



Universidade Estadual de Maringá
Departamento de Farmácia e Farmacologia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**REDUÇÃO DE ENONAS EMPREGANDO CULTURA DE CÉLULAS EM
SUSPENSÃO DE *Cereus peruvianus* Mill (Cactaceae).**

Rogério Aparecido Minini dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Arildo J. Braz de Oliveira
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Regina Ap. C. Gonçalves

MARINGÁ – 2008

**REDUÇÃO DE ENONAS EMPREGANDO CULTURA DE CÉLULAS EM
SUSPENSÃO DE *Cereus peruvianus* Mill (Cactaceae).**

Rogério Aparecido Minini dos Santos

**Dissertação de Mestrado em
Ciências farmacêuticas, orientado
por Dr. Arildo José Braz de Oliveira e
Dr^a. Regina Aparecida Correia
Gonçalves.**

A minha esposa Luciana.

Ao meu filho Lucca,

por toda dedicação, carinho, amizade e amor,

dedico.

AGRADECIMENTOS

A Jesus, por ter demonstrado o significado da palavra AMOR.

Ao meu orientador, Arildo, pela nossa amizade e a oportunidade de conhecê-lo, especialmente pela sua atitude humana perante a vida como profissional.

A Regina pela amizade e por suas orientações durante a realização desta pesquisa.

Ao Lucílio pela ajuda técnica e amizade durante o desenvolvimento deste projeto.

A Elisabeth, pelo convívio e auxílio.

Aos funcionários do Departamento de Farmácia e Farmacologia, principalmente a Helena, ao Admir e Clemansor, pela ajuda e por sua amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, seus professores e funcionários, pela ajuda e ensinamentos.

Enfim, a todos que contribuíram para a realização de mais esta etapa da minha vida.

*Viver é sempre dizer aos outros que elas
são importantes.
Que nós o amamos, porque um dia eles se vão,
e ficamos com a nítida impressão
de que não o amamos o suficiente.*

(Chico Xavier)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1. Reações de óxido-redução entre álcoois e cetonas.	12
2.2. Reações de glicosilação.	15
2.3. Reações de hidroxilação.	19
2.4. Reduções de duplas ligações C-C.....	23
2.5. <i>Cereus peruvianus</i> Mill (Cactaceae).....	26
2.6. Cultura de tecidos do <i>Cereus peruvianus</i>	28
2.7. Isozimas em cultura de tecidos de <i>Cereus peruvianus</i>	28
3. OBJETIVOS	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. Procedimentos gerais	30
4.2. Preparação da <i>trans</i> -benzalacetofenona (22).....	31
4.3. Preparação do (+/-)-1-fenil-etanol (23 e 24).....	32
4.4. Preparação da (+/-)-1,3-difenil-propenol-1 (25 e 26).....	32
4.5. Preparação do (+/-)-etil-3-hidroxi-butanoato (27 e 28).....	33
4.6. Obtenção da cultura de tecidos de <i>C. peruvianus</i>	33
4.7. Procedimento para obtenção de cultura de células em suspensão	34
4.8. Procedimento geral de biotransformação	34
4.7.1. Procedimento 1	34
4.7.2. Procedimento 2	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÃO.....	45
7. REFERÊNCIAS	46
APÊNDICE A	53
APÊNDICE B.....	54
APÊNDICE C	55
APÊNDICE D	56
APÊNDICE E.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Possibilidades metabólicas do 2-metil-3-oxobutanoato de etila, quando submetido a biotransformação utilizando cultura de tecidos vegetais.

Figura 2: Produtos de biotransformação 2-metil-3-oxobutanoato de etila, utilizando cultura de *M. polymorpha* e *G. max*.

Figura 3: Biotransformação da (+)-canforquinone (2a) e (-)-conforquinona (2b) por cultura de células de plantas.

Figura 4: Biotransformação do Δ^2 -careno por cultura de células de *M. geomtrizans* e *N. tabacum*

Figura 5: Biotransformação do 1,8-cineol por cultura de células de *E. perriniana*.

Figura 6: Biotransformação do óxido de cariofileno por cultura de células de *E. perriniana*.

Figura 7: Biotransformação do óxido do *p*-aminobenzóico por cultura de células de *E. perriniana*.

Figura 8: Biotransformação do timol (7), carvocrol (8) e eugenol (9) por cultura de células de *E. perriniana*.

Figura 9: Biotransformação do 3-dimetil-ticolchicina por cultura de células de *C. asiatica*.

Figura 10: Biotransformação do paeonol por cultura de células de *I. paraguariensis*.

Figura 11: Biotransformação do geraniol por cultura de células em suspensão de *C. roseus*, para obtenção do nerol e citronelo

Figura 12: Biotransformação do geraniol por cultura de células em suspensão de *C. roseus*, para obtenção do 10-hidroxisgeraniol, 10-hidroxicitronelol e 10-hidroxisnerol.

Figura 13: Biotransformação da (-)-carvona por cultura de células em suspensão de *C. roseus*.

Figura 14: Biotransformação da (+)-carvona por cultura de células em suspensão de *C. roseus*.

Figura 15: Biotransformação da curdiona por cultura de células em suspensão de *L. japonica*.

Figura 16: Esterioquímica da redução da (*R*)-carvona pela redutase isolada da *Euglena gracilis* Z.

Figura 17: Redução da dupla ligação C-C da conforquinona utilizando a enzima redutase extraída da *Euglena gracilis*

Figura 18: Biotransformação do geraniol por cultura de células em suspensão de *C. roseus*, para obtenção do citronelol.

Figura 19: Biotransformação de meleimidias N-substituídas e N-fenil-2-metilmaleimida por cultura de células em suspensão de *N. tabacum* *C. roseus*.

Figura 20: Biotransformação da 2-butenolida por cultura de células em suspensão de *G. max*.

Figura 21: *Cereus peruvianus* localizado no campus da Universidade Estadual de Maringá-Pr

Figura 22: Obtenção da *trans*-benzalacetofenona pela reação da acetofenona com o benzaldeído.

Figura 23: Redução da acetofenona para obtenção do (+/-)-1-fenil etanol.

Figura 24: Redução da *trans*-benzalacetofenona para obtenção do (+/-)-1,3-difenil-propenol-1.

Figura 25: Redução do acetoacetato de etila para obtenção do (+/-)-etil-3-hidroxi-butanoato.

Figura 26: placa de Petri contendo cultura de tecido (calos) de *Cereus peruvianus*

Figura 27: Esquema do procedimento 1 de biotransformação.

Figura 28: Esquema do procedimento 2 de biotransformação, inoculação das células de *C. peruvianus*.

Figura 29: Esquema do procedimento 2 de biotransformação, extração do sobrenadante.

Figura 30: Esquema do procedimento 2 de biotransformação, extração das células.

Figura 31: Cultura de células em suspensão de *C. peruvianus* em agitador rotativo em processo de biotransformação dos substratos.

Figura 32: Prováveis produtos de biotransformação do acetoacetato de etila, utilizando o procedimento 1.

Figura 33: Prováveis produtos de biotransformação da *trans*-benzalacetofenona, utilizando o procedimento 1.

Figura 34: Biotransformação do acetofenona utilizando o método 2.

Figura 35: Biotransformação da *trans*-benzalacetofenona utilizando o método 2.

Figura 36: CCD da fração acetato de etila das células do *C. peruvianus*, fase móvel hexano:acetato de etila. Indicador: *p*-anisaldeído.

Figura 37: CCD da fração acetato de etila das células do *C. peruvianus*, fase móvel hexano:acetato de etila. Indicador químico: 2,4-dinitrofenilhidrazina.

Figura 38: Espectro de massas do 1,3-difenil-propanona-1

Figura 39: Espectro de RMN ^1H do composto (29) em 300 MHz, diluído em Cl_3CD

Figura 40: Método sintético de Knowles para síntese catalítica assimétrica da (S)-DOPA.

Figura 41: Processo industrial para obtenção do Aspartame®.

RESUMO

Transformações biológicas de substratos exógenos utilizando células vegetais em suspensão permitem realizar modificações estruturais para fornecer substâncias úteis. Desta forma, a biotransformação tornou-se uma ferramenta importante na síntese de compostos orgânicos, principalmente na obtenção de compostos quirais de interesse farmacológico. A proposta deste trabalho foi definir uma metodologia para biorredução de enonas, incluindo um método extrativo para os produtos obtidos. Para este fim, foram utilizados como substratos a *trans*-benzalacetofenona obtida sinteticamente, a acetofenona e o acetoacetato de etila comerciais, e os padrões racêmicos utilizados para acompanhar as reações biocatalíticas foram sintetizados e caracterizados por métodos espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C . Foram utilizadas duas metodologias, sendo que a primeira consistiu em transferir 7,5 g de cultura de *Cereus peruvianus* para meio MS, sendo que após 5 dias as células foram transferidas para erlenmeyer com 50 mL de solução tampão-fosfato 0,1 M (pH 7,0), sendo adicionado em seguida 30 mg de substrato (*trans*-benzalacetofenona e acetoacetato de etila), que foram mantidas sob agitação por 5 dias. Após este período o sobrenadante foi submetido a extração com acetato de etila. A segunda metodologia consistiu em transferir 7,5 g de células de calos de *Cereus peruvianus* para erlenmeyer com 50 mL de solução tampão-fosfato 0,1 M (pH 7,0), sendo adicionado em seguida 30 mg de substrato (*trans*-benzalacetofenona e acetofenona), que foram mantidos em agitação por 5 dias. Após este período realizou-se extração do sobrenadante com acetato de etila e butanol, as células foram sonicadas e submetidas a extração com metanol. O produto obtido foi submetido a análise por CCD e posterior determinação estrutural por RMN de ^1H e ^{13}C e CG-EM. Observou-se que as células vegetais apresentam a capacidade de reduzir a saturação da *trans*-benzalacetofenona, obtendo-se a 1,3-difenil-propanona-1, e não promoveu redução da carbonila da acetofenona e do acetoacetato de etila. O rendimento da reação foi de 20%.

Palavras-chave: Biotransformação, *Cereus peruvianus*, Cultura de células em suspensão

ABSTRACT

Changes of biological exogenous substrates using plant cells in suspension allow achieve structural changes to provide useful substances. Thus, the biotransformation has become an important tool in the synthesis of organic compounds, mainly in obtaining chiral compounds of pharmaceutical interest. The purpose of this study was to define a methodology for biorreduction of enones, including a method for the extractive products. Were used as substrates for *trans*-benzalacetophenone obtained synthetically, acetophenone and ethyl acetoacetate commercial, and racemics the standards used to monitor the reactions biocatalíticas have been synthesized and characterized by the NMR spectroscopic methods of ^1H and ^{13}C . It used two methodologies, that the first was to transfer 7.5 g of culture, *Cereus peruvianus* for MS medium, and that, after 5 days the cells were transferred to flask with 50,0 mL of solution 0,1 M phosphate-buffer (pH 7,0), and then added 30 mg of substrate(*trans*-benzalacetophenone and ethyl acetoacetate) Which were kept stirring for 5 days. After this period the supernatant was subjected to extraction with ethyl acetate. The second method consisted of transfer of 7,5 g of callus culture of *Cereus peruvianus* to flask with 50 mL of solution 0.1 M phosphate-buffer (pH 7.0), and then added 30 mg of substrate (*trans*-benzalacetophenone and acetophenone), which were kept in agitation for 5 days. After this period took place extraction of supernatant with butanol and ethyl acetate, the cells were sonicated and extraction with methanol. The product obtained was subjected to analysis by TLC and subsequent structural determination by the ^1H and ^{13}C NMR and GC-MS. Observed that the plant cells have the ability to reduce the double bond of *trans*-benzalacetophenone, resulting in the 1,3-diphenyl-one-1, and not promoted carbonyl of reduction acetophenone of the ethyl acetoacetate. The yield of the reaction was 20%.

Keywords: Biotransformation, *Cereus peruvianus*, Cell Culture in suspension.

1. INTRODUÇÃO

O processo de biotransformação ou biocatálise é a denominação dada quando são usadas células vegetais, microrganismos ou enzimas como catalisadores para reações químicas (GIRI, et. al., 2001).

As principais características das biotransformações são a regio, quimio e estereosseletividade e a sua capacidade de realizar a reação em meios menos agressivos. Esta metodologia pode ser usada para conversões específicas de substratos complexos usando células de plantas, animais ou enzimas purificadas como catalisadores. Pode ser usada também para biodegradação, na qual substâncias complexas são quebradas em compostos mais simples. A biocatálise apresenta grande potencial na obtenção de compostos novos ou em produzir compostos conhecidos de forma mais eficiente (GIRI, et. al., 2001).

Os substratos que podem ser usados nas biotransformações podem ser variados e não necessariamente serem de origem natural, tendo como exemplo compostos aromáticos, cumarinas, esteróides, alcalóides, terpenóides, lignanas e também compostos sintéticos (PRAS et al., 1995).

Vários fatores são capazes de influenciar no processo de biocatálise em cultura de células vegetais, tais como, solubilidade do substrato, quantidade de enzimas ativas, localização dessas enzimas, ocorrência de reações laterais e presença de enzimas que degradam os produtos alvo (FOWLER e STAFFORD, 1992).

Desde a década passada até o presente momento, a biotransformação apresentou um desenvolvimento significativo, sendo que as reações vem sendo otimizadas, principalmente para síntese de compostos quirais de interesse industrial e biológico (LUNA, 2004; SHARMA et al., 2005).

Um dos meios para realizar a biotransformação é através da cultura de tecidos (calos). Esta cultura é realizada através da retirada de um pedaço de tecido de uma planta, cultivando-a *in vitro*, em um meio de cultura adequado, no qual é adicionado uma combinação de fitoreguladores de crescimento. Estas condições podem estimular algumas ou muitas células a se dividirem através de mitoses sucessivas formando uma massa de células não diferenciadas, chamada de calo (MEINS, 1986).

As condições de cultura podem estimular além da formação de calos, o desenvolvimento de órgãos particulares e até de uma planta completa.

Franssen e Walton (1999) e GIRI et al. (2001) descrevem que estas culturas de células vegetais possuem a capacidade de transformar substratos exógenos que são adicionados ao meio reacional proporcionando uma reação quimio, régio e estereosseletiva, tornando-se imprescindível a seleção do tipo de biocatálise e do substrato.

A capacidade da cultura de células vegetal em transformar substratos exógenos, se deve a sua atividade bioquímica preservada. O tipo da reação e sua estereoquímica na biotransformação depende do grupo funcional presente no substrato administrado, e da estrutura vicinal deste grupo funcional. Desta forma, a biocatálise por cultura de células de planta pode ser considerada uma ferramenta importante para modificação estrutural de moléculas para produzir compostos com propriedades úteis (SUGA e HIRATA, 1990).

Segundo Suga e Hirata (1990) a biotransformação utilizando cultura de células pode ser usada para promover inúmeras reações químicas, tais como, hidroxilação, óxido-redução entre álcoois e cetonas, redução de duplas ligações entre carbonos, conjugação de glicose, hidrólise, entre outras. Além disso, pode ser considerado um método de conversão mais econômico e ambientalmente aceitável.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Reações de óxido-redução entre álcoois e cetonas.

Uma grande atenção vem sendo dada para as sínteses assimétricas de compostos quirais, para isso são necessários precursores específicos que possibilitem o desenvolvimento de fármacos e compostos agroquímicos mais modernos. Um exemplo destas reações ocorrem com os álcoois quirais que são compostos bem conhecidos e podem ser obtidos a partir de cetonas pró-quirais através de redução assimétrica (YADAV et al., 2002a).

Em muitos trabalhos estão descritos o emprego de pequenos pedaços de tecidos vegetais mantidos em meio líquido como cultura em suspensão, sendo este

utilizado como meio catalítico. Yadav et al.(2002a,b) utilizaram este sistema para investigar a capacidade de raízes de *Daucus carota* em realizar reduções assimétricas de cetonas alifáticas e aromáticas, cetonas cíclicas, β -cetoésteres e azidocetonas. Neste experimento raízes desta espécie foram cortadas em pedaços de 1 cm.

