,14 min; Tempo de retenção do aldeído: 8,59 min.

**4. Álcool *m*-metoxibenzílico (4'):** 80% de rendimento, 101 mg**Fórmula empírica:** C₈H₁₀O₂**Peso molecular:** 138,17 g/mol**R_f (20% AcOEt/Hexano):** 0,5**RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz):** δ 7,31(t, 1H, H-4, *J*= 13,7 Hz), 6,99 (m, 2H, H-3,5), 6,88 (sl, 1H, H-7), 4,67 (s, 2H, H-1), 3,81 (s, 3H, OMe).**EM (IE⁺, m/z):** 138 (100%), 121 (20%), 109 (80%), 94 (37%), 77 (60%).**Separação analítica usando as seguintes técnicas:**

Coluna DB-14 °C/min de 50 a 180°C e 20°C/min de 180 a 280°C.

Tempo de retenção do álcool: 12,03 min; Tempo de retenção do aldeído: 14,64 min.



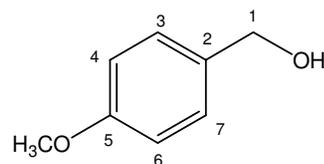
5. Álcool *p*-metoxibenzílico (5'): 42% de rendimento,

99 mg

Fórmula empírica: C₈H₁₀O₂**Peso molecular:** 138,17 g/mol**R_f (20% AcOEt/Hexano):** 0,5**RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz):** δ 7,23(d, 2H, H-4,6 *J*= 13,7 Hz), 6,84 (d, 2H, H-3,7, *J*= 13,7 Hz), 4,56 (s, 2H, H-1), 3,73 (s, 3H, OMe), 6,13 (s, 1H, OH).**EM (IE⁺, m/z):** 138 (100%), 121 (59%), 109 (87%), 94 (37%), 77 (65%).**Separação analítica usando as seguintes técnicas:**

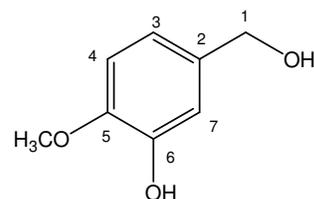
Coluna DB-1: 4 °C/min de 50 a 180°C e 20°C/min de 180 a 280°C.

Tempo de retenção do álcool: 11,96 min; Tempo de retenção do aldeído: 13,01 min

**6. Álcool vanílico (6'a):** 80% de rendimento, 87 mg**Fórmula empírica:** C₈H₁₀O₃**Peso molecular:** 154,17 g/mol**R_f (20% AcOEt/Hexano):** 0,4**RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz):** δ 6,87 (s, 1H, H-7), 6,78 (d, 2H, H-3,4), 4,52 (s, 2H, H-1), 3,83 (s, 3H, OMe).**EM (IE⁺, m/z):** 154 (92%), 137 (55%), 93 (84%), 65 (100%), 55 (45%), 39 (100%).**Separação analítica usando as seguintes técnicas:**

Coluna DB-14 °C/min de 50 a 180°C e 20°C/min de 180 a 280°C.

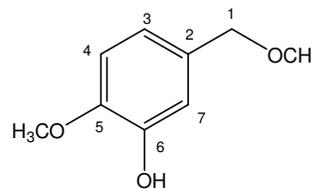
Tempo de retenção do álcool: 27,93 min; Tempo de retenção do aldeído: 25,53 min.



7. Éter vanílico (6'b): 20% de rendimento, 41 mg**Fórmula empírica:** C₉H₁₂O₃**Peso molecular:** 168,19 g/mol**R_f (20% AcOEt/Hexano):** 0,5**RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz):** δ 6,76 (s, 1H, H-7), 6,66 (d, 2H, H-3,4), 4,41 (s, 2H, H-1), 3,70 (s, 3H, OMe) e 3,26 (s, 3H, OMe).**EM (IE⁺, m/z):** 168 (35%), 137 (100%), 122 (54%), 32 (55,8%).**Separação analítica usando as seguintes técnicas:**

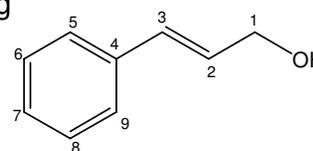
Coluna DB-1: 4 °C/min de 50 a 180°C e 20°C/min de 180 a 280°C.

Tempo de retenção do éter: 13,68 min; Tempo de retenção do aldeído: 25,53 min.

**8. Álcool cinâmico (7'a):** 83% de rendimento, 107 mg**Fórmula empírica:** C₉H₁₀O**Peso molecular:** 134,18 g/mol**R_f (20% AcOEt/Hexano):** 0,6**RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz):** δ 7,41-7,23 (m, 5H, H-5,6,7,8,9), 6,65 (d, 1H, H-3, J = 15,9 Hz), 6,39 (m, 1H, H-2), 4,33 (d, 2H, J = 7,25 Hz), 2,08 (s, 1H, OH).**EM (IE⁺, m/z):** 134 (45%), 115 (47%), 105 (52%), 92 (100%), 78 (43%), 51 (52%).**Separação analítica usando as seguintes técnicas:**

Coluna DB-1: 4 °C/min de 50 a 180°C e 20°C/min de 180 a 280°C.

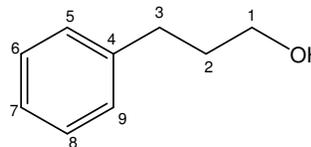
Tempo de retenção do álcool: 12,36 min; Tempo de retenção do aldeído: 12,98 min



9. 3-Fenilpropanol (7'b): 17% de rendimento, 21 mg**Fórmula empírica:** C₉H₁₂O**Peso molecular:** 136,19 g/mol**R_f (20% AcOEt/Hexano):** 0,6**RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz):** δ 7,41-7,36 (m, 5H, H-5,6,7,8,9), 3,67 (d, 2H, H-1), 2,71 (t, 2H, H-3), 1,90 (m, 2H, H-2).**EM (IE⁺, m/z):** 136 (20%), 117 (100%), 92 (93%), 51 (29%).**Separação analítica usando as seguintes técnicas:**

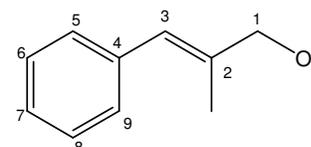
Coluna DB-1: 4 °C/min de 50 a 180°C e 20°C/min de 180 a 280°C.