Através de uma metodologia semelhante, Machado et al. (2006), observaram a capacidade de fragmentos de tecido de várias plantas, como as de *Manihot dulcis*, *Manihot esculenta* (mandioca), *Solanum melongena* (berinjela), *Daucus carota* (cenoura), *Colocasia esculenta* e *Ipomoea batatas*, em realizar reduções de cetonas e aldeídos aromáticos em meio aquoso, para a obtenção de álcoois secundários e primários, respectivamente.

Biorreduções utilizando cultura de células vegetal vem sendo bastante utilizadas por muitos pesquisadores. Podemos observar este procedimento no estudo realizado por Nakamura et al. (1995). Estes autores testaram a capacidade de cultura de tecidos de *Nicotiana tabacum*, *Catharanthus roseus*, *Glycine max*, *Marchania polymorpha* e *Pharaenopsis* sp em promover redução diastereo e enantiosseletivas do 2-metil-3-oxobutanoato de etila (**1**) (Figura 1). Devido a estrutura β -ceto éster do composto (**1**) estar na forma racemizada, seria possível obter um dos quatro isômeros do 2-metil-3-hidroxibutanoato (**2**) (Figura 1).

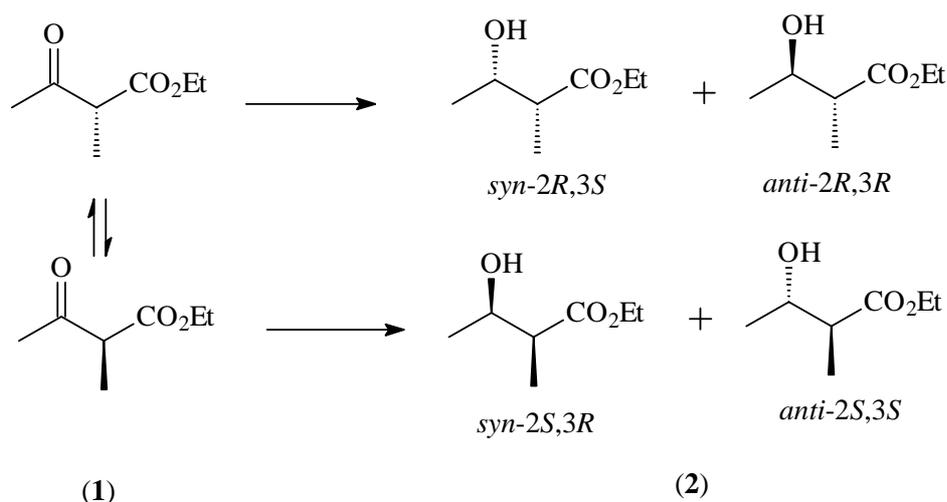


Figura 1: Possibilidades metabólicas do 2-metil-3-oxobutanoato de etila, quando submetido a biotransformação utilizando cultura de tecidos vegetais.

No entanto, no experimento de Nakamura e colaboradores (1995), o que se observou foi uma excelente estereosseletividade (2S, 3S), obtendo um excesso enantiomérico de 99% de 3S quando usado cultura de células de *M. polymorpha*. E quando foi usado cultura de *G. max*, obteve-se um excesso enantiomérico de 97% do isômero *syn* (2R, 3S) (Figura 2).

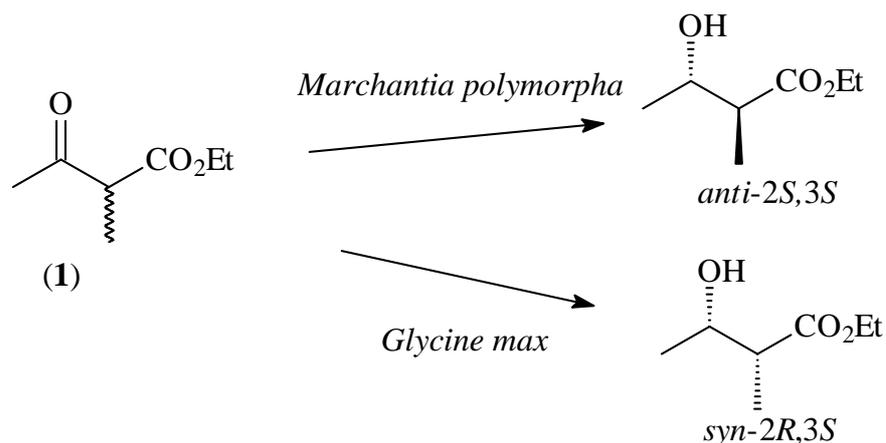


Figura 2: Produtos de biotransformação do 2-metil-3-oxobutanoato de etila, utilizando cultura de *M. polymorpha* e *G. max*.

Chai et al. (2001) também utilizaram os tecidos de *Nicotiana tabacum* e *Catharanthus roseus* para promover reduções químicas utilizando (+)-canforquinona (**2a**) e (-)-canforquinona (**2b**) como substrato, obtendo os compostos indicados na Figura 3. O que se pode observar é a capacidade destas duas culturas em biotransformar a (+)-canforquinona para produzir os compostos (**2a2**), (**2a3**) e (**2a4**), sendo que em ambas as culturas obteve-se um rendimento maior do produto (**2a3**), 66% utilizando a cultura de *C. roseus* e de 57% utilizando a cultura de *N. tabacum*. Quando foi utilizado a (-)-canforquinona como substrato, a cultura de *C. roseus* proporcionou um rendimento de 41% do produto (**2b4**) e a cultura de *N. tabacum* proporcionou um rendimento de 49% do produto (**2b2**), o que demonstra uma maior especificidade para alguns enantiômeros.

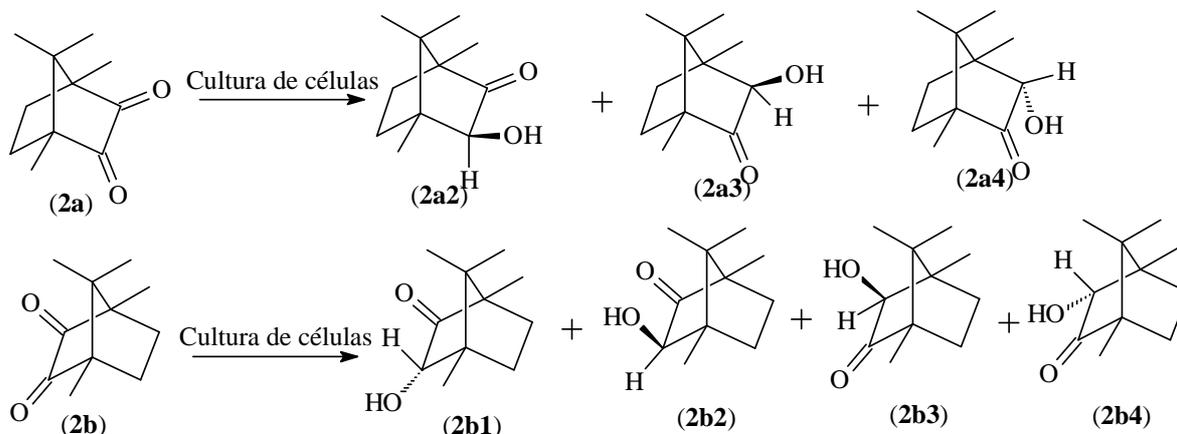


Figura 3: Biotransformação da (+)-canforquinone (2a) e (-)-conforquinone (2b) por cultura de células de plantas.

Culturas de células de *Myrtillocactus geomtrizans* e *N. tabacum* demonstraram capacidade de biotransformação de Δ^2 -careno (3) em duas cetonas diastereoisoméricas (3a) e (3b) e uma mistura de álcoois diastereoisoméricos (3c) (Figura 4), sendo que cultura de *M. geomtrizans* apresentou uma maior especificidade na obtenção do produto (3b), rendimento de 64%, e a cultura de *N. tabacum* um maior rendimento na produção da mistura (3c), com rendimento de 75% (GIL et al., 1995).

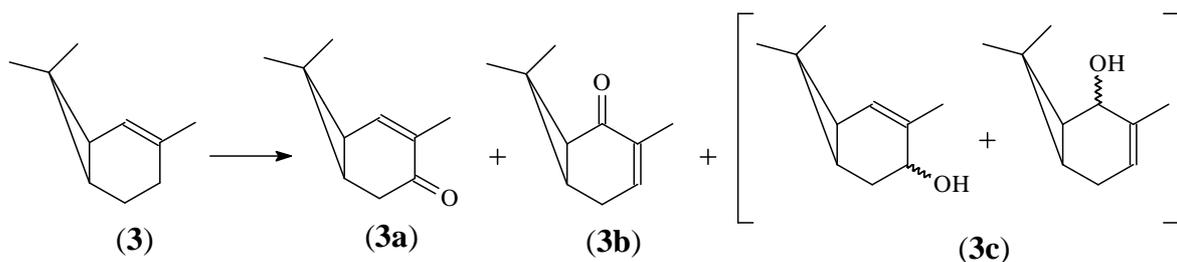


Figura 4: Biotransformação do Δ^2 -careno por cultura de células de *M. geomtrizans* e *N. tabacum*

2.2. Reações de glicosilação.

Grande interesse é dado às reações de glicosilação, pois através deste processo é possível converter os compostos insolúveis em água, em compostos hidrossolúveis. A glicosilação utilizando cultura de células vegetais, tornou-se uma

importante ferramenta, devido a dificuldade em se realizar esta reação utilizando microrganismos ou por síntese química (GIRI et al., 2001; BOUHOUCHE et al., 1998). Além disso, a glicosilação possui um papel importante no processo de armazenamento de metabólitos secundários endógenos, pois os produtos glicosilados são menos reativos a reações químicas (BOUHOUCHE et al., 1998).

Cultura de células de *Eucalyptus perriniana* apresenta capacidade de realizar oxidação seguida de glicosilação de diversos compostos, tais com o 1,8-cineol (**4**) (Figura 5) (ORIHARA e FURUYA, 1993), o óxido de cariofileno (**5**) (Figura 6) (ORIHARA, SAIKI e FURUYA, 1993), o ácido *p*-aminobenzóico (Figura 7) (**6**) (FURUYA et al., 1997a), timol (**7**), carvacrol (**8**) e eugenol (**9**) (Figura 8) (SHIMODA et al., 2006), β -tujaplicina (FURUYA et al., 1997b) e tocoferol (SHIMODA et al., 2007).

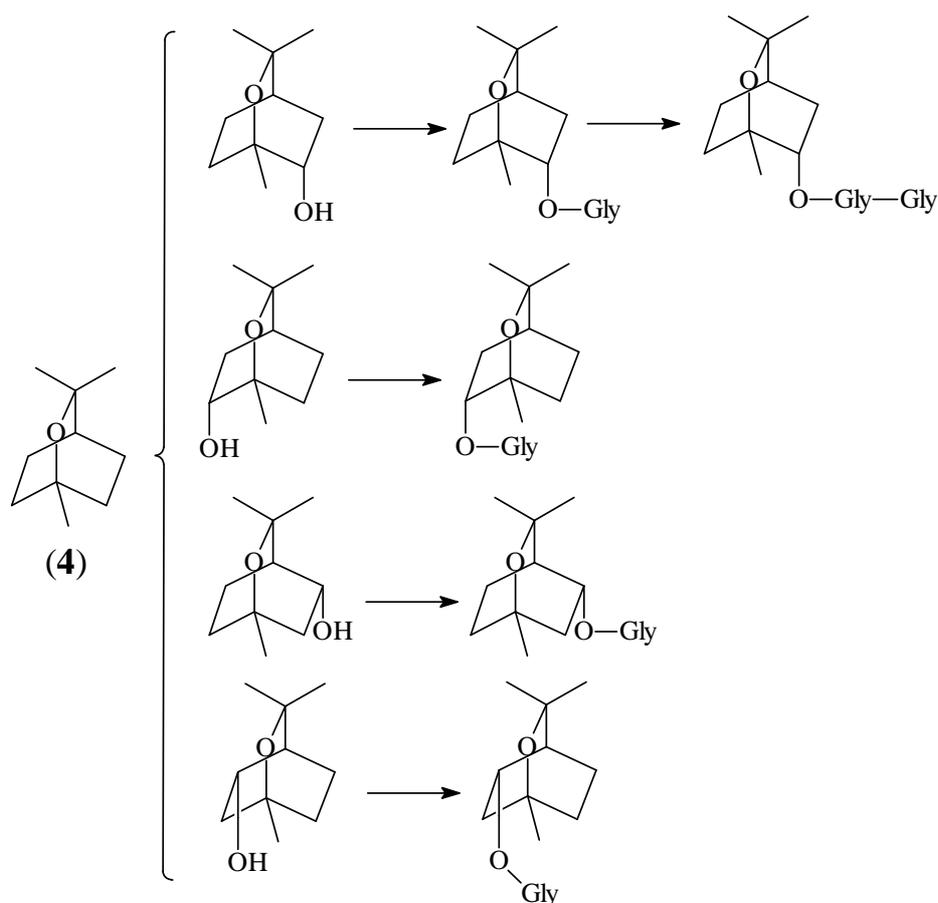


Figura 5: Biotransformação do 1,8-cineol por cultura de células de *E. perriniana*.

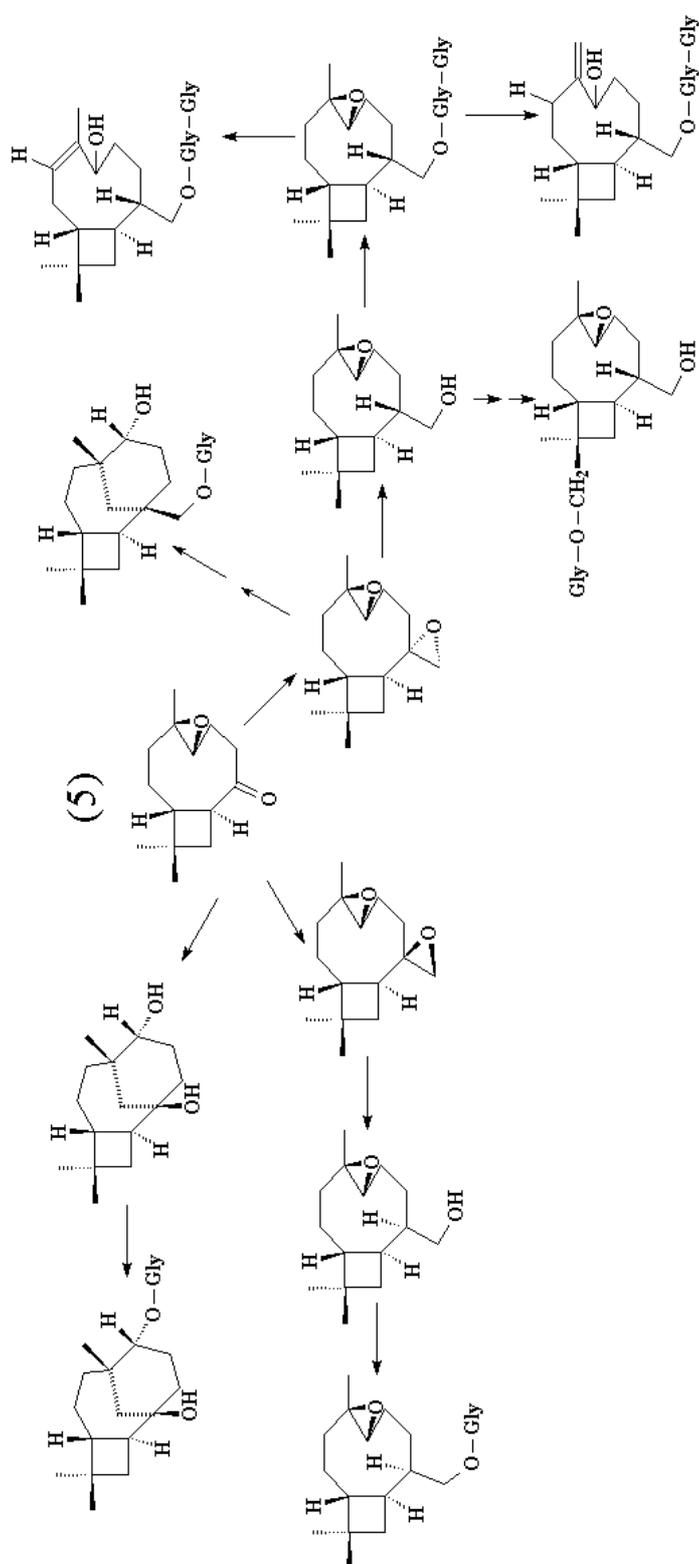


Figura 6: Biotransformação do óxido de cariofileno por cultura de células de *E. perriniana*.

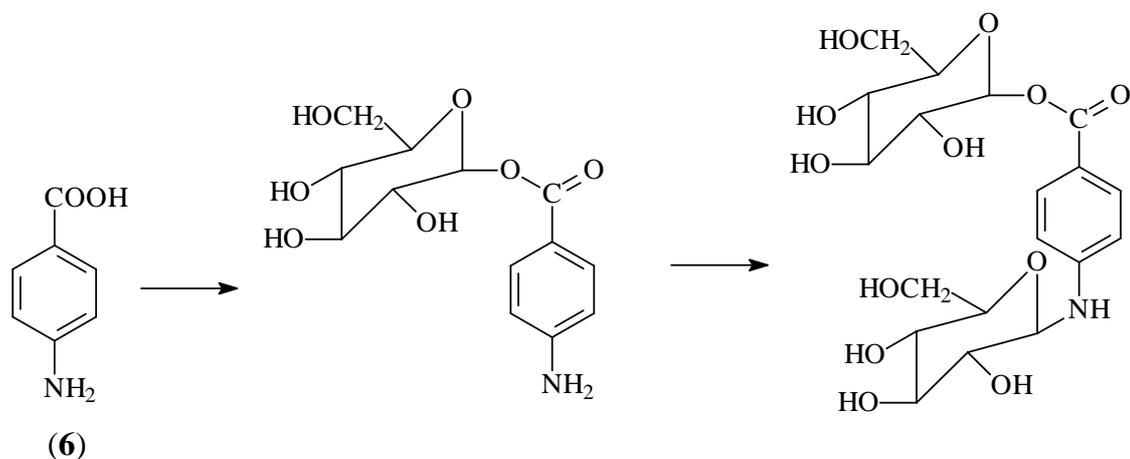


Figura 7: Biotransformação do óxido do *p*-aminobenzóico por cultura de células de *E. perriniana*

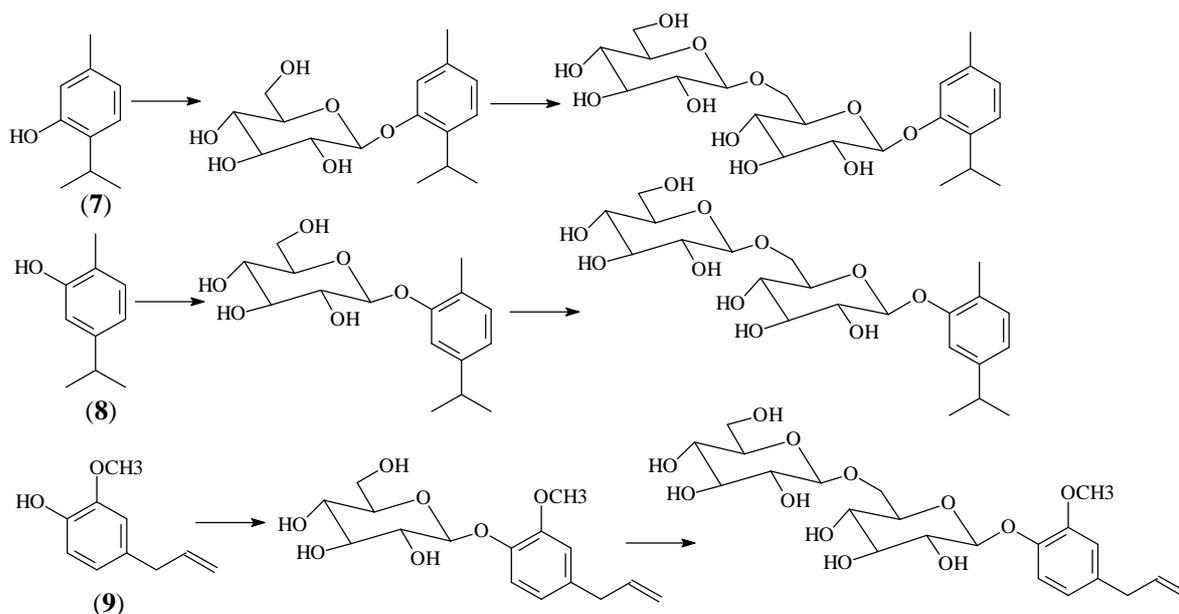


Figura 8: Biotransformação do timol (7), carvacrol (8) e eugenol (9) por cultura de células de *E. perriniana*.

As células de *Centella asiatica* em cultura também apresentam capacidade de glicosilação através da enzima glicosiltransferase, sendo objeto de estudo de Bouhouche et al. (1998), em que promoveu a glicosilação do 3-dimetil-ticolchicina (10) (Figura 9).

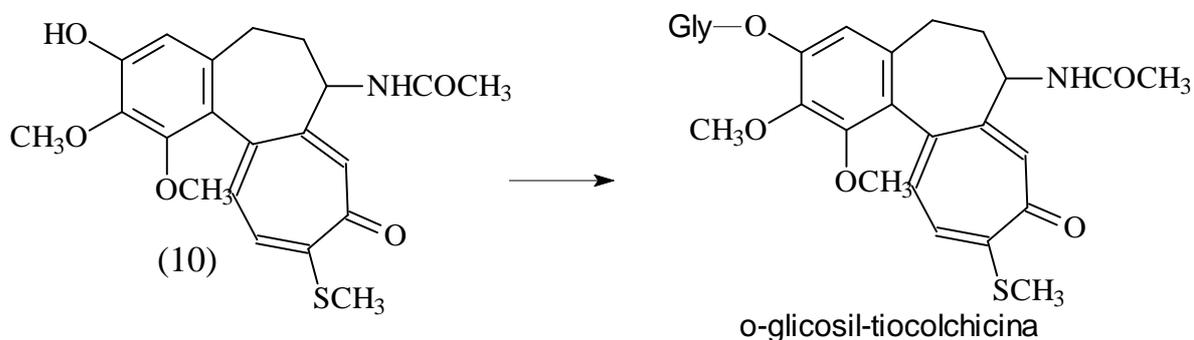


Figura 9: Biotransformação do 3-dimetil-tiocolchicina por cultura de células de *C. asiatica*.

Outra cultura de células que demonstra capacidade de glicosilação é o *Panax ginseng*. Nesta cultura, Li et al. (2005) utilizaram como substrato exógeno o paeonol (11) (Figura 10), sendo este substrato um composto bioativo obtido da *Paeonia suffruticosa* e da *Paeonia lactiflora* (Paeoniaceae).

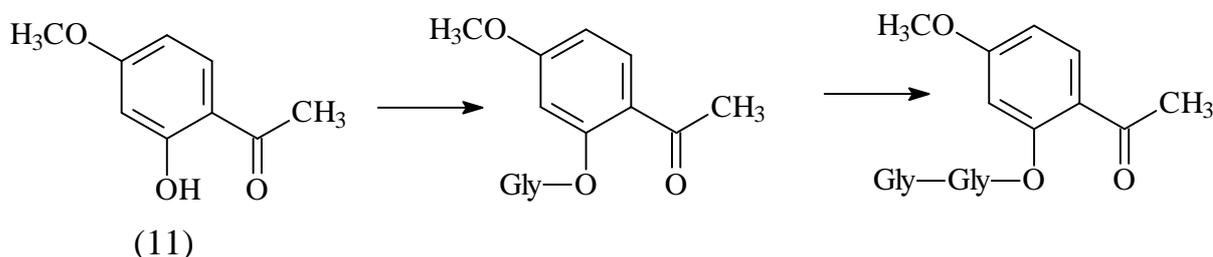


Figura 10: Biotransformação do paeonol por cultura de células de *I. paraguariensis*.

O que pode ser observado nos trabalhos citados acima, exceto no trabalho de Furuya et al. (1997a), as reações de glicosilação utilizando cultura de tecidos vegetais, as unidades de açúcar foram adicionadas sempre em hidroxilas, demonstrando uma especificidade quimiosseletiva da enzima que promove a reação.

2.3. Reações de hidroxilação.

Introdução regio e estereossética de funções oxigenadas em várias posições da molécula é uma das importantes categorias no processo de biotransformação de compostos exógenos através de cultura de células vegetal. Estas reações apresentam um grande potencial para produção de compostos úteis para utilização

na indústria farmacêutica e agropecuário (SUGA e HIRATA, 1990). Acredita-se que a hidroxilação faça parte de uma reação de defesa das células vegetais por uma enzima monoxigenase dependente da citocromo P-450 (COONEY et al., 2000).

O processo de hidroxilação foi investigado por Hamada et al. (1997), que demonstraram a habilidade de cultura de células em suspensão de *Catharanthus roseus* em hidroxilar de forma regioesletiva, monoterpenóides acíclicos (geraniol e nerol) e cíclicos ((+) e (-)-carvona). Todas as biotransformações foram monitoradas em intervalos de tempos menores que 12 horas. Quando foi utilizado o geraniol como substrato, observou-se duas biotransformações nas primeira 48 horas de reação. A primeira foi sua converção em nerol por um processo de isomerização, e a segunda foi a redução da dupla ligação C-C em C2 para obtenção do citronelol (Figura 11). Após um período de 48 horas de biotransformação, ocorreu hidroxilação regioespecífica do geraniol, do nerol e do citronelol, dando origem, respectivamente, ao 10-hidroxicitronelol, ao 10-hidroxicitronelol e ao 10-hidroxicitronelol (Figura 12). Quando utilizaram o nerol como substrato, nas primeiras 48 horas ocorreu a formação do geraniol e do citronelol (Figura 11), sendo que após 48 horas de reação foi possível observar a ocorrência dos produtos da Figura 12.

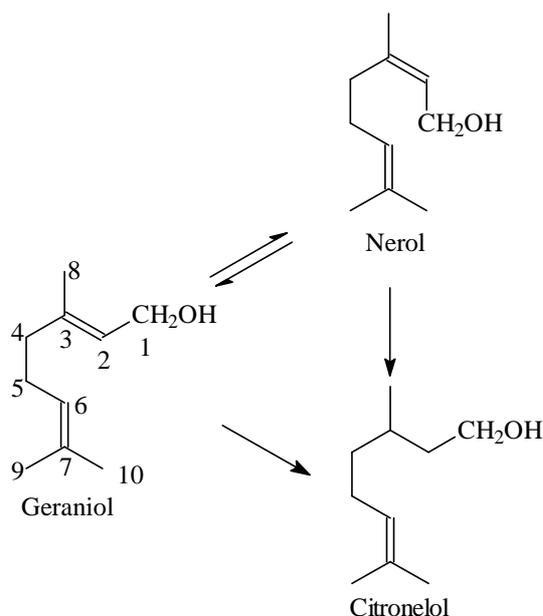


Figura 11: Biotransformação do geraniol por cultura de células em suspensão de *C. roseus*, para obtenção do nerol e citronelo

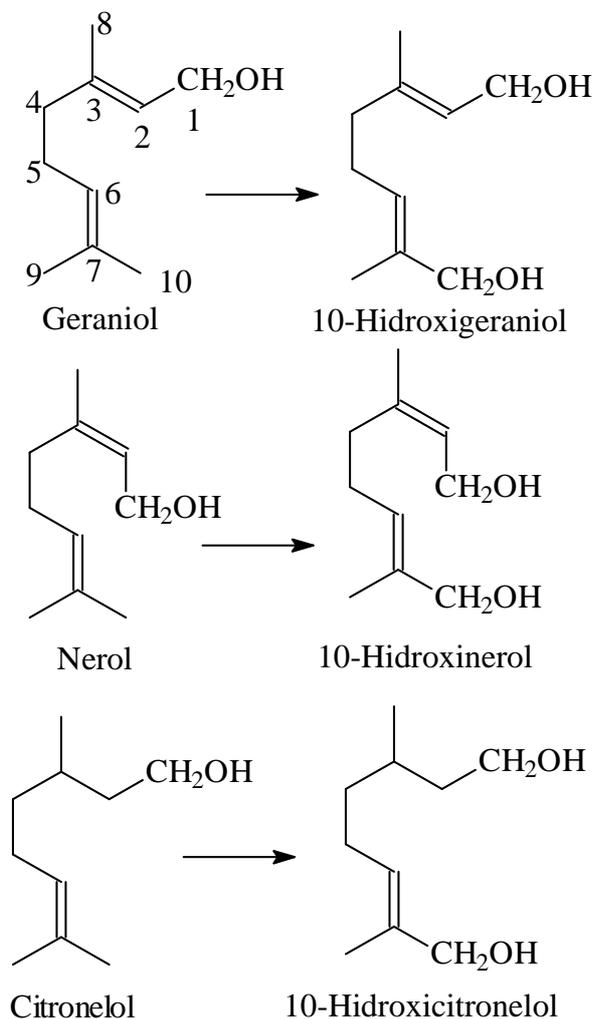


Figura 12: Biotransformação do geraniol por cultura de células em suspensão de *C. roseus*, para obtenção do 10-hidroxigeraniol, 10-hidroxicitronelol e 10-hidroxinerol.

Neste mesmo trabalho Hamada et al. (1997) utilizaram a (+) e (-)-carvona como substrato para biotransformação utilizando cultura de células em suspensão de *C. roseus* como catalisador. Quando foi utilizado a (-)-carvona como substrato foi obtido seis produtos diferentes (Figura 13), sendo o produto majoritário o 5 β -hidroxineodihidrocarveol, com rendimento de 57,5%. Quando foi utilizado a (+)-carvona como substrato foi obtido apenas dois produtos, o 4 α -hidroxicarvona e o 5 α -hidroxicarvona (Figura 14), com rendimentos de 34,6% e 65,4%, respectivamente.

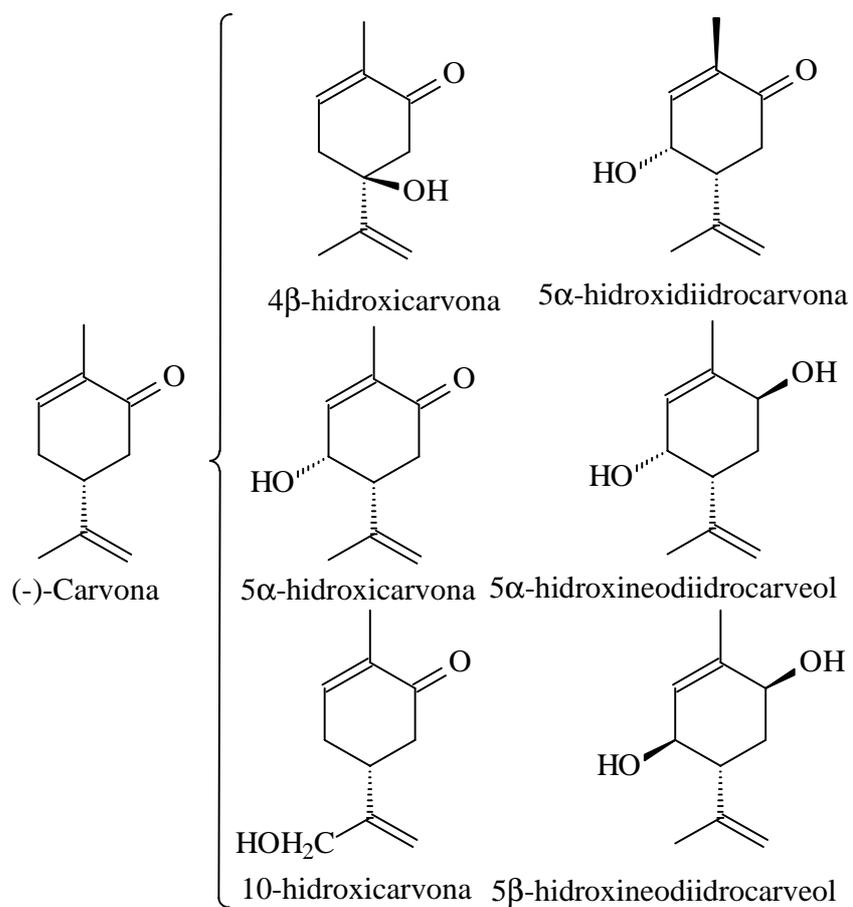


Figura 13: Biotransformação da (-)-carvona por cultura de células em suspensão de *C. roseus*.