Tempo de retenção do álcool: 11,22 min; Tempo de retenção do aldeído: 12,98 min

**10. Álcool α-metilcinâmico (8'):** 27% de rendimento, 64 mg**Fórmula empírica:** C₁₀H₁₂O**Peso molecular:** 148,20 g/mol**R_f (10% AcOEt/Hexano):** 0,5**RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz):** δ 7,59-7,25 (m, 1H, H-5,6,7,8,9), 6,58 (s, 1H, H-3), 4,24 (s, 2H, H-1), 1,95 (s, 3H).**EM (IE⁺, m/z):** 148 (40%), 133 (25%), 91 (100%), 55 (26%).**Separação analítica usando as seguintes técnicas:**

Coluna DB-1: 4 °C/min de 50 a 180°C e 20°C/min de 180 a 280°C.

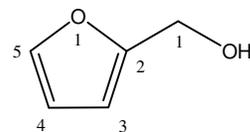
Tempo de retenção do álcool: 7,42 min; Tempo de retenção do aldeído: 9,09 min



11. Álcool furfurílico (9'): 93% de rendimento, 95 mg**Fórmula empírica:** C₅H₆O**Peso molecular:** 98,10 g/mol**R_f (10% AcOEt/Hexano):** 0,5**RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz):** δ 7,38 (s, 1H, H-5), 6,32-6,26 (m, 2H, H-4,3), 4,53 (s, 2H, H-1), 3,41 (s, 1H, OH).**EM (IE⁺, m/z):** 98 (100%), 81 (42%), 69 (35%), 41 (91%).**Separação analítica usando as seguintes técnicas:**

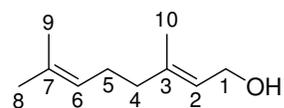
Coluna DB-1: 4 °C/min de 50 a 180°C e 20°C/min de 180 a 280°C.

Tempo de retenção do álcool: 6,06 min; Tempo de retenção do aldeído: 10,22 min

**12. Geraniol (10')**: 61% de rendimento, 142 mg**Fórmula empírica:** C₁₀H₁₈O**Peso molecular:** 154,25 g/mol**R_f (10% AcOEt/Hexano):** 0,5**RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz):** δ 5,33 (t, 1H, H-2), 5,04 (t, 1H, H-6), 4,05 (d, 2H, H-1), 2,35-1,96 (m, 4H, H-5,4), 1,62-1,60-1,54 (s, 9H, H-8,9,10).**EM (IE⁺, m/z):** 154 (2%), 69 (97%), 41 (100%).**Separação analítica usando as seguintes técnicas:**

Coluna DB-1: 4 °C/min de 50 a 180°C e 20°C/min de 180 a 280°C.

Tempo de retenção do álcool: 21,56 min; Tempo de retenção do aldeído: 23,91 min.



13. S-(+)-2-Butanol (11'): 96% de rendimento, 134 mg

Fórmula empírica: C₄H₁₀O $[\alpha]_{25}^d = +13, (1,0) \text{ CHCl}_3$

Peso molecular: 74,12 g/mol

R_f (10% AcOEt/Hexano): 0,6

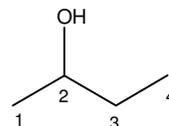
RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ 3,53 (m, 1H, H-2), 3,46 (s, 1H, OH), 1,34-1,28 (m, 2H, H-3), 1,00 (d, 3H, H-1), 0,75 (t, 2H, H-4).

EM (IE⁺, m/z): 74 (3%), 59 (20%), 45 (92%).

Separação analítica usando as seguintes técnicas:

Coluna DB-1: 4 °C/min de 50 a 180°C e 20°C/min de 180 a 280°C.

Tempo de retenção do álcool: 4,22 min; Tempo de retenção da cetona: 4,93 min.



14. S-(+)-2-Acetoxibutano (11' acil): 97% de rendimento, 38 mg

Fórmula empírica: C₆H₁₂O₂ $[\alpha]_{25}^d = +20, (1,0) \text{ CHCl}_3$

Peso molecular: 116,16 g/mol

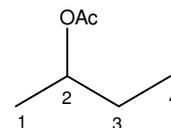
R_f (10% AcOEt/Hexano): 0,8

EM (IE⁺, m/z): 116 (2%), 87 (22%), 56 (20%), 43 (100%).

Separação analítica usando as seguintes técnicas:

Coluna Chirasil Dex-CB: 2°C/min (100-180°C) e 2°C/min (130-160°C).

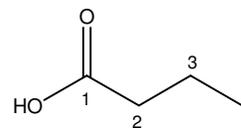
Tempo de retenção do isômero *R*: 6,796 min; Tempo de retenção do isômero *S*: 6,956 min



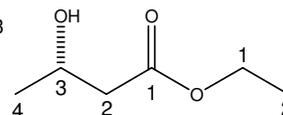
15. Ácido butírico (12'): 66% de rendimento, 80 mg**Fórmula empírica:** C₄H₈O₂**Peso molecular:** 88,11 g/mol**R_f (10% AcOEt/Hexano):** 0,3**RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz):** δ 10,70 (s, OH), 2,30 (t, 2H, H-2), 1,64 (q, 2H, H-3), 0,94 (t, 3H, H-4).**EM (IE⁺, m/z):** 88 (9%), 73 (10%), 60 (100%), 43 (52%).**Separação analítica usando as seguintes técnicas:**

Coluna DB-1: 4 °C/min de 50 a 180°C e 20°C/min de 180 a 280°C.

Tempo de retenção do ácido carboxílico: 4,54 min; Tempo de retenção do éster: 4,42 min.

**16. 3-S-(+)-hidroxibutirato de etila (13'):** 78% de rendimento, 61 mg**Fórmula empírica:** C₆H₁₂O₃ [α]₂₅^d=+2,46, (1,2) CHCl₃**Peso molecular:** 132,16 g/mol**R_f (10% AcOEt/Hexano):** 0,6**RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz):** δ 4,01-3,93 (m, 3H, H-3,1), 3,72 (s, OH), 2,26 (m, 2H, H-2), 1,07-1,01 (m, 6H, H-4,2).**EM (IE⁺, m/z):** 131 (1%), 117 (7%), 87 (29%), 71 (28%), 69 (32%), 45 (100%).**Separação analítica usando as seguintes técnicas:**

Coluna Chiralsil Dex-CB: 2°C/min (100-180°C) e 2°C/min (130-160°C).

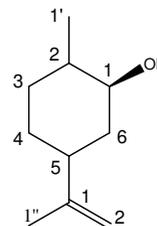
Tempo de retenção do isômero *R*: 5,22 min; Tempo de retenção do isômero *S*: 5,27 min

17. Carveol (14'): 12% de rendimento,

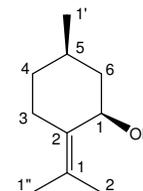
59 mg

Fórmula empírica: C₁₀H₁₈O $[\alpha]_{25}^d = -104, (1,5) \text{ CHCl}_3$ **Peso molecular:** 154,25 g/mol**R_f (10% AcOEt/Hexano):** 0,5**RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz):** δ 4,65 (d, 2H, H-2), 3,12, (m, 1H, H-1), 2,72 (s, 1H, OH), 2,11 (m, 1H, H-5), 1,90-1,92-1,48 (m, 6H, H-6,4,3), 1,75 (m, 1H, H-2), 1,69 (s, 1H, H-1''), 0,99 (d, 3H, H-1').**EM (IE⁺, m/z):** 154 (8%), 67 (100%), 41 (80%).**Separação analítica usando as seguintes técnicas:**

Coluna Chiralsil Dex-CB: 2°C/min (100-180°C) e 2°C/min (130-160°C).

Tempo de retenção do isômero *R*: 5,60 min; Tempo de retenção do isômero *S*: 5,952 min**18. Pulegol (15'):** 47% de rendimento 117 mg**Fórmula empírica:** C₁₀H₁₈O $[\alpha]_{25}^d = +102, (1,5) \text{ CHCl}_3$ **Peso molecular:** 154,25 g/mol**R_f (10% AcOEt/Hexano):** 0,3**RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz):** δ 4,00 (s, 1H, OH), 3,65, (m, 1H, H-1), 2,60-2,55 (m, 2H, H-3), 2,13-1,78 (m, 4H, H-6,4), 1,74 (m, 1H, H-5), 1,65 (s, 3H, H-2,1''), 0,91 (d, 3H, H-1').**EM (IE⁺, m/z):** 154 (7%), 153 (100%), 97 (36%), 43 (100%).**Separação analítica usando as seguintes técnicas:**

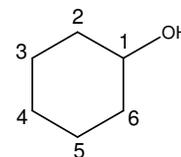
Coluna Chiralsil Dex-CB: 2°C/min (100-180°C) e 2°C/min (130-160°C).

Tempo de retenção do isômero *R*: 5,610 min; Tempo de retenção do isômero *S*: 5,802 min

19. Ciclohexanol (16'a): 64% de rendimento, 58 mg**Fórmula empírica:** C₆H₁₂O**Peso molecular:** 100,16 g/mol**R_f (10% AcOEt/Hexano):** 0,5**RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz):** δ 3,56 (m, 1H, H-1), 2,30, (s, 1H, OH), 1,84-1,72 (m 4H, H-6,2), 1,51-1,20 (m, 6H, H-5,4,3).**EM (IE⁺, m/z):** 100 (2%), 82 (45%), 57 (100%).**Separação analítica usando as seguintes técnicas:**

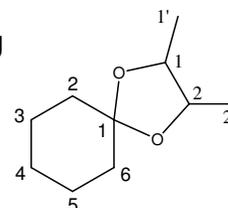
Coluna DB-1: 4 °C/min de 50 a 180°C e 20°C/min de 180 a 280°C.

Tempo de retenção do álcool: 5,60 min; Tempo de retenção da cetona: 6,97 min.

**20. 2,3-Butilenocetal (16'b):** 36% de rendimento, 32,4 mg**Fórmula empírica:** C₁₀H₁₈O₂**Peso molecular:** 170,25 g/mol**R_f (10% AcOEt/Hexano):** 0,5**RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz):** δ 4,78 (m, 2H, H-2,1), 1,36 (m, 4H, H-6,2), 1,17 (m, 6H, H-5,4,3), 1,05 (d, 6H, H-2',1').**EM (IE⁺, m/z):** 170 (7%), 127 (60%), 55 (100%).**Separação analítica usando as seguintes técnicas:**

Coluna DB-1: 4 °C/min de 50 a 180°C e 20°C/min de 180 a 280°C.

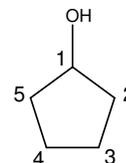
Tempo de retenção do cetal: 9,45 min; Tempo de retenção da cetona: 6,97 min.



21. Ciclopentanol (17'): 35% de rendimento, 103 mg**Fórmula empírica:** C₅H₁₀O**Peso molecular:** 86,13 g/mol**R_f (10% AcOEt/Hexano):** 0,6**RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz):** δ 4,25 (m, 1H, H-1), 2,70, (s, 1H, OH), 1,75 (m, 4H, H-5,2), 1,43 (m, 4H, H-4,3).**EM (IE⁺, m/z):** 86 (8%), 57 (100%), 44 (45%).**Separação analítica usando as seguintes técnicas:**

Coluna DB-1: 4 °C/min de 50 a 180°C e 20°C/min de 180 a 280°C.

Tempo de retenção do álcool: 5,08 min; Tempo de retenção da cetona: 4,94 min.

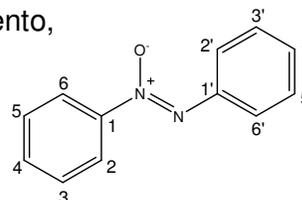
**22. Diazeno difenil-1-óxido (18'): 100% de rendimento,**

127 mg

Fórmula empírica: C₁₂H₁₀N₂O**Peso molecular:** 198,22 g/mol**R_f (10% AcOEt/Hexano):** 0,4**RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz):** δ 8.32 (m, 2H, H-6,2), 8.18 (m, 2H, H-6',2'), 7.58 (m, 1H, H-4), 7.53 (m, 2H, H-5,3), 7.50 (m, 2H, H-5',3'), 7.41 (m, 1H, H-4').**EM (IE⁺, m/z):** 198 (15%), 77 (100%), 51 (63%).**Separação analítica usando as seguintes técnicas:**

Coluna DB-1: 4 °C/min de 50 a 180°C e 20°C/min de 180 a 280°C.

Tempo de retenção do diazeno: 31,03 min; Tempo de retenção do nitrobenzeno: 33,57 min.



23. Anilina (19'): 22% de rendimento, 100 mg

Fórmula empírica: C₆H₇N

Peso molecular: 93,13 g/mol

R_f (10% AcOEt/Hexano): 0,4

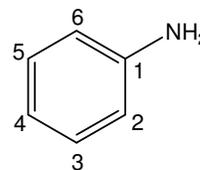
RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ 7,41 (t, 1H, H-4), 7,04, (t, 2H, H-5,3), 6,82 (t, 2H, H-6,2), 3,74 (s, 2H, NH₂).

EM (IE⁺, m/z): 93 (100%), 66 (62%), 39 (25%).

Separação analítica usando as seguintes técnicas:

Coluna DB-1: 4 °C/min de 50 a 180°C e 20°C/min de 180 a 280°C.

Tempo de retenção da anilina: 10,55 min; Tempo de retenção da acetanilida: 15,57 min.