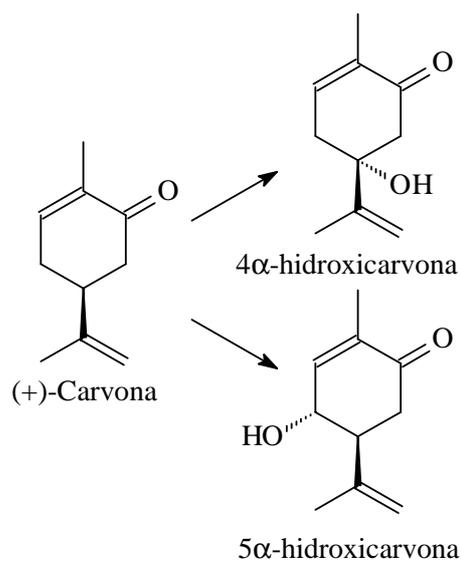


Figura 14: Biotransformação da (+)-carvona por cultura de células em suspensão de *C. roseus*.

Curdiona (**12**) pode ser biotransformada através de cultura de células em suspensão de *Lonicera japonica*, e o resultado deste processo são seis produtos puros isolados (Figura 15), o (2*S*)-2-hidroxicurdiona, o (2*R*)-2-hidroxicurdiona, o (8*S*)-8-hidrocurdiona, o (2*R*, 8*S*)-8-hidro-2-hidroxicurdiona e dois epóxidos da curdiona que são estereoisômeros entre si, com rendimentos de 20%, 23,75%, 6,87%, 4,37%, 8,12% e 4,37%, respectivamente (HORIIKE et al., 1997).

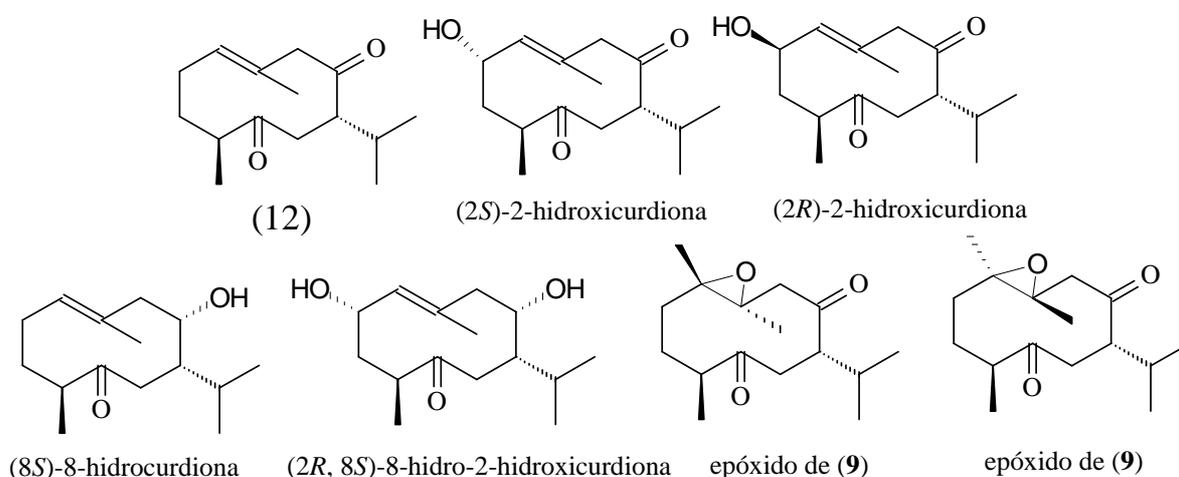


Figura 15: Biotransformação da curdiona por cultura de células em suspensão de *L. japonica*.

2.4. Reduções de duplas ligações C-C.

Reduções assimétricas de enonas utilizando biocatalisadores tornaram-se um método extremamente atrativo para a preparação de cetonas quirais, devido a enantiosseletividade promovida pelas enzimas redutases. Estas enzimas mostram uma atividade ótima em pH 7,4. Para sua atividade é necessário a presença de uma coenzima, NADH ou NADPH. A enzima redutase demonstra ser específica na redução de insaturações que apresentam hidrogênio em posição β ao grupo carbonílico, sendo esta redução estereoespecífica, pois a adição de um dos hidrogênios ocorre pela face *si* do carbono 1 o outro pela face *re* do carbono 6 (Figura 16) (SHIMODA et al., 1998).

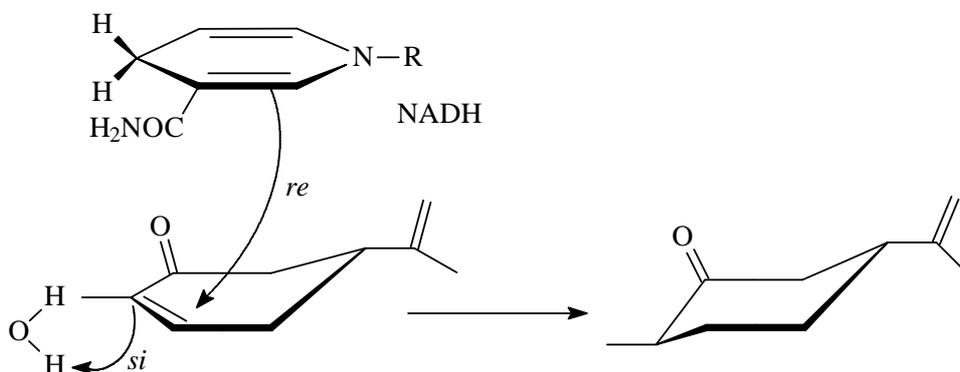


Figura 16: estereoquímica da redução da (*R*)-carvona pela redutase isolada da *Euglena gracilis* Z.

SHIMODA et al., (1998) utilizaram a (*R*)-carvona e (*S*)-carvona como substrato numa reação de biotransformação tendo como catalisador uma enzima redutase isolada da *Euglena gracilis* Z. A partir desta reação foi possível isolar dois compostos, o 1*R*, 4*R*-diidrocarvona e o 1*R*, 4*S*-isodihidrocarvona (Figura 17), com rendimentos de 23% e 6%, respectivamente, o que demonstra uma especificidade da enzima por um dos enantiômeros.

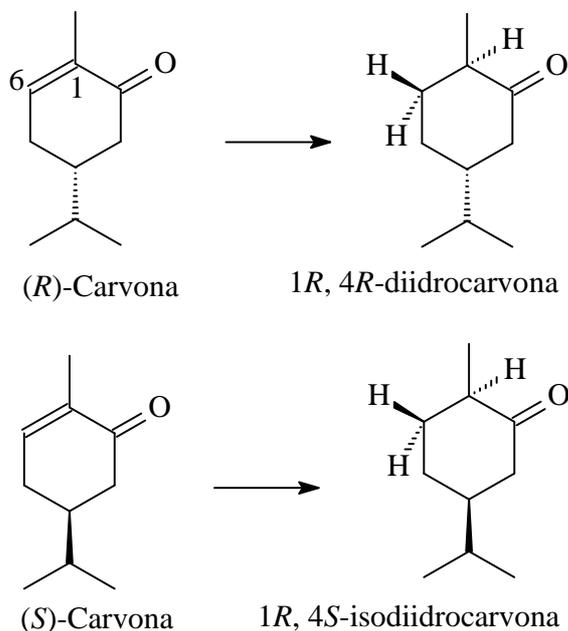


Figura 17: redução da dupla ligação C-C da (*R*) e (*S*)-carvona utilizando a enzima redutase extraída da *Euglena gracilis*

Alguns trabalhos realizados por diferentes autores demonstram a capacidade de enonas redutases de cultura de células bacterianas em promover redução de duplas ligações C-C (SHIMODA e HIRATA, 2000; SHIMODA et al., 1998). Resultados similares foram obtidos em cultura de células de *Catharanthus roseus* (HAMADADA et al., 1997), no qual houve uma hidrogenação entre os carbonos 2 e 3 do geraniol, resultando no citronelol (Figura 18).

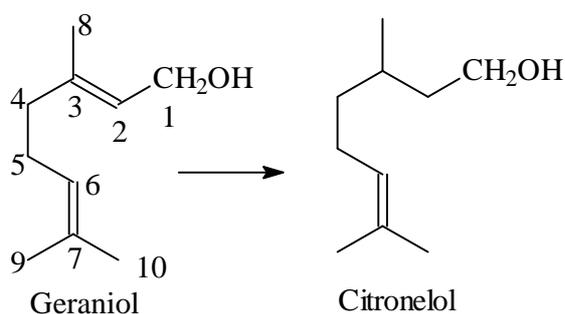


Figura 18: Biotransformação do geraniol por cultura de células em suspensão de *C. roseus*, para obtenção do citronelol.

Hirata et al. em 2005, demonstraram a capacidade de cultura de células em suspensão de *N. tabacum* e *C. roseus* em promover hidrogenação de duplas C-C de maleimidas. Foram testadas maleimidas N-substituídas (**13**) (podendo ser substituídas por metila, butila ou fenila), resultando derivados reduzidos (**14**), e a *N*-fenil-2-metilmaleimida (**15**), obtendo-se a (*R*)-*N*-fenil-2-metilsuccinimida (**16**) (Figura 19).

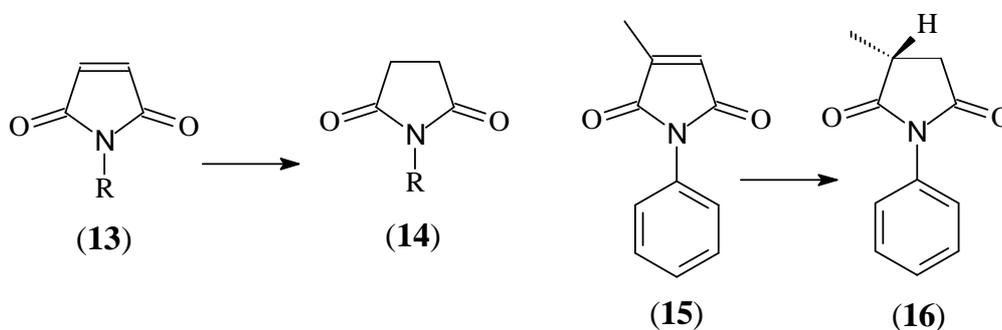


Figura 19: Biotransformação de maleimidas N-substituídas e *N*-fenil-2-metilmaleimida por cultura de células em suspensão de *N. tabacum* e *C. roseus*.

Cultura de células de *Glycine max* também demonstra capacidade de redução estereosseletiva da 2-butenolida (**17**); esta redução gera butenolidas quirais (**18** e **19**) (Figura 20), devido a presença de redutases em suas células (SHIMODA et al., 2007).

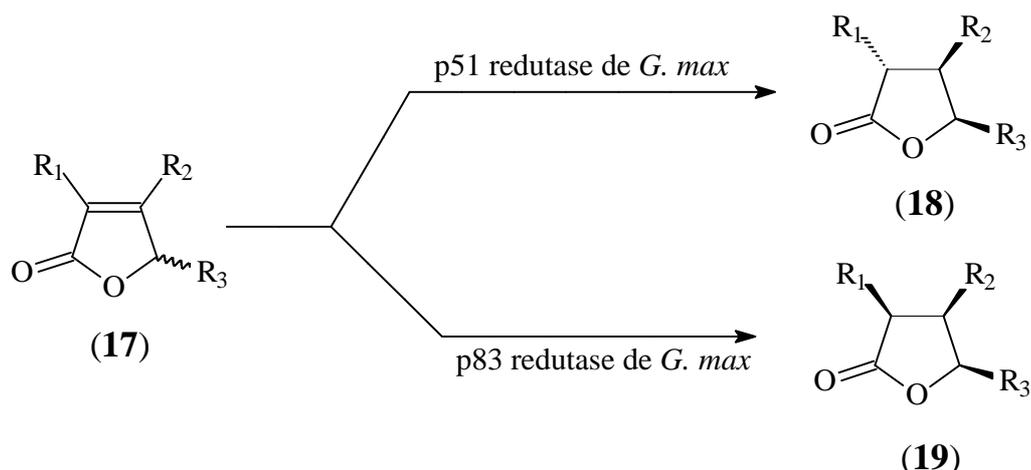


Figura 20: Biotransformação da 2-butenolida por cultura de células em suspensão de *G. max*.

2.5. *Cereus peruvianus* Mill (Cactaceae).

A família das catáceas englobam em torno de 239 gêneros e aproximadamente 3300 espécies (RIZZINI, 1987). Esta família está essencialmente restrita ao Novo Mundo, encontrando-se formas nativas desde o Chile e Argentina até o Canadá, sendo cultivadas em mais de 30 países (WALLACE e GIBSON, 2002). Estas plantas crescem principalmente em regiões áridas e semi-áridas, porém ocupam também zonas subtropicais e tropicais úmidas onde vivem como epífitas.

As cactáceas que ocupam as regiões áridas apresentam profundas modificações anatômicas, associadas com a adaptação ao meio seco. Estas adaptações facilitam o acúmulo de água, e com o que armazenam tendem a viver a maior parte do ano (RIZZINI, 1987).

O desenvolvimento destas estruturas especializadas (cutículas espessas, revestimento ceroso e células epidérmicas com paredes lignificadas), relacionadas

com os mecanismos de adaptação contra perda de água, tornam as cactáceas fontes de produtos de interesse econômico e industrial, por apresentarem uma imensa diversidade de compostos com possíveis ações biológicas, como, alcalóides, esteróides, triterpenos, glicosídeos, gorduras, óleos e ceras (WHISTTER, 1963; MARKS, 1979; MARTINDALE, 1979; TURBAK, 1979; SCHEINVAR, 1985; DEMBITSKY e REZENKA, 1996).

Cereus peruvianus (Figura 21) é uma espécie de cactus popularmente conhecida no Brasil como mandacaru; cultivada em jardins além de apresentar interesse econômico e industrial. A espécie *C. peruvianus* recentemente vem sendo domesticada e cultivada na região de Israel (NERD et al., 1993; WEISS et al., 1994; MIZRASHI e NERD, 1999), onde é caracterizada como “fruit crop” e plantada comercialmente em pequena escala. As plantas desta espécie produzem alcalóides (VRIES et al., 1971; OLIVEIRA e MACHADO, 2003; ROCHA et al., 2005), ésteres de cera com potencial na aplicação como barreira impermeável (DEMBITSKY e REZENKA, 1996; REZENKA e DEMBITSKY, 1998), e uma goma viscosa com diversas aplicações industriais (ALVAREZ et al., 1992; ALVAREZ et al., 1995; NOZAKI et al., 1993; BARROS e NOZAKI, 2002; MACHADO et al., 2004).



Figura 21: *Cereus peruvianus* plantado no horto de plantas medicinais no campus da Universidade Estadual de Maringá-Pr

2.6. Cultura de tecidos do *Cereus peruvianus*

Em função do interesse em usar esta planta como fonte de produtos de interesse industrial e econômico (ex. ceras que podem ser utilizadas como impermeabilizantes de tintas e vernizes), o Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletrofores de Vegetais, desenvolveu técnicas de cultura de tecidos para a produção de plantas desta espécie. Como o número de plântulas obtidas a partir de sementes germinadas *in vitro* foi baixo, e a cultura de botões axiliares (aréolas) extraídas de plantas adultas resultou em alta contaminação, as plantas foram obtidas a partir de cultura de calos induzidos e mantidos em diferentes condições de cultivo (OLIVEIRA et al., 1995).

Dentre as várias técnicas de cultura *in vitro*, a cultura de tecidos de calos foi considerada como ideal (DOODS, 1991), pois de um pequeno pedaço de tecido de calo pode ser multiplicado e produzido uma grande quantidade de células, que podem ser induzidas à regenerar um número também desejável de plantas.

Para obtenção de calos a partir de células diferenciadas, faz-se necessário realizar o processo inverso ao da diferenciação, ou seja, um processo de desdiferenciação das células, promovido pela combinação em diferentes concentrações dos reguladores de crescimento. Esta desdiferenciação pode ocorrer como decorrência de genes que podem ser ativados ou desativados, podendo ser detectadas através da análise de proteínas inespecíficas ou de sistemas enzimáticos (MACHADO et al., 1999).