24. p-Hidroxianilina (20'): 99% de rendimento, 81 mg

Fórmula empírica: C₆H₇NO

Peso molecular: 109,13 g/mol

R_f (10% AcOEt/Hexano): 0,5

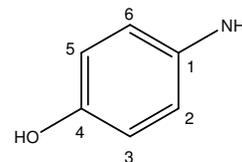
RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ 8,48 (s, 1H, OH), 7,11, (d, 2H, H-5,3), 6,55 (d, 2H, H-6,2), 5,40 (s, 2H, NH₂).

EM (IE⁺, m/z): 109 (100%), 80 (36%), 43 (42%).

Separação analítica usando as seguintes técnicas:

Coluna DB-1: 4 °C/min de 50 a 180°C e 20°C/min de 180 a 280°C.

Tempo de retenção da p-hidroxianilina: 37,35 min; Tempo de retenção da p-hidroxiacetanilida: 39,42 min.



25. *p*-Nitroanilina (21'a): 60% de rendimento, 79 mg

Fórmula empírica: C₆H₆N₂O₂

Peso molecular: 138,13 g/mol

R_f (10% AcOEt/Hexano): 0,6

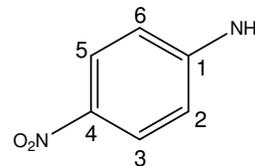
RMN¹H ((CD₃)₂CO, 500 MHz): δ 7,98 (d, 2H, H-5,3), 6,73, (d, 2H, H-6,2), 6,22 (s 2H, NH₂).

EM (IE⁺, m/z): 138 (41%), 108 (22%), 83 (33%), 44 (85%).

Separação analítica usando as seguintes técnicas:

Coluna DB-1: 4 °C/min de 50 a 180°C e 20°C/min de 180 a 280°C.

Tempo de retenção da *p*-nitroanilina: 30,25 min; Tempo de retenção da *p*-hidroxiacetanilida: 33,12 min.



26. *p*-Aminoacetanilida (21'b): 40% de rendimento, 43 mg

Fórmula empírica: C₈H₁₀N₂O

Peso molecular: 150,18 g/mol

R_f (10% AcOEt/Hexano): 0,6

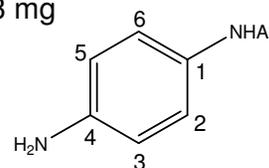
RMN¹H (CD₃OD, 500 MHz): δ 8,38 (s, 1H, NH), 7,22, (d, 2H, H-6,2), 6,68 (d, 2H, H-5,3), 2,10 (s, 3H, OCH₃).

EM (IE⁺, m/z): 150 (12%), 138 (39%), 65 (45%), 44 (90%).

Separação analítica usando as seguintes técnicas:

Coluna DB-1: 4 °C/min de 50 a 180°C e 20°C/min de 180 a 280°C.

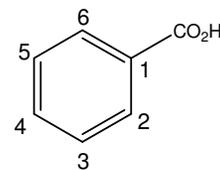
Tempo de retenção da *p*-aminoacetanilida: 30,60 min; Tempo de retenção da *p*-nitroacetanilida: 33,12 min.



27. Ácido benzóico (22'): 93% de rendimento, 430 mg**Fórmula empírica:** C₇H₆O₂**Peso molecular:** 122,12 g/mol**R_f (10% AcOEt/Hexano):** 0,5**RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz):** δ 12,81 (s, 1H, OH), 8,17, (m, 2H, H-6,2), 7,64 (m, 1H, H-4), 7,49 (m, 2H, H-5,3).**EM (IE⁺, m/z):** 122 (80%), 105 (100%), 77 (82%), 51 (43%).**Separação analítica usando as seguintes técnicas:**

Coluna DB-1: 4 °C/min de 50 a 180°C e 20°C/min de 180 a 280°C.

Tempo de retenção do ácido benzóico: 10,52 min; Tempo de retenção da benzamida: 9,35 min.

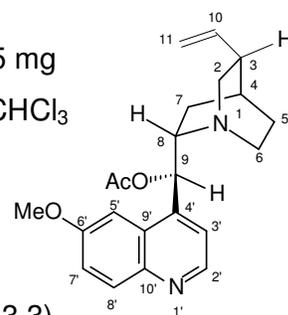
**28. Quinina acetilada (23' acil):** 56% de rendimento, 95 mg**Fórmula empírica:** C₂₂H₂₆N₂O₃ [α]₂₅^d = -233, (2,2) CHCl₃**Peso molecular:** 366,46 g/mol**R_f (10% AcOEt/Hexano):** 0,6**RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz):** δ 2,45 (m, 1H, H-3),

1,92 (m, 1H, H-4), 3,33 (m, 1H, H-8), 6,74 (d, 1H, H-9, J=3,3),

5,64 (m, 1H, H-10), 8,68 (d, 1H, H-2', J=4,5), 7,28 (d, 1H, H-3', J=4,5), 7,43 (d,

1H, H-5', J=2,5), 7,36 (dd, 1H, H-7', J₁=9,2, J₂=2,5), 8,01 (d, 1H, H-8', J=9,2),3,23-2,78 (dd, 2H, H-2, J₁=4,8, J₂=2,5), 1,85-1,67 (m, 2H, H-5), 3,33-2,97 (m,2H, H-6), 1,82-1,65 (m, 2H, H-7), 4,98-4,95 (d, 2H, H-11, J₁=17,1, d, J₂=10,4),3,98 (s, 3H, OCH₃), 2,17 (s, 3H, AcO-9).**Separação analítica usando as técnicas de CLAE:**

Coluna: OOG-4252-EO LUNA C-18 250 X 4,60mm e 5μ de diâmetro. Fluxo:1 mL/min; Fase móvel: MeOH: Acetonitrila (9:1) com λ= 254 nm.