2.7. Isozimas em cultura de tecidos de *Cereus peruvianus*

Segundo Markert e Möller em 1959, as isozimas, também conhecidas como isoenzimas, são formas múltiplas de uma mesma enzima, que apresentam a capacidade de atuar sobre um mesmo substrato, porém podem apresentar seqüências polipeptídicas, e/ou cargas elétricas, e/ou pesos moleculares, e/ou especificidades e cinéticas diferentes, dentre outras variáveis.

Em plantas as isozimas estão presentes durante todo o período de vida do vegetal e algumas são drasticamente induzidas durante condições de estresse, sendo que em cultura de tecidos, a maior parte das isozimas, advém parte do metabolismo de carboidratos e parte de respostas da patogênese da planta (BOWLER et al., 1989 apud JORGE, MANGOLIN, MACHADO, 1997).

Alguns trabalhos demonstraram a presença de determinadas enzimas (álcool desidrogenases, malato desidrogenases, esterases, isoperoxidase, isocitrato desidrogenase e fosfatase ácida (OLIVEIRA et al., 1995; MANGOLIN e MACHADO, 1997; MANGOLIN et al., 1994ab) em cultura de tecidos de *C. peruvianus*, abrindo a possibilidade da utilização dessas culturas como um catalisador biológico.

Das várias isozimas, que foram induzidas por ocasião da formação dos tecidos de calos, isozimas malato desidrogenase glioxissomal (gMDH) estavam preferencialmente ausentes nos calos cultivados em meio contendo a combinação 4,0 mg/L de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 4,0 mg/L de cinetina (KIN) (Mangolin et al., 1994ab), e nas plantas recentemente regeneradas de *C. peruvianus* neste meio (Machado et al., 1993); fenótipos eletroforéticos das isozimas álcool desidrogenase (ADH) foram relacionados com a mais alta proporção de KIN/2,4-D no meio de cultivo dos calos, e relacionados, portanto, com a capacidade de regeneração de plantas (Mangolin et al., 1994b). Isozimas ADH-1 e mMDH-1 (mitocondrial) foram ainda relacionadas com condições de estresse de temperatura e de cortes nos tecidos necessários para proceder a multiplicação dos calos (TORQUATO et al., 1995). Quando subcultivados em temperatura mais alta, e em meio de cultura contendo altas e baixas concentrações de diferentes tipos de fontes de carbono, as variações nos fenótipos eletroforéticos das isozimas ADH, MDH, sorbitol desidrogenase (SDH) e peroxidases (PER) foram concordantes com as previamente descritas, e também justificadas como devido a condições de estresse (JORGE, 1995; JORGE et al., 1997)

No presente trabalho as enzimas de maior interesse são as álcool desidrogenase e a malato desidrogenase. Sendo que a primeira apresenta capacidade de redução de cetonas a álcoois e a segunda com a capacidade de redução de alfa-ceto ácidos (SHIMODA e HIRATA, 2000; SHIMODA, et al., 1998).

3. OBJETIVOS

Avaliação da capacidade da cultura de células em suspensão de *Cereus peruvianus* Mill em realizar biotransformações, utilizando como substrato o acetoacetato de etila, a *trans*-benzalacetofenona e a acetofenona.

Objetivos específicos:

- Obtenção do substrato sintético para acompanhar as reações de biocatálise;
- Desenvolvimento de uma metodologia de biocatálise. Desenvolvimento de uma metodologia de biocatálise;
- Otimização da metodologia biocatalítica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Procedimentos gerais

Todos os reagentes e solventes foram adquiridos comercialmente. Os substratos acetofenona (**20**) e acetoacetato de etila (**21**) foram adquiridos comercialmente e a *trans*-benzalacetofenona (chalcona) (**22**) foi sintetizada. Todos os substratos foram reduzidos quimicamente para obtenção dos padrões racêmicos. Para a realização da cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizados cromatoplasmas de alumínio da Merck e placas de vidro recobertas com sílica gel 60 GF254. A fase móvel utilizada foi o hexano/acetato de etila (95:5), utilizando solução ácida de *p*-anisaldeído e 2,4-dinitrofenilhidrazina como reveladores químicos. Utilizou-se placas preparativas com sílica gel GF254 para purificação do produto obtido nas biotransformações, sendo que estes produtos foram solubilizados em clorofórmio deuterado (CDCl₃) para análise por RMN de ¹H e de ¹³C. Esta análise foi realizada no Departamento de Química em espectrômetro de RMN-Varian, modelo Mercury Plus 300,00 MHz. O produto da purificação também foi submetido a espectrometria de

massas, em Espectrômetro de massa com cromatógrafo a gás acoplado, GC/MS SHIMADZU, mod. QP 2000 A.

4.2. Preparação da *trans*-benzalacetofenona (22).

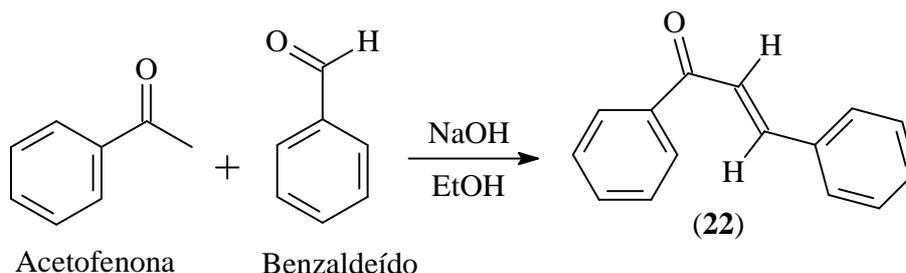


Figura 22: Obtenção da *trans*-benzalacetofenona pela reação da acetofenona com o benzaldeído.

O procedimento adotado para a obtenção da *trans*-benzalacetofenona foi a reação do benzaldeído com acetofenona como realizada por Costa, et al. (2003). Esta reação é conhecida como reação de Claisen-Schimidt.

Nesta metodologia o meio reacional foi mantido à temperatura de 0 a 10°C, utilizando-se um balão de 50,0 mL ao qual foram adicionados 6,0 mL de acetofenona e 15,0 mL de álcool etílico, e mantido sob agitação por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 25,0 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 10% e a reação foi agitada por mais 10 minutos. Lentamente adicionou-se 5,0 mL de benzaldeído sob agitação, sendo esta agitação mantida por mais 2 horas.

O meio reacional foi mantido por um período de 12 a 16 horas a uma temperatura de 5°C. Os cristais formados foram coletados através de filtração a vácuo, sendo os mesmos lavados com água destilada a temperatura de 10°C e secos a temperatura ambiente. Os cristais obtidos foram submetidos a recristalização com etanol à quente. O rendimento da reação foi de 70%.

4.3. Preparação do (+/-)-1-fenil-etanol (23 e 24).

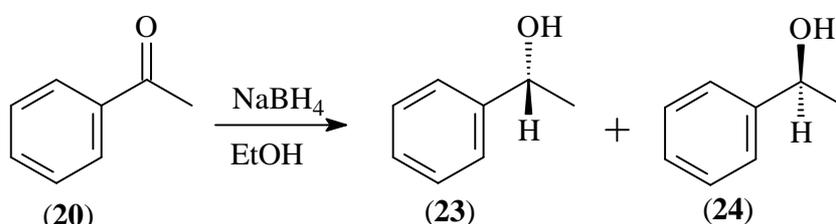


Figura 23: Redução da acetofenona para obtenção do (+/-)-1-fenil etanol.

Para promover esta reação foi utilizada a metodologia descrita por Costa, et al. (2003). Nesta metodologia está estabelecido que 0,1 g da acetofenona (20) e 10,0 mL de álcool etílico 95° seja resfriado a 0°C em balão de 50,0 mL. Em seguida, deve ser acrescentado lentamente 0,1 g de boro-hidreto de sódio (NaBH₄). Após esta adição manteve-se em agitação durante 60 minutos. Após este período, foi adicionado 20,0 mL de solução saturada de cloreto de amônio (NH₄Cl) e promovida a extração através de funil de separação, utilizando duas porções de 20,0 mL de diclorometano (CH₂Cl₂) e adicionado sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), seguida de filtração da fase orgânica. O solvente foi evaporado sob vácuo, desta forma obtendo-se um rendimento reacional de 85%.

4.4. Preparação da (+/-)-1,3-difenil-propenol-1 (25 e 26).

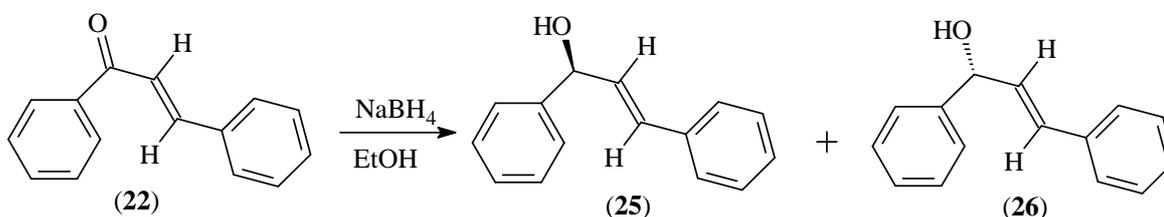


Figura 24: Redução da *trans*-benzalacetofenona para obtenção do (+/-)-1,3-difenil-propenol-1.

Para o preparo dos produtos (25) e (26) foi adicionado 0,1 g da *trans*-benzalacetofenona (22) e 10,0 mL de álcool etílico 95° em balão de 50,0 mL e resfriado a 0°C. Em seguida, foi acrescentado lentamente 0,1 g de NaBH₄, e este

meio reacional foi mantido em agitação durante 60 minutos. Após este período, foi adicionado 20,0 mL de solução saturada de NH_4Cl e promovido a extração em funil de separação com duas porções de 20,0 mL de CH_2Cl_2 e adicionado Na_2SO_4 , seguido de filtração da fase orgânica. O solvente foi evaporado sob vácuo e o rendimento reacional foi de 79%.

4.5. Preparação do (+/-)-etil-3-hidroxiacetato (27 e 28).

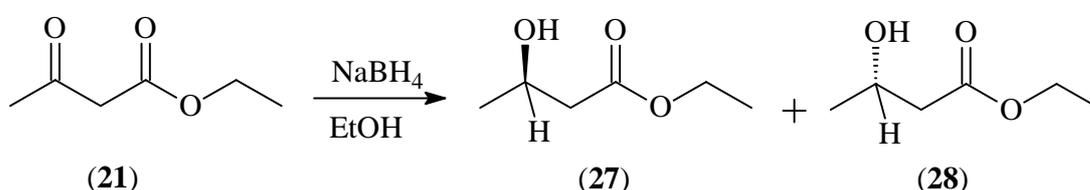


Figura 25: Redução do acetoacetato de etila para obtenção do (+/-)-etil-3-hidroxiacetato.

Para obtenção dos compostos (27) e (28) foi adicionado 0,1 g do acetoacetato de etila e 10,0 mL de álcool etílico 95° e resfriado a 0°C em balão de 50,0 mL. Em seguida, foi acrescentado lentamente 0,1 g de NaBH_4 , e este meio reacional foi mantido em agitação durante 60 minutos. Após este período, foi adicionado 20,0 mL de solução saturada de NH_4Cl e promovido extração em funil de separação com duas porções de 20,0 mL de CH_2Cl_2 e adicionado Na_2SO_4 , seguida de filtração da fase orgânica. O solvente foi evaporado sob vácuo, obtendo-se um rendimento reacional de 80%.

4.6. Obtenção da cultura de tecidos de *C. peruvianus*

Os calos de *C. peruvianus* (Figura 26) utilizados para o desenvolvimento deste trabalho, foram obtidos pela metodologia descrita por Oliveira et al (1995). O processo consiste em induzir a proliferação celular a partir de fragmentos de hipocótilo em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (Apêndice A) suplementado com vitaminas do meio B5 (GAMBORG, et al., 1968), 3% de sacarose, 0.8% de agar, além de 15% de água de coco e 4.0 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 4.0 mg/L de N6-furfuriladenina (cinetina). As placas de Petri contendo os explantes

foram incubadas a 32 °C sob um fotoperíodo de 16 horas. Depois de 18-20 semanas, os calos friáveis que não produziram cladódios foram subcultivados em intervalos de 13 dias. Estes calos estão sendo subcultivados por mais de 12 anos no laboratório de cultura de tecidos e eletroforese de vegetais.



Figura 26: Placa de Petri contendo cultura de tecido (calos) de *Cereus peruvianus*

4.7. Procedimento para obtenção de cultura de células em suspensão

Para obtenção da cultura de células em suspensão os calos de *C. Peruvianus* foram fragmentados para proporcionar o maior número de células livres possível. Este procedimento foi realizado em superfície estéril com auxílio de espátula e pinça. Após a fragmentação dos calos, as células foram pesadas e adicionadas no meio líquido.

4.8. Procedimento geral de biotransformação

4.8.1. Procedimento 1

Este primeiro procedimento foi baseado em vários trabalhos, HAMADA, et al., 1997; Horiike, et al., 1997; Gil, et al., 1995; Cooney, et al., 2000, etc., que foi realizada através da transferência asséptica de 7,5 g de calos de *C. peruvianus* para 10 frascos de 250,0 mL contendo 50,0 mL de meio MS líquido. Estes foram mantidos durante 5 dias sob agitação (120 rpm) a temperatura de 28 °C. Após este período, as

células foram transferidas para 10 frascos de 250,0 mL contendo 50,0 mL de solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 (Apêndice B). Em 4 frascos foram adicionados 30 mg de acetoacetato de etila (**21**) e em outros 4 frascos 30 mg da *trans*-benzalacetofenona (**22**). Os dois frascos restantes foram utilizados como controle, ou seja, não foram adicionado substratos. O sistema foi mantido sob agitação (120 rpm) por 5 dias em agitador rotativo (Figura 31A e B) a temperatura de 28 °C.

Após este período todos os frascos com células subcultivadas foram filtrados a vácuo e os sobrenadantes foram submetidos a extração com duas porções de 30,0 mL de acetato de etila e secos com Na₂SO₄. As células não foram submetidas a nenhum processo extrativo. O produto foi submetido a CCD, verificando-se a não ocorrência de biotransformação.

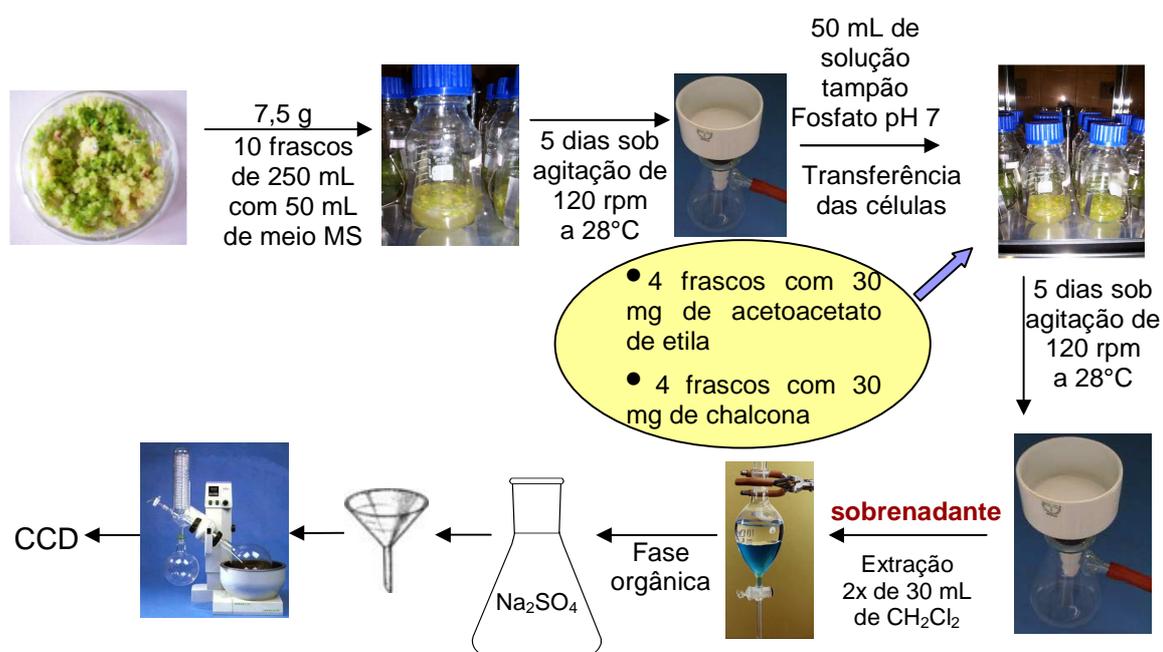


Figura 27: Esquema do procedimento 1 de biotransformação.