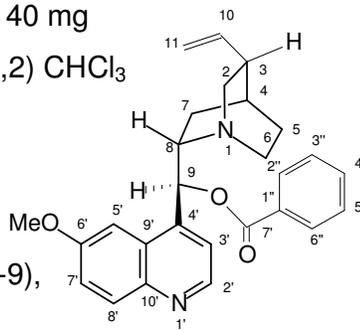
29. Quinina benzilada (23''): 35% de rendimento, 40 mg**Fórmula empírica:** C₂₇H₂₈N₂O₃ [α]^d₂₅ = -262; (2,2) CHCl₃**Peso molecular:** 428,53 g/mol**R_f (10% AcOEt/Hexano):** 0,7**RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz):** δ 2,37 (sl, 1H, H-3),

1,95 (m, 1H, H-4), 3,51 (m, 1H, H-8), 6,87 (sl, 1H, H-9),

5,81 (dd, 1H, H-10), 8,71 (d, 1H, H-2', J=4,5),

7,42 (d, 1H, H-3', J=4,5), 7,56 (d, 1H, H-5', J=2,1), 7,39 (dd, 1H, H-7', J₁=9,2,J₂=2,1), 8,03 (d, 1H, H-8', J=9,2), 8,11 (d, 1H, H-6'',2'', J=7,8), 7,50 (t, 1H, H-5'',3'', J=7,8), 7,63 (t, 1H, H-4'', J=7,8), 3,17-1,72 (dd, 2H, H-2, J₁13,5, J₂=10,5),

1,84- 1,64 (m, 2H, H-5), 3,28-2,78 (m, 2H, H-6), 1,87-1,85 (m, 2H, H-7), 5,04-

5,02 (d, 2H, H-11), 4,00 (s, 3H, OCH₃).**Separação analítica usando as técnicas de CLAE:**

Coluna: OOG-4252-EO LUNA C-18 250 X 4,60mm e 5μ de diâmetro. Fluxo:1 mL/min; Fase móvel: MeOH: Acetonitrila (9:1) com λ= 254 nm.

Capítulo 7



CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Em relação ao processo de hidrodestilação e extração com solvente orgânico da água-de-coco dos dois tipos de *C. nucifera*, foram identificados álcoois, cetonas, lactonas, aldeídos e ésteres de curtas cadeias de carbono no óleo essencial da água-de-coco das duas variedades analisadas, e provavelmente estes compostos sejam responsáveis, em parte, pelo seu aroma. O éster etanoato de *n*-propila foi detectado em ambas os processos de extração (extração com solvente e arraste a vapor), e provavelmente é um dos compostos responsáveis pelo o sabor da água-de-coco. Os processos de extração com solvente orgânico apresentam diferentes composições químicas.

O efeito do seqüestro de radicais livres usando DPPH das amostras obtidas por hidrodestilação e extração com solvente da água-de-coco das duas variedades foi comparado ao controle positivo Trolox e BHT no sistema do radical livre DPPH. Alta atividade de seqüestro de radical (DPPH) foi encontrada nas amostras obtidas por processo de hidrodestilação, mas atividade moderada foi observada nas amostras por extração com solvente orgânico. As diferenças observadas nos dois processos são significativos e podem ser justificados pelas diferenças de composição química. A atividade antioxidante destas frações é de bastante interesse como um elemento aditivo de antioxidante em potenciais alimentos e requerem uma avaliação adicional.

No estudo dos constituintes fixos do albúmen fresco do coco do tipo verde e amarelo em três fases de maturação, foram detectados hidrocarbonetos, tioésteres e ácidos carboxílicos no óleo fixo das duas variações do albúmen sólido de coco nas três fases de maturidade analisadas e são provavelmente responsáveis, em parte, pela viscosidade e odor deste óleo. Houve um aumento da concentração do ácido palmítico presente para cada fase de maturidade na variação do coco amarelo, por outro lado, uma diminuição presente de sua concentração para cada fase de maturidade para o tipo verde, e provavelmente um composto muito comum tanto ao tipo verde como amarelo. Foi observado em relação a maturidade que tanto para as

espécies verdes como o amarelo, a quantia de óleo fixo aumentou, isto significa que, a composição ficou mais rica em ácidos graxos. Além disso, também foi observado que quando é verde a maioria dos seus componentes são formados através de hidrocarboneto ramificados que provavelmente podem ser oxidados aos ácidos carboxílicos seguintes quando se tornam maduros ou secos. O componente principal do óleo fixo para esta espécie foi o ácido láurico com (30,21%) para maduro e (40,49%) para a forma seca. Assim de acordo com os resultados obtidos podemos concluir que a composição química dos dois tipos de coco (verde/amarelo) diferem com os estágios de maturação e ainda tem uma pequena diferença observada entre a composição do tipo verde e o coco tipo amarelo.

O suco (albúmen líquido) das espécies de coco *C. nucifera* se mostrou muito efetivo em seletividade por reduzir uma gama de grupos carbonílicos aromáticos e alifáticos exibindo uma substancial regio- e enantioseletividade em seus produtos.

Após essas células íntegras passarem por processo de imobilização com alginato de sódio, foi possível verificar também sua versatilidade em reações de acetilação e benzilação com compostos mais complexos como foi o caso da quinina que produziu a quinina acetilada e a benzilada através suas células imobilizadas. Os resultados encorajadores obtidos aqui usando tanto a preparação aquosa crua de uma fruta comum como o coco, como a imobilizada com alginato de sódio oferecem novas possibilidades para a redução de compostos carbonílicos selecionadas como um passo crítico em um caminho orgânico sintético, especificamente evitando o uso de hidretos não-sustentáveis como agentes redutores. Como resultado deste estudo prévios com legumes comuns, é aparente uma oportunidade por desenvolver uma área nova de química orgânica sintética. Utilizando o potencial vasto de fontes naturais abundantes e sustentáveis, trabalhos em biocatálise, por sua seletividade, simplicidade, emprego de tecnologia de processo benigna, e extremista-baixo preço, podem se tornar uma aproximação alternativa significativa para amplas transformações de substância química sintéticas.

Capítulo 8



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/trap mass spectrometry.** Illinois: Allured Publishing Corporation, 2001.

AGNANIET, H.; BIKANGA, R.; BESSIERE, J. M.; MENUT, C. Aromatic plants of tropical central Africa. Part XLVI. Essential oil constituents of *Cassia alata* (L.) from Gabon. **Journal of Essential Oil Research**, 17(4), 410-412, 2005.

AHEM, T. J.; KLIBANO, A. M. The mechanism of irreversible enzyme inactivation at 100°C. **Science**, v. 228, p. 1280-1284, 1985.

ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A. Kovats Indices Simulation in Essencial Oil Analysis, **Química Nova**, v. 13 (4), p. 282, 1990.

ANDERSON, B. A.; HANSEN, M. M.; HARKNESS, A. R.; HENRY, C. L.; VICENZI, J. T.; ZMIJEWSKI, M. J. Application of a Practical Biocatalytic Reduction to an Enantioselective Synthesis of the 5H-2,3-Benzodiazepine LY300164, **Journal of the American Chemical Society**, v. 117(49), p. 12358-12359, 1995.

ANURAG, P.; RAJAMOHAN, T. Beneficial effects of tender coconut water against isoproterenol induced toxicity on heart mitochondrial activities in rats. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, New Delhi, v. 40, n.4, p. 278-280, 2003.

ARAGÃO, W. M.; ISBERNER, I. V.; CRUZ, E. M. O. Água-de-coco. Aracaju: **Embrapa CPATC/Tabuleiros Costeiros**, (Série Documentos 24), 2001.