4.8.2. Procedimento 2

Na segunda metodologia, foram transferidos assepticamente 7,5 g de calos de *C. peruvianus* para 10 frascos de 250,0 mL contendo 50,0 mL de solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. Em 4 frascos foram adicionados 30 mg de acetofenona (**20**) e em outros 4 frascos 30 mg de *trans*-benzalacetofenona (**22**). Os dois frascos

restantes foram utilizados como controle, ou seja, não houve a adição dos substratos em estudo. O sistema foi mantido sob agitação (120 rpm) por 5 dias em agitador rotativo a temperatura de 28 °C (Figuras 28 e 31A e B).

Após os 5 dias de incubação, foi realizada a extração dos meios reacionais através de filtração das células com o auxílio de funil de Büchner, sendo o sobrenadante transferido para funil de separação de 250,0 mL para ser submetido a extração com duas porções de 30,0 mL de acetato de etila e com três porções de 30,0 mL de butanol. As células foram submetidas a três extrações com metanol por períodos de 24 horas, intercaladas com 20 minutos de sonicação, para promover o rompimento das células. A fração metanólica foi concentrada e particionada em água e acetato de etila. Todas as frações orgânicas foram evaporadas sob vácuo e secas com Na_2SO_4 e submetidas a análise por CCD e RMN ^1H e ^{13}C . Na fração acetato de etila das células, foi obtido o 1,3-difenil-propanona-1 (**29**) com um rendimento de 20%.

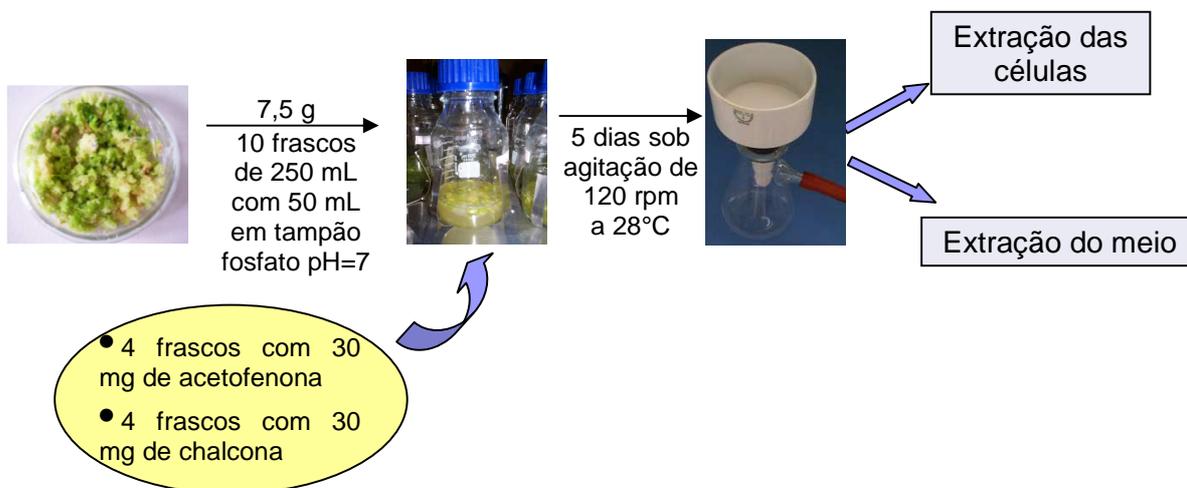


Figura 28: Esquema do procedimento 2 de biotransformação, inoculação das células de *C. peruvianus*.

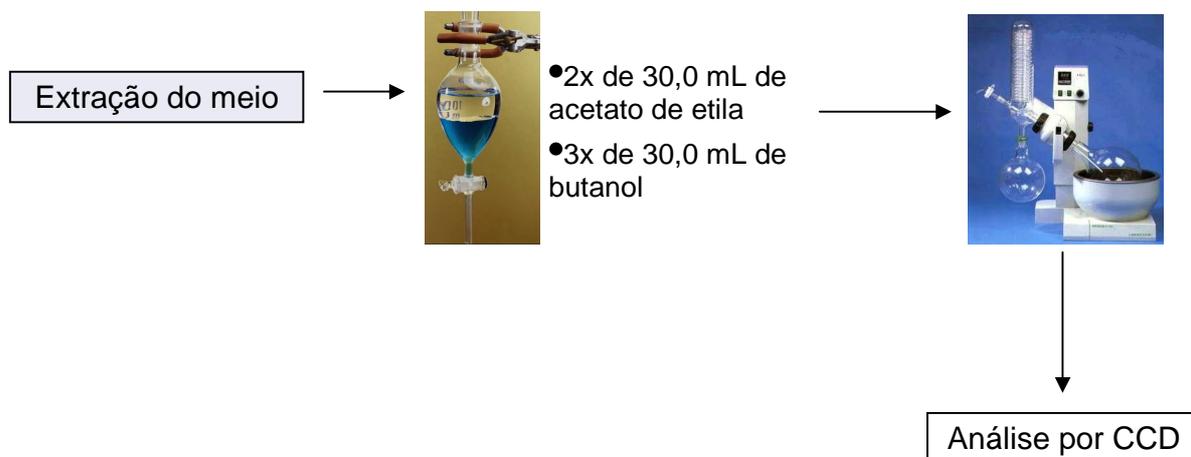


Figura 29: Esquema do procedimento 2 de biotransformaço, extraço do sobrenadante.

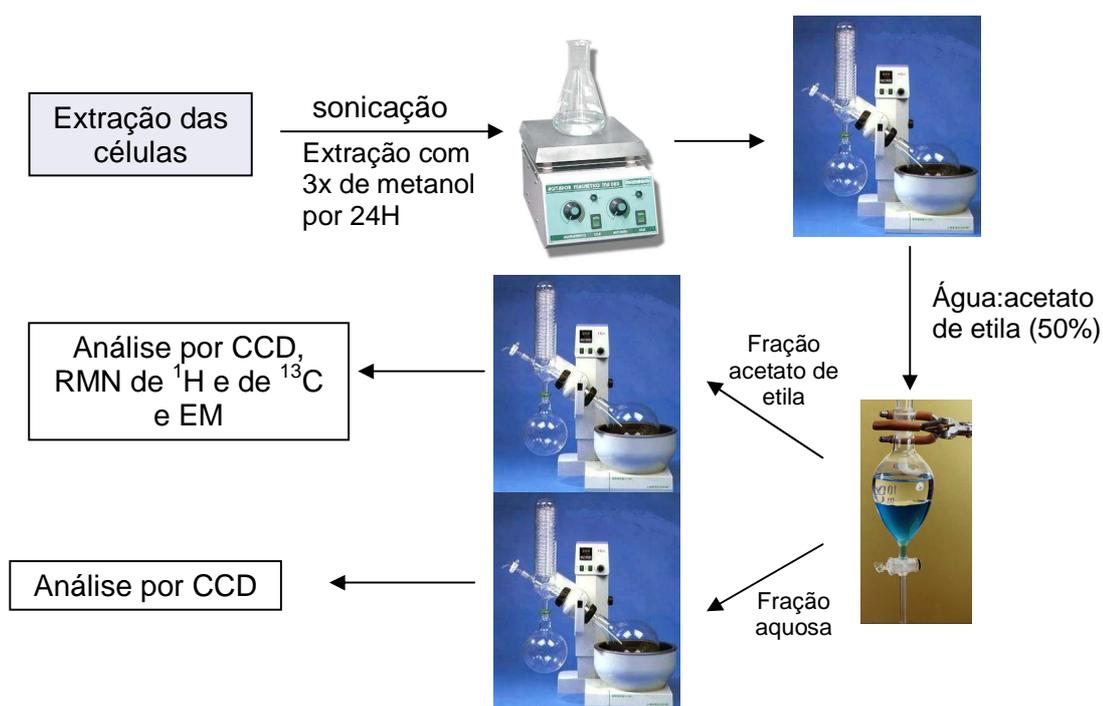


Figura 30: Esquema do procedimento 2 de biotransformaço, extraço das células.

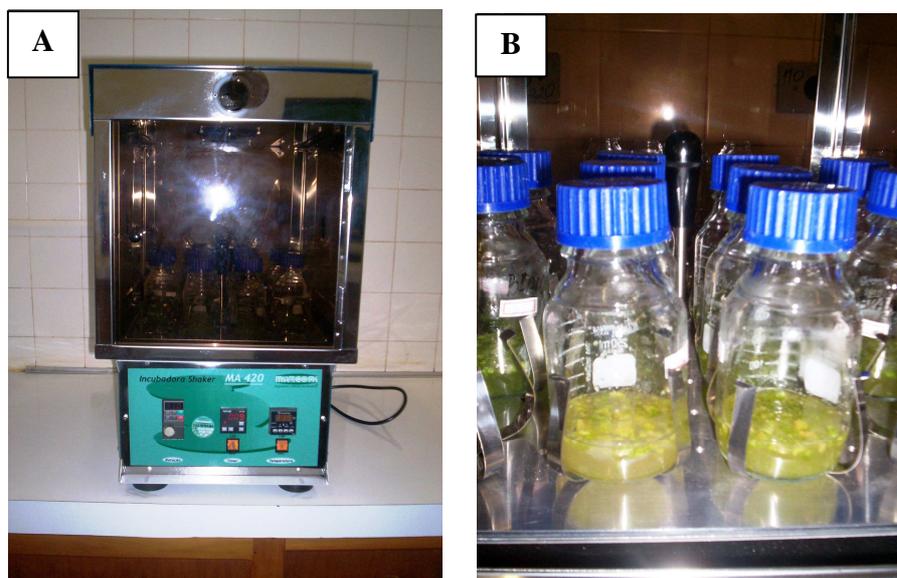


Figura 31: Cultura de células em suspensão de *C. peruvianus* em agitador rotativo em processo de biotransformação dos substratos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma das propostas deste trabalho quando foi utilizado o procedimento 1 de biotransformação descrito acima, no qual foi empregado como substrato o acetoacetato de etila (**21**) e a *trans*-benzalacetofenona (**22**), o esperado seria obter os produtos observados nas Figuras 32 e 33. Este resultado era esperado devido aos resultados dos trabalhos de Machado, et al., 2006; Nakamura, et al., 1995; Chai, et al., 2001, etc. que demonstraram a capacidade de cultura de células em suspensão em realizar biorreduções de carbonilas, ou seja, apresentar a capacidade de reduzir carbonilas para obter álcoois. No entanto, verificou-se através CCD que a cultura de células de *C. peruvianus* nas condições empregadas no procedimento 1, não foi capaz de realizar nenhum tipo de biotransformação.

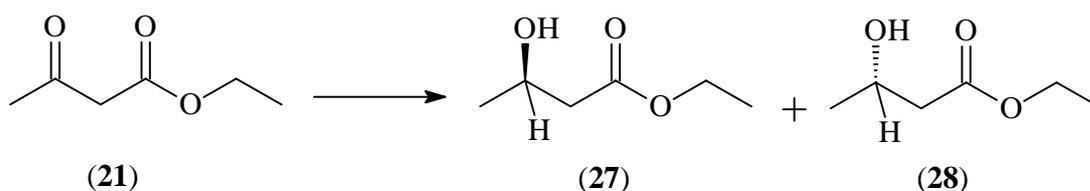


Figura 32: Prováveis produtos de biotransformação do acetoacetato de etila, utilizando o procedimento 1.

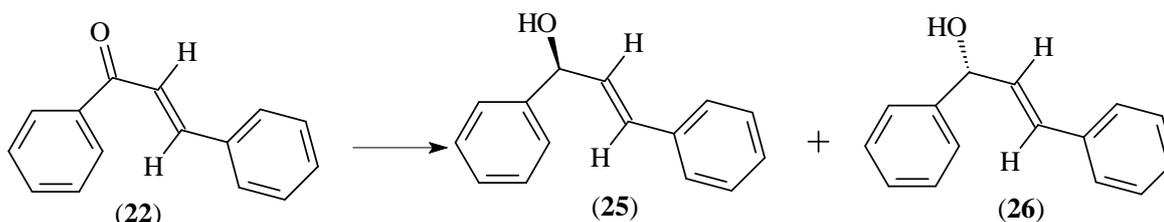


Figura 33: Prováveis produtos de biotransformação da *trans*-benzalacetofenona, utilizando o procedimento 1.

Este procedimento 1, foi seguido o perfil reacional e extrativo comumente utilizado na grande maioria dos trabalhos de biotransformações, os quais realizam extrações apenas do meio de cultura em que as células vegetal estão suspensas (HAMADA, et al., 1997; HORIIKE, et al., 1997; GIL, et al., 1995; COONEY, et al., 2000), não existindo uma preocupação em promover métodos extrativos a partir das células usadas nas biotransformações. Entretanto, alguns trabalhos recentes (KONDO, et al., 2006; SHIMODA, et al., 2007; SHIMODA, et al., 2008) utilizam um método extrativo que possibilita a obtenção de possíveis produtos reacionais que permanecem no interior das células. O que justificaria esta metodologia é o fato de que em cultura de tecidos de plantas muitas enzimas permanecem no citoplasma celular sem serem excretadas para o meio extracelular (IZUMI, et al., 1995).

Com isso, foi desenvolvido o procedimento 2, o qual submete as células utilizadas na biotransformação a um processo de sonicação (ultra-som), que promove o rompimento celular, possibilitando a extração de produtos de reação contidos no interior destas células. Além disso, como a sonicação das células são realizadas em metanol, é possível extrair possíveis produtos de reações de glicosilação, tornando o método extrativo mais abrangente. Este procedimento também prevê extração do sobrenadante com um solvente mais polar (butanol) e um mais apolar (acetato de etila).

Com este novo procedimento esperava-se obter os produtos das Figuras 30, 33 e 34, ou seja, produtos biorreduzidos na carbonila, bem como possíveis glicosilação. No entanto, o produto obtido e isolado foi o 1,3-difenil-propanona-1 (**29**) (Figura 35). O produto (**29**) foi isolado da fração acetato de etila extraído das células sonicadas, o qual foi detectado por CCD (Figura 36 e 37), que após sua purificação, apresentou um rendimento de 20% (12 mg).

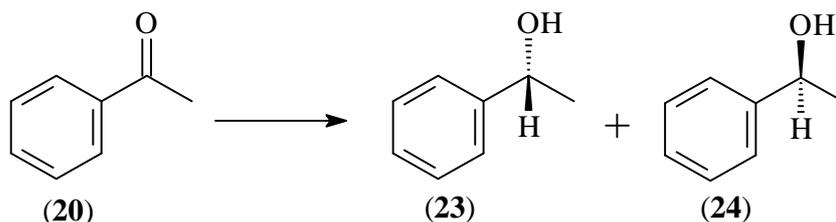


Figura 34: Biotransformação do acetofenona utilizando o método 2.

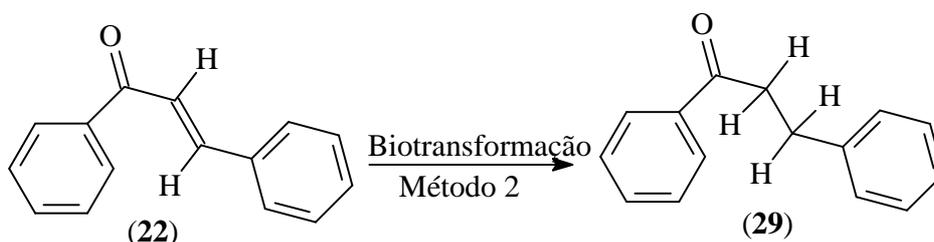


Figura 35: Biotransformação da *trans*-benzalacetofenona utilizando o método 2.

Um rendimento de 20% em uma metodologia que utiliza cultura de células em suspensão, demonstra ser satisfatório quando comparado com o trabalho de Shimoda et al., 1997, que obteve um rendimento de 23% utilizando enzimas redutases isoladas da *Euglena gracilis*, o que torna o processo economicamente mais caro, visto que enzimas isoladas normalmente exige a utilização de cofatores enzimáticos.

Através da análise da reação por CCD, que é mostrada na Figura 36, na qual foi utilizado o revelador químico *p*-anisaldeído (Apêndice B), é possível observar nos pontos de aplicação 1 e 2 os padrões, que são os compostos (22) e (25) e (26), respectivamente. Os pontos 3, 4, e 5 são aplicações das biotransformações e no ponto 6 tem-se o controle, obtido da extração das células as quais não foi adicionado o substrato. Dessa forma verificou-se o aparecimento do 1,3-difenil-propanona-1 (29), que não está presente no controle, acima da mancha amarela, que corresponde ao substrato de partida (*trans*-benzalacetofenona). Na placa apresentada na Figura 37, foi usado como revelador o 2,4-dinitrofenilhidrazina (Apêndice B), no lugar do *p*-anisaldeído, para possibilitar a visualização da presença de compostos carbonílicos,

sugerindo que a carbonila da *trans*-benzalacetofenona não foi reduzida, descartando a possibilidade da formação dos compostos (25) ou (26).

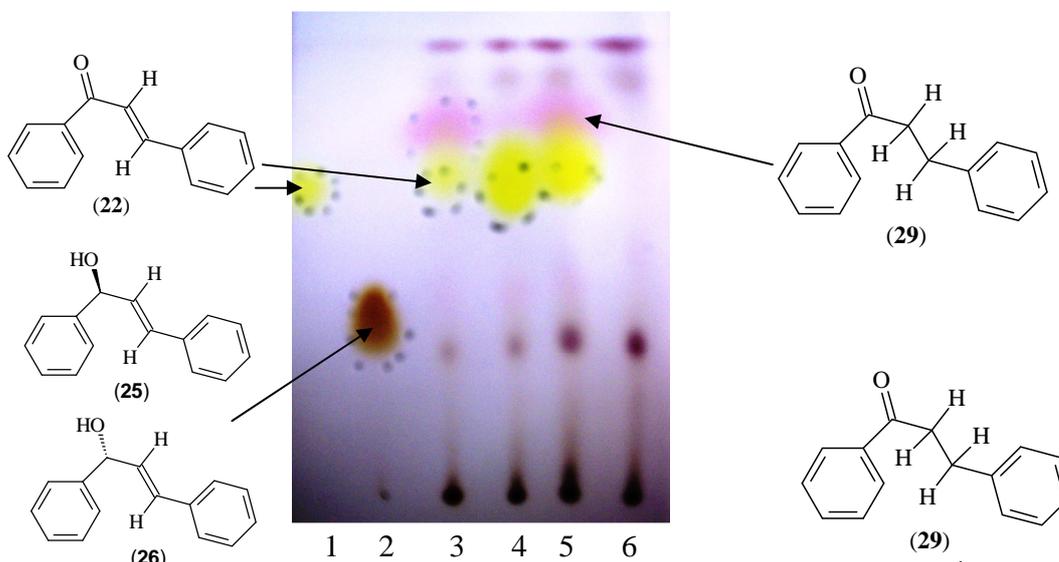


Figura 36: CCD da fração acetato de etila extraída das células do *C. peruvianus*, fase móvel hexano:acetato de etila. Indicador químico: *p*-anisaldeído. Ponto 1 = substrato 22, Ponto 2 = padrões (25 e 26), Pontos 3, 4 e 5 = produtos de biotransformação e

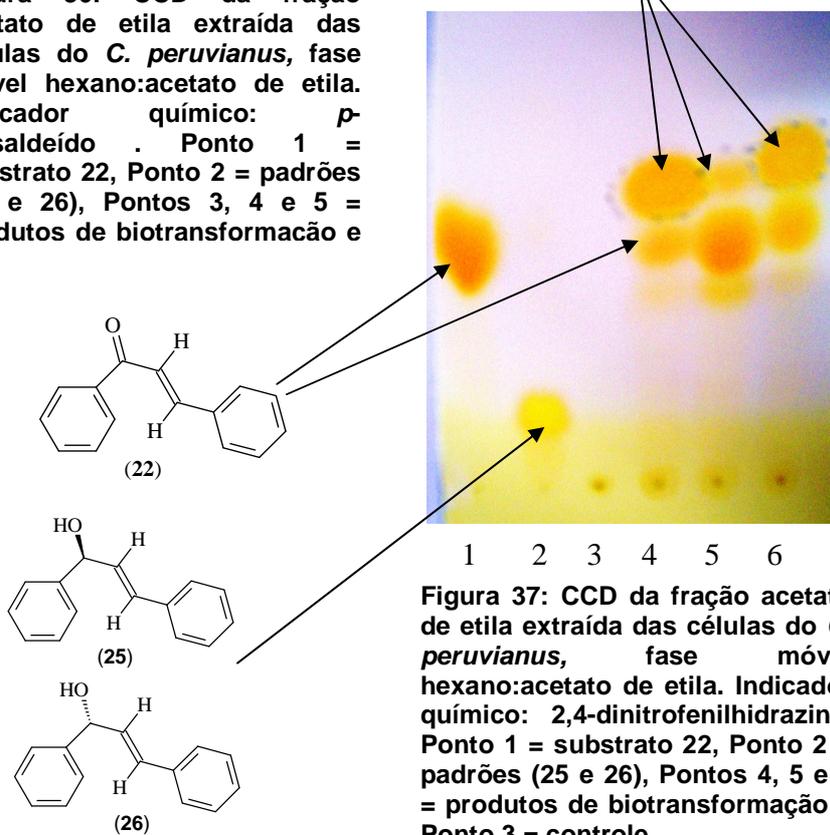


Figura 37: CCD da fração acetato de etila extraída das células do *C. peruvianus*, fase móvel hexano:acetato de etila. Indicador químico: 2,4-dinitrofenilhidrazina. Ponto 1 = substrato 22, Ponto 2 = padrões (25 e 26), Pontos 4, 5 e 6 = produtos de biotransformação e Ponto 3 = controle.

A 1,3-difenil-propanona-1 foi submetida a espectrometria de massa (Apêndice C). Esta análise possibilitou verificar o íon m/z 210,00 que representa seu peso molecular. Neste mesmo espectro verifica-se íons característicos como, m/z 104,85, 76,88 e 90,89 (Figura 38).

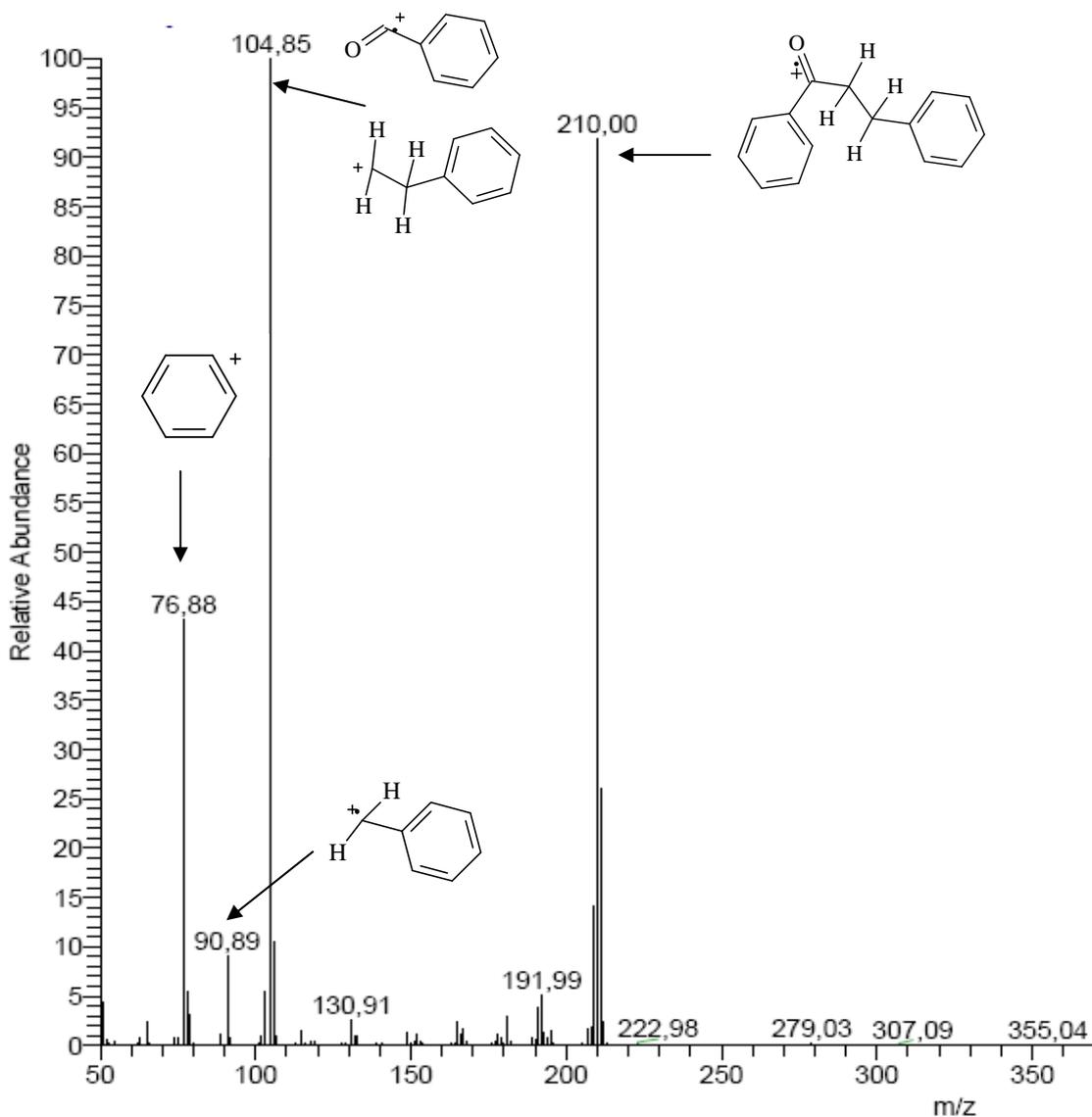


Figura 38: Espectro de massas do 1,3-difenil-propanona-1

O composto (**29**) foi submetido a análise de RMN de ^1H e de ^{13}C (Apêndices D e E). A análise de RMN ^1H do 1,3-difenil-propanona-1 exibiu sinais característicos de hidrogênios metilênicos vicinais (H7 e H8) em δ 3,0 (2H, t, $J=7,8$ Hz) e 3,24 (2H, t,

$J=7,8$ Hz), respectivamente, e região de aromáticos δ 7,11-7,51 (5H, *m*) (Figura 39). No espectro de RMN de ^{13}C , também verificou-se a presença dos carbonos metilênicos com sinais δ 30,34 e 40,67, referentes aos carbonos 7 e 8, respectivamente, e ao deslocamento químico característico de uma carbonila de cetona em δ 199,45.

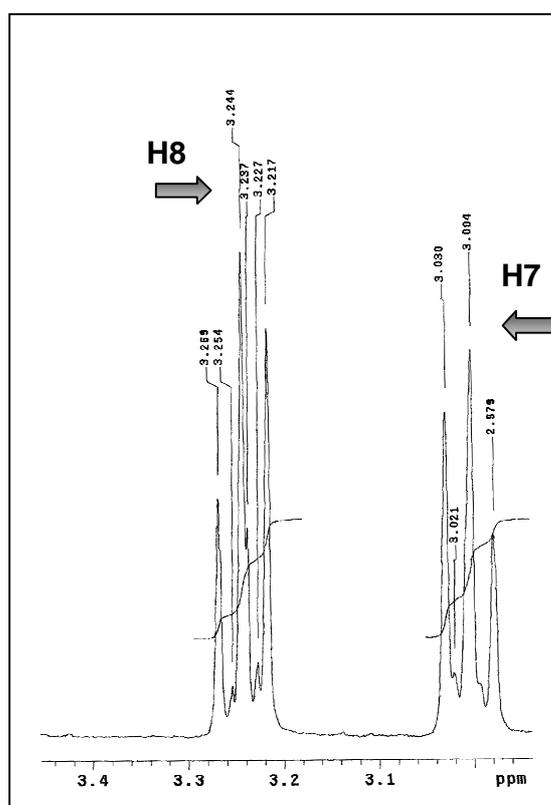
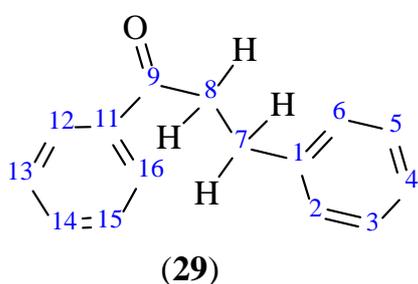


Figura 39: Espectro de RMN ^1H do composto (23) em 300 MHz, diluído em Cl_3CD

Mediante os resultados das análises obtidas dos espectros de RMN, pôde-se constatar a hidrogenação da dupla ligação C-C da *trans*-benzalacetofenona (22), para formação do 1,3-difenil-propanona-1 (29). O composto (29) foi produzido após a absorção do substrato pelas células, o que possibilitou sua interação com as enzimas do tipo enona redutase presentes no interior celular. Nas condições reacionais empregadas, usando-se células em repouso (procedimento 2), não

ocorreu redução do grupo carbonílico do composto (**22**), muito provavelmente devido a pequena produção da enzima álcool desidrogenase neste sistema. Este fato explica também a não conversão do grupo carbonila da acetofenona (**20**) e do acetoacetato de etila (**21**) em seus respectivos álcoois.

O processo de redução de alcenos é um método bastante atrativo, pois muitos compostos utilizados nas indústrias farmacêuticas são obtidos por reduções enantiosseletivas, tais como a (S)-DOPA (Figura 40) que foi sintetizada por Knowles, 1986, e da (S)-fenilalanina (PILLI, 2001) (Figura 41) que é matéria-prima para produção do adoçante artificial aspartame®. Estas metodologias apesar de proporcionarem altos rendimentos reacionais, utilizam catalisadores caros e formados de metais pesados, tornando-se um problema quando se pensa em prejuízos ao meio ambiente. Logo, existe uma demanda para a aplicação na indústria farmacêutica de metodologias que possibilitem realizar reduções estereo e regioseletivas de compostos carbonílicos α , β -insaturados, sendo que a metodologia proposta evitaria reações agressivas ao meio ambiente.