ARAGÃO, W. M.; CRUZ, E. M. O.; RIBEIRO, F. E.; TUPINAMBÁ, E. A.; TAVARES, M.; PIMENTEL, S. A.; TAKEMOTO, E. Teor de Gordura e Composição de Ácidos Graxos em Polpa de Frutos de Coqueiro Anão em Diferentes Idades de Maturação, **II Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel Realização**: Universidade Federal de Lavras e Prefeitura Municipal de Varginha, p. 615-618, 2005.

AROUCHA, E. M. M.; DE MAGALHÃES, J. A. S.; AROUCHA, M. C. M.; VIANA, A. P.; VIANNI, R. (in memorian), Composição Lipídica do Albúmen do Coco Anão Verde e Anão Vermelho em Diferentes Estádios de Maturação, **Caatinga**, Mossoró, v. 18, n. 3, p. 143-147, jul./set., 2005.

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

BACKER, C. A.; BRINK, R. C. B. Jr. "Flora of Java," Vol. II, the Ruks-herbarium, Leyden, **The Netherlands**, p. 297, 1965.

BANDEIRA, P. N.; FONSECA, A. M.; COSTA, S. M. O.; LINS, M. U. D. S.; PESSOA, O. D. L.; MONTE, F. J. Q.; NOGUEIRA, N. A. P.; LEMOS, T. L. G. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of resin of *Protium heptaphyllum*. **Natural Product Communications**, v. 1, p. 117-120, 2006.

BORSE, B. B.; RAO, L. J. M.; RAMALAKSHMI, K.; RAGHAVAN, B. Chemical composition of volatiles from coconut sap (neera) and effect of processing. **Food Chemistry**, v. 101, p. 877–880, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO REGIONAL. **FRUTISÉRIES 3**. Coco-Verde. Minas Gerais. Brasília, MI-SIH-IICA, 2000.

BURITS, M.; BUCAR, F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 323-328, 2000.

CAMPBELL-FALCK, D.; THOMAS, T.; FALCK, T. M.; TUTUO, N.; CLEM, K. The intravenous use of coconut water., **The American Journal of Emergency Medicine**, v. 18(1), p. 108-111, 2000.

CANTELLO, B. C. C.; EGGLESTON, D. S.; HAIGH, D.; HALTIWANGER, R. C.; HEATH, C. M.; HINDLEY, R. M.; JENNINGS, K. R.; SIME, J. T.; WORONIECKI, S. R. Facile biocatalytic reduction of the carbon-carbon double bond of 5-benzylidenethiazolidine-2,4-diones. Synthesis of (\pm)-5-(4-{2-[methyl(2-pyridyl)amino]ethoxy}benzyl)thiazolidine-2,4-dione (BRL 49653), its (R)-(+)-enantiomer and analogues, **Journal of Chemical Society, Perkin Transformation 1: Org. Bio-Org. Chem.**, p. 3319-3324, 1994.

CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; UCHOA, D. C.; SILVA, L. D. M. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. **Theriogenology**, Stoneham, v. 59, n. 3-4, p.743-751, 2003.

CHUMBIMUNI-TORRES, K. Y.; KUBOTA, L. T. Simultaneous determination of calcium and potassium in coconut water by a flow-injection method with tubular potentiometric sensors, **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 225-230. 2006.

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

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações Sintéticas de Lípases Imobilizadas em Polímeros, **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DAUGSCH, A.; PASTORE, G. Obtenção de Vanilina: Oportunidade Biotecnológica, **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 642-645, 2005.

DUARTE, A. C. P.; COELHO, M. A. Z. Identification of peroxidase and tyrosinase in green coconut water, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 3, 5, p. 266, 2002.

EJEDEGBA, B. O.; ONYENEKE, E. C.; OVIASOGIE, P. O. Characteristics of lipase isolated from coconut (*Cocos nucifera* linn) seed under different nutrient treatments, **African Journal of Biotechnology**, v. 6(6), p. 723-727, 2007.

FARR, S. 2001 A soft drink odyssey. **Food Manufacture**, v. 69(3), p. 29-50, 1994.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**, Springer- Verlag, New York Inc., 1997.

FENNEMA, O. R. **Química dos Alimentos**. Zaragoza: Acribia S.A., p. 1095, 1993.

FONSECA, A. M.; SOUZA, J. S. N.; MONTE, F. J. Q.; OLIVEIRA, M. C. F.; MATTOS, M. C.; LEMOS, T. L. G. SBOE, **IV Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais**, 2007.

FONSECA, A. M.; BIZERRA, A. M. C.; SOUZA, J. S. N.; MONTE, F. J. Q.; OLIVEIRA, M. C. F.; MATTOS, M. C.; CORDELL, G. A.; BRAZ-FILHO, R.; LEMOS, T. L. G., Constituents and Antioxidant Activity of Two Varieties of Coconut Water (*Cocos nucifera* L.), **Revista Brasileira de Farmacognosia**, FG 656, 2009.

FONSECA, A. M.; DE MATTOS, M. C.; MONTE, F. J. Q.; LEMOS, T. L. G., Uso da água-de-coco, *Cocos nucifera* L. em reações de biotransformações, **Sociedade Brasileira de Química- 29ª Reunião Anual**, PN 136, 2006.

FONSECA, A. M.; DE MATTOS, M. C.; MONTE, F. J. Q.; CORDELL, G. A.; BRAZ-FILHO, R.; LEMOS, T. L. G., Água-de-coco como agente biocatalisador em reações orgânicas, **Sociedade Brasileira de Química- 30ª Reunião Anual**, PN 121, 2007.

GANONG, W. F. Reproduction and the Renin-Angiotensin System, **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 19, n. 2, p. 241-250, 1995.

GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Modified Distillation trap. **Chemist Analyst**, v. 49, p 114, 1960.

HARGRAVE, K. M.; AZAIN, M. J.; MINER, J. L. Dietary coconut oil increases conjugated linoleic acid-induced body fat loss in mice independent of essential fatty acid deficiency, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1737 (1), p. 52-60, 2005.

HARTREE, E. F. Determination of proteins: a modification of the Lowry method that give a linear photometric response, **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422, 1972.

HEGAZI, A. G.; EL HADY, F. K. A. Egyptian Propolis: 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands., **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57c, p. 395-402, 2002.

HSIEH, W. C.; CHANG, C. P.; GAO, Y.L. Controlled release properties of Chitosan encapsulated volatile Citronella Oil microcapsules by thermal treatments, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 53, p. 209–214, 2006.

JACOB, R. A.; URRI, B. J. Oxidative damage and defense. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, p. 9855-9905, 1996.

JESUS, P. C.; SILVA, P. L. F.; JUAREZ, J. J.; NASCIMENTO, M. G. Enantioselective esterification of 2-methylpentanoic acid catalysed via immobilized lipases in chrysotile and microemulsion-based gels. **Synthetic Communications**, v. 28, n. 15., p. 2893-2901, 1998.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; NGASSOUM M. B. Solid-phase-microextraction-headspace aroma compounds of coconut (*Cocos nucifera*) milk and meat from cameroon. **Ernährung/Nutrition**, v. 27(7/8), p. 300-303, 2003

KALOGERIS, E.; SANAKIS, Y.; MAMMA, D.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; STAMATIS, H. Properties of catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* immobilized in calcium alginate hydrogels. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 1113-1121, 2006.

KILINC, A.; ONAL S.; TELEFONÇU A. Chemical attachment of porcine pancreatic lipase to crosslinked poly(vinyl alcohol) by means of adipoyldichloride. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 641-647, 2002.

KINSELLA, J. E.; FRANKEL, E.; GERMAN, B.; KANNER, J. Possible mechanism for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. **Foods Technology**, v. 47, p. 85-89, 1993.

KOTZIAS-BANDEIRA, E.; WABERSKI, D.; WEITZE, K. F.; BARRETO, M. B. P. Pré-diluição e congelamento de sêmen suíno em água de coco in natura, após três diferentes pré-tratamentos de incubação. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 149-152, 1999.

LAURELES, L. R., RODRIGUEZ, F. M., REAÑO, C. E., SANTOS, G. A., LAURENA, A.C.; MENDOZA, E. M. T. Variability in Fatty Acid and Triacylglycerol Composition of the Oil of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Hybrids and Their Parentals, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50 (6), p. 1581-1586, 2005.

LEBER, A. S.; FARIA, J. A. F. Coco verde: características e cuidados pós-colheita. **Revista Frutas & Legumes**, n. 18, p. 36-38, mar./abr., 2003.

LEE, H. W.; JI, S. K.; LEE, I. Y. C.; LEE, J. H. Convenient and Practical Synthesis of (R)-(+)-4-Methyl-2-cyclohexen-1-one, **Journal of Organic Chemistry**, v. 61, p. 2542–2543, 1996.

LEONG, L. P., & SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets., **Food Chemistry**, v. 76, p. 69–75, 2002.

LETIZIA, C. S.; COCCHIARA, J.; WELLINGTON, G. A.; FUNK, C.; API, A. M. *p*-Methoxybenzyl acetate., **Food and Chemical Toxicology**, v. 38(3), p. S7-S9, 2000.

LOKI, A. L.; RAJAMOHAN, T. Hepatoprotective and antioxidant effect of tender coconut water on carbon tetrachloride induced liver injury in rats., **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 40(5), p. 354-357, 2003.

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

LÓPES-VILLALOBOS, A.; DODDS, P. F.; HORNUNG, R. Changes in fatty acid composition during development of tissues of coconut (*Cocos nucifera* L.) embryos in the intact nut and in vitro, **Journal of Experimental Botany**, v. 52(358), p. 933-942, 2001.

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

MCDONALD, P.; EDWARDS, R. A.; GREENHALGH, J. F. D.; MORGAN, C. A. **Animal Nutrition Fifth Edition**. Longman, United Kingdom, 1995.

MACHADO, L. L. **Estudo Fitoquímico e Atividade Biológicas dos Frutos de *Passiflora edulis* e Redução Seletiva de Aldeídos e Cetonas Aromáticas Utilizando a Casca da *Passiflora* como Biocatalisador**, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará-Brasil, 2004.

MACHADO, L. L., **Processos Biocatalíticos Usando Células Íntegras e Imobilizadas de *Manihot esculenta* e *Manihot dulcis***, Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará-Brasil, 2008.

MACHADO, L. L., SOUZA, J. S. N., DE MATTOS, M. C., SAKATA, S. K., CORDELL, G. A., LEMOS, T. L. G. Bioreduction of aldehydes and ketones using *Manihot* species, **Phytochemistry**, v. 67(15), p. 1637-1643, 2006.

MACHADO, L. L.; LEMOS, T. L. G.; MATTOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; Gonzalo, de Gonzalo; Gotor-Fernandes, V.; Gotor, Vicente. Immobilized *Manihot esculenta* preparation as a novel biocatalyst in the enantioselective acetylation of racemic alcohols, **Tetrahedron Asymmetry**, v. 19, p. 1418-1423, 2008.

MAGAT, S. S.; AGUSTIN, Y. T. V. The Philippine coconut industry. **International Cashew & Coconut Conference**, Tanzania, Proceedings. Tanzânia, 1997. p. 21-27, 1997.

MANTENA, S. K.; JAGADISH; BADDURI S. R.; SIRIPURAPU, K. B.; UNNIKRISHNAN M. K. In vitro evaluation of antioxidant properties of *Cocos nucifera* Linn. water. **Nahrung**, v. 47(2), p. 126-131, 2003.

MANUAL DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA MALÁRIA / MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Secretaria de Vigilância em Saúde**. – Brasília : Ministério da Saúde, p. 112 – (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 2005.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**, 2. ed. Fortaleza, Edições UFC, v.1. p. 141, 1997.

MATSUYAMA, A.; YAMAMOTO, H.; KAWADA, N.; KOBAYASHI, Y. Industrial production of (*R*)-1,3-butanediol by new biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 513–521, 2001.

MEPBA, H. D.; ACHINEWHU, S. C. Effects of processing on protein nutritive quality of coconut *Cocos nucifera* products. **Plant Food for Human Nutrition**, v. 58(1), p. 15-25, 2003.

MORELAND, C. G.; PHILIP, A.; CARROLL, F. I., Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of cinchona alkaloids, **Journal of Organic Chemistry**, v. 39, p. 2413-2416, 1974.

MURRAY, R. K.; **HARPER: Bioquímica**, ATHENEUS. SP, cap.7, 6 ed.,1990.

NARAIN, N.; GALVÃO, M. S.; MADRUGA, M. S. Volatile compounds captured through purge and trap technique in caja-umbu (*Spondias* sp.) fruits during maturation. **Food Chemistry**, v. 102, p. 726–731, 2007.

NASCIMENTO, M. G.; ZANOTTO, S. P.; MELEGARI, S.P. Estudos de proteção da célula de *Saccharomyces Cerevisiae* para utilização em reações de redução em meio Orgânico. **Química Nova**, .v. 25, n. 4, p. 567-571, 2002a.

NASCIMENTO, M. G.; QUEIROZ, N. *Pseudomonas* sp. Lipase immobilized in polymers versus the use of free enzyme in the resolution of (R,S)-methyl mandelate, **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 5225-5227, 2002b.