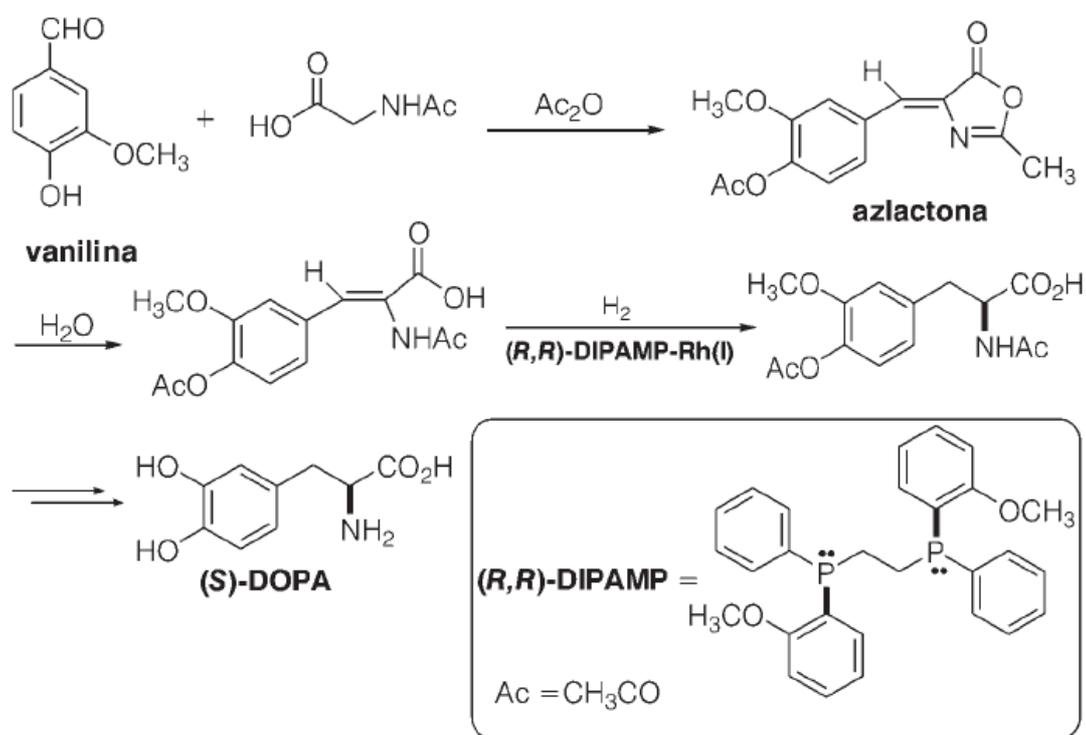


Figura 40: Método sintético de Knowles para síntese catalítica assimétrica da (S)-DOPA

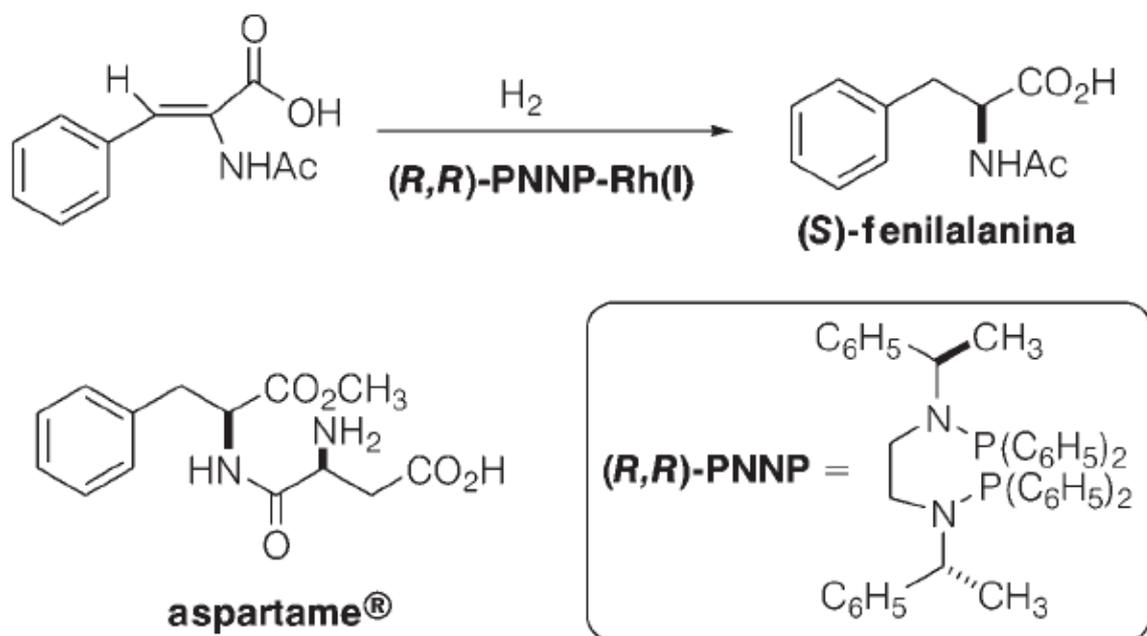


Figura 41: Processo industrial para obtenção do Aspartame®

6. CONCLUSÃO

Fica evidente que cultura de células em suspensão de *Cereus peruvianus*, apresenta capacidade bioquímica para reduzir duplas ligações de compostos carbonílicos α , β -insaturados empregando uma metodologia em que as células estejam em repouso e que seja empregado método extrativo das células rompidas. No entanto, faz-se necessário mais estudos objetivando o aumento do rendimento reacional e a utilização de substratos pró-quirais, com o intuito de avaliar a enantiosseletividade das enzimas em questão.

7. REFERÊNCIAS

ALVAREZ, M., COSTA, S. C., UTUMI, H., HUBER, A., BECK, R., AND FONTANA, J. D. The anionic glycan from the cactus *Cereus peruvianus*-structural features and potential uses. *Appl. Biochem. Biotechnol.* v. 34, p. 283-295, 1992.

ALVAREZ, M., COSTA, S. C., HUBER, A., BARON, M., AND FONTANA, J. D.. The cuticle of the cactus *Cereus peruvianus* as a source of a homo-D-galacturonan. *Appl. Biochem. Biotechnol.* v. 51/52, p. 367–377, 1995.

BARROS M. J.; NOZAKI, J. Redução de poluentes de efluentes das indústrias de papel e celulose pela floculação/coagulação e degradação fotoquímica. *Química Nova*, v. 25, p. 736 – 740, 2002.

BOUHOUCHE, N.; SOLET, J. M.; SIMON-RAMIASA, A.; BONALY, J.; COSSON, L. Conversion for 3-demethylthiocolchicine into thiocolchisodide by *Centella asiatica* suspension cultures. *Phytochemistry*. v. 47, n. 5, p. 743-747, 1998.

CHAI, W.; HAMADA, H.; SUHARA, J.; HORIUCHI, C. A. Biotransformation of (+)- and (-)-camphorquinones by plant culture cells. *Phytochemistry*, v. 57, p. 669-673, 2001.

COONEY, J. M.; HOTTER, G. S.; LAUREN, D. R. Biotransformation of the *Trichoderma* metabolite 6-n-pentyl-2H- pyran-2-one by cell suspension cultures of *Pinus radiata*. *Phytochemistry*, v. 53, p. 447-450, 2000.

COSTA, P.; PILLI, R.; PINHEIRO, S.; VASCONCELLOS, M. Substâncias Carboniladas e Derivados, Bookman Editora, Porto Alegre, 2003

DEMBITSKY V.M.; REZANKA T. Molecular species of wax esters in *Cereus peruvianus*. *Phytochemistry*, v. 42, p. 1075-1080, 1996.

DOODS, J.H. Introduction: Conservation of plant genetic resource - The need for tissue culture. In: Doods, J.H. (Ed.), *In Vitro Methods for Conservation of Plant Genetics Resource*. London: Chapman and Hall, p. 1-9, 1991.

FOWLER, M. W.; STAFFORD, A. M. Plant cell culture, process system and product synthesis. In: Fowler, M. W., Warren, G. S., Moo-Young, M., editors. *Plant biotechnology*. Oxford: Pergamon, p. 79-98, 1992.

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

FURUYA, T.; ASADA, Y.; MIZOBATA, S.; MATSUURA, Y.; HAMADA, H. Biotransformation of *p*-aminobenzoic acid by culture cells of *Eucalyptus perriniana*. *Phytochemistry*, v. 49, p. 109-111, 1997a.

FURUYA, T.; ASADA, Y.; MIZOBATA, S.; MATSUURA, Y.; HAMADA, H. Biotransformation of β -thujaplicin by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*. *Phytochemistry*, v. 46, p. 1355-1358, 1997b.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJOMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell res.* v. 50, p. 151 – 158, 1968.

GIL, G.; FERREIRA, S. P.; BULLARD, C. Biotransformation of Δ^2 -carene by callus tissues. *Phytochemistry*, v. 38, p. 629–31, 1995.

GIRI, A.; DHINGRA, V.; GIRI, C. C.; SINGH, A.; OWEN, P. W.; NARASU, M. L. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnology Advances*, v.19, p.175-199, 2001.

HAMADA, H.; YASUMUNE, H.; FUCHIKAMI, Y.; HIRATA, T.; SATTLER, I.; WILLIAMS, H. J.; SCOTT, I. Biotransformation of geraniol, nerol and (+)- and (-)-carvone by suspension cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*, v. 44, n. 8, p. 615-621, 1997.

HIRATA, T.; TAKARADA, A.; HEGAZY, M. F.; SATO, Y.; MATSUSHIMA, A.; KONDO, Y.; MATSUKI, A.; HAMADA, H. Hydrogenation of the C–C double bond of maleimides with cultured plant cells. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 32, Issue 4, p. 131-134, 2005.

HORIIKE, T.; OSHIRO, M.; KUROYANAGI, M.. Biotransformation of the germacrane type sesquiterpene curdione by suspension cultured cells of *Lonicera japonica*. *Phytochemistry*, v. 44, n. 4, p. 627-632, 1997.

IZUMI, S.; YAMAMOTO, Y.; HIRATA, T. Secretion of an esterase from the cultured suspension cells of *Marchantia polymorpha*. *Phytochemistry*, v. 38, n. 4, p. 831-833, 1995.

JORGE, I. C.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. F. P. S. Malate dehydrogenase isozymes (MDH; EC 1.1.1.37) in long-term callus culture of *Cereus peruvianus* (Cactaceae) exposed to sugar and temperatures stress. *Biochemical genetics*, v. 35, p. 155-164, 1997.

JORGE, I.C. *Isozimas em Cultura de Tecidos de Calos de Cereus peruvianus (Cactaceae) Sob Diferentes Condições de Stress de Temperatura e Fonte de Carbono*. Monografia. Departamento de Biologia. Universidade Estadual de Maringá. Maringá, PR. 68 p., 1995.

KNOWLES, W.S. Application of organometallic catalysis to the commercial production of L-DOPA. *J. Chem. Educ.*, v. 63, p. 222-225, 1986.

KONDO, Y.; SHIMODA, K.; MIYAHARA, K.; HAMADA, H.; HAMADA, H. Regioselective hydroxylation, reduction, and glycosylation of diphenyl compounds by cultured plant cells of *Eucalyptus perriniana*. *Plant Biotechnology*, v. 23, p. 291-296, 2006.

LI, W.; KOIKE, K.; ASADA, Y.; YOSHIKAWA, T.; NIKAIDO, T. Biotransformation of paeonol, *Panax ginseng* root and cell cultures. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 35, p. 117-121, 2005.

LUNA, H.. Biocatalysis application for preparing intermediates for drug synthesis. *Rev. Soc. Quim. Mex.* v. 48, p. 211-219, 2004.

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

MACHADO, F. A. P. S. A.; OLIVEIRA, A. J. B.; MANGOLIN, C. A.; GOBBI-FILHO, L.; MACHADO, M. F. P. S. Polysaccharide production from callus cultures of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *Crop Breed. Applied Biotechnol.*, v. 4, p. 313 – 316, 2004.

MACHADO, M. F. P. S.; COLLET, S. A. O.; MANGOLIN, C. A. Expressão gênica no desenvolvimento de tecidos vegetais “*in vitro*”. Maringá: EDUEM, 1999.

MACHADO, M.F.P.S., PRIOLI, A.J., MANGOLIN, C.A. Malato dehidrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) isozymes in tissue and callus cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Biochem. Genet.*, v. 31, p. 167-172, 1993

MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. F. P. S. Isozyme extraction from shoot tissue of *Cereus peruvianus* (Cactaceae) for electrophoretic analysis. *Biochemical Genetics.*, v. 35, p. 205-210, 1997.

MANGOLIN, C. A.; PRIOLI, A. J.; MACHADO, M. F. P. S. Isozyme patterns in callus cultures and in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Biochemical Genetics*, v. 32, p. 237-247, 1994a.

MANGOLIN, C. A.; PRIOLI, A. J.; MACHADO, M. F. P. S. Alcohol dehydrogenase isozymes as marked at 2,4-D x kin combination in callus and regenerated plants of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Biochemical Genetics*, v. 32, p. 191-200, 1994b.

MARTINDALE, M. The Extra Pharmacopeia Pharmaceutical. 27a ed., London: London Press, 1979.

MEINS, Jr. F. Determination and morphogenetic competence in plant tissue culture. In: Yeoman, M.M. (Ed.). *Plant Cell Culture Technology*: bot. Monographs. London-Oxford: Backwell Scientific Publications, p. 7-25. v. 33, 1986.

MIZRAHI, Y.; NERD, A. Climbing and columnar cacti: new arid land fruit crops. In: J. Janick, Editor, *Perspectives on New Crops and New Uses*, American Society for Horticultural Sciences Press, Alexandria, pp. 358–366, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiology plant.* 15:474 – 497, 1962.

NAKAMURA, K.; MIYOSHI, H.; SUGIYAMA, T.; HAMADA, H., Diastereo- and enantio-selective reduction of ethyl 2-methyl-3-oxobutanoate by plant cell cultures. *Phytochemistry*, v. 40, p. 1419-1420, 1995.

NERD, A., RAVEH, E.; MIZRAHI, Y. Adaptation of five columnar cactus species to various conditions in the Negev Desert of Israel. *Econ. Bot.* p.43:31– 41, 1993.

NOZAKI, J., MESSERSCHMIDT, I., AND RODRIGUES, D. G. Tannery waters cleaning with natural polyelectrolytes: Chemical speciation studies of chromium. *Arq. Biol. Tecnol.* v. 36, p. 761-770, 1993.

OLIVEIRA-COLLET, S.A.; MACHADO, M.F.P.S.; PRIOLI, A.J. Maintenance and development of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) callus tissues in cultures. *Arquivo de Biologia e tecnologia*, v. 39, p. 525-536, 1995.

OLIVEIRA, A. J. B.; MACHADO, M. F. P. S. Alkaloid production by tissue cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 104, p. 149 – 155, 2003.

ORIHARA, Y.; SAIKI, K.; FURUYA, T. Biotransformation of caryophyllene oxide by culture cells of *Eucalyptus perriniana*. *Phytochemistry*, v. 35, n. 3, p. 635-639, 1994.

ORIHARA, Y.; FURUYA, T. Biotransformation of 1,8-cineole by culture cells of *Eucalyptus perriniana*. *Phytochemistry*, v. 35, n. 3, p. 641-644, 1993.

PILLI, R., A.. Catálise assimétrica e o Prêmio Nobel da química de 2001. *Química nova na escola*, n. 14, p. 16-24, 2001.

PRAS, N.; WOERDENBAG, J.; VAN UNDEN, W. The power of plant enzymes in bioconversions. *Agric. Biotechnol. News Info.* 7: 231N – 43N, 1995.

REZANKA, T.; DEMBITSKY, V. M. Very-long-chain alkyl esters in *Cereus peruvianus* wax. *Phytochemistry*, v. 42, p. 1145 – 1148, 1998.

RIZZINI, C. T. Cactáceas: os segredos da sobrevivência. *Ciência hoje*, v. 30, p. 30-40, 1987.

SCHEINVAR, L. *Cactaceas*. Monography. Universidade Nacional Autonoma do México, Depto. Botanica. México, 1985.

SHARMA, S. K.; HUSAIN, M.; KUMAR, R.; SAMUELSON, L. A.; KUMAR, J.; WATTERSON, A. C.; VIRINDER, S. Biocatalytic routes toward pharmaceutically important precursor and novel polymeric systems. *Pure Appl. Chem.* v. 77, p. 209-226, 2005.

SHIMODA, K., HIRATA, T., NOMA, Y. Stereochemistry in the reduction of enones by the reductase from *Euglena gracilis* Z. *Phytochemistry*. v. 49, p. 49-53, 1998.

SHIMODA K., HIRATA, T. Biotransformation of enones with biocatalysts — two enone reductases from *Astasia longa*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 8, p. 255–264, 2000.

SHIMODA, K.; KONDO, Y.; NISHIDA, T.; HAMADA, H.; NAKAJIMA, N.; HAMADA, H. Biotransformation of thymol, carvacrol, and eugenol by cultures cells of *Eucalyptus perriniana*. *Phytochemistry*, v. 67, p. 2256-2261, 2006.

SHIMODA, K.; KONDO, Y.; AKAGI, M.; ABE, K.; HAMADA, H.; HAMADA, H. Glycosylation of tocopherols by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*. *Phytochemistry*. v. 68, p. 2678-2683, 2007.

SHIMODA. K.; KUBOTA, N.; HIRATA, T.; KONDO, Y.; HAMADA, H. Stereoselective reduction of 2-butenolides to chiral butanolides by reductases from cultured cells of *Glycine max*. *Tetrahedron Letters*, v. 48, 1345–1347, 2007.

SHIMODA, K; HAMADA, H; HAMADA, H. Glycosylation of hesperetin by plant cell cultures. *