NASSAR, N. M. A. Genetic variation of wild *Manihot* species native to Brazil and its potential for cassava improvement, **Field Crops Research**, v. 13, p. 177-184, 1985.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes. **Current Science**. v. 77, p. 149-161, 1999.

PASSOS, E. E. M. Morfologia do Coqueiro. In: Ferreira, J. M. S.; Warwick, D. R. N.; Siqueira, L. A. (Ed.). **A cultura do coqueiro no Brasil**. 2.ed. Brasília: Embrapa -Serviço de Produção de Informação, p. 57-64, 1998.

PEREIRA, M. E. G. G.; SHIMABUKURO, O. H.; MARIANO, E. T.; ROBIN, A. R. M. M.; Torres, B. P. C. **Biotecnologia**, Editora Manole LTDA, São Paulo, p. 220-236, 1985.

PETROIANU, G. A.; KOSANOVIC. M.; SHEHATTA, I. S.; MAHGOUB, B.; SALEH. A.; MALECK, W. H. Green coconut water for intravenous use: Trace and minor element content. **Journal of Trace Elements in Experimental Medicine**, New York, v. 17, n. 4, p. 273-282, 2004.

POUCHERT, C. **The Aldrich Library of Infrared Spectra**, 1981, third ed., 1850.

POUCHERT, C.; BEHNKE, J. **The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FTNMR Spectra**, first ed., v. 1, 4300, 1993.

PHAM, L. J.; GREGORIO, M. A.; CASA E. P. Biomodification of Selected Tropical Oils for the Production of Specialty Fats and Oils, Tropical Oils, **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 864 (1), p. 468-473, 1998.

PUMMER, S.; HEIL, P.; MALECK, W.; PETROIANU, G. Influence of coconut water on hemostasis. **The American Journal of Emergency Medicine**, v. 19(4), p. 287-289, 2001.

REDDY, K. V.; DAS, M.; DAS, S. K. Filtration resistances in non-thermal sterilization of green coconut water. **Journal of Food Engineering**, v. 69, p. 381–385, 2005.

RESENDE, J. M.; ASSIS, J. S.; REIS, C. S.; ARAGÃO, W. M. Colheita e Manuseio Pós-Colheita. In: Aragão, W. M. (Ed.). *Coco: pós-colheita*. Brasília: Embrapa **Informação Tecnologia**, p.11-18. (Série Frutas do Brasil, n.29), 2002.

REZENDE, M. J. C.; FARIA, R. C. M.; OLIVEIRA, C. H.; PINTO, A. C. Avaliação de Catalisador a Base de Argila na Produção de Biodiesel, **3° Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás**, 2 a 5 de outubro de 2005, em Salvador.

ROBINSON, D. S. Peroxidases and Catalases in Foods. In: ROBINSON, D. S.; ESKIN, N. A. M. *Oxidative Enzymes in Foods*. **Elsevier Applied Science**, p. 1-45, 1991.

SALUNKHE, M. M.; NAIR, R. Mild and efficient enzymatic oximolysis by supported *Pseudomonas cepacia* lipases, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p. 535-538, 2000.

SANTOSO, U.; KUBO, K.; OTA, T.; TADOKORO, T.; MAEKAWA, A. Nutrient composition of kopyor coconuts (*Cocos nucifera* L.). **Food Chemistry**, v. 57(2), p. 299-304, 1996.

SHIBUYA, H.; KITAMURA, C.; MAEHARA, S.; NAGAHATA, M.; WINARNO, H.; SIMANJUNTAK, P.; HYE-SOOK KIM, WATAYA, Y.; OHASHI, K. Transformation of Cinchona Alkaloids into 1-N-Oxide Derivatives by Endophytic *Xylaria* sp. Isolated from *Cinchona pubescens*, **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 51(1), p. 71-74, 2003.

SKREDE, G.; LARSEN, V. B.; AABY, K.; JORGENSEN, A. S.; BIRKELAND, S. E. Antioxidative properties of commercial fruit preparations and stability of bilberry and black currant extracts in milk products. **Journal of Food Science**, v. 69(9), p. 351-356, 2004.

SOARES, C. M.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77, p. 745-757, 1999.

SOUZA, J. S. N. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste do Brasil *Heliotropium indicum* L. e redução de cetonas aromáticas utilizando biocatalisadores**, Dissertação de Mestrado, Edições UFC, Fortaleza, Brasil, 2003.

SREBERNICH, S. M. **Caracterização física e química da água de fruto de coco (*Cocos nucifera*), variedades gigante e híbrido PB-121, visando o desenvolvimento de uma bebida com características próximas às da água-de-coco**, Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

STENHAGEN, E.; ABRAHAMSON, S.; MCLAFFERTY, F. W. **Registry of Mass Spectra Data**. New York: John Wiley & Sons., 1974.

TAVARES, B. B. L. **Fermentação alcoólica de material amiláceo por levedura amilolítica recombinante em reator com células imobilizadas**, Tese de Doutorado, Universidade de Campinas, São Paulo, 1998.

TEPE, B.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; SOKMEN, M.; POLISSOU, M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). **Food Chemistry**, v. 90, p. 333-340, 2005.

UCHOA, D. C.; SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; PEREIRA, B. S.; SILVA, L. D. M. Conservação do sêmen canino a 37°C em diluentes à base de água de coco. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 91-95, 2002.

Van Duersen, R.; Stamfer, W.; Edegger, K.; Faber, K.; Kroutil, W. Chemo- and stereo-selective biocatalytic reduction of α,β -unsaturated ketones employing a chemo-tolerant ADH from *Rhodococcus ruber* DSM 44541, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 31, p. 159-163, 2004.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.; GRAILLE, M. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 133-148, 2000.

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

WOSIACKI, G.; DEMIATE, I. M.; MELLO, F. Nata de Coco: o estado da arte. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimento**, Campinas, v.30, n.2, p.142-155, 1996.

<http://www.pasteur.fr>, Acessada em 07/09/2001.

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

YI, B. H.; KIM, D. H. Antioxidant activity of maltol, kojic acid, levulinic acid, furfural, 5-hydroxymethylfurfural, and pyrazine. **Han'guk Sikp'um Kwahakhoechi**, v. 14(3), p. 265-270, 1982.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de Proteínas Totais Via Espectrofotometria: Vantagens e Desvantagens dos Métodos Existentes, **Química Nova**, v. 21(6), p. 787-793, 1998.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C. **Science**, v. 224, p. 1249-1251, 1984.

ZALE, S. E.; KLIBANOV, A. M. Why does ribonuclease irreversibly inactivate at high temperatures?. **Biochemistry**, v. 25, p. 5432-5444, 1986.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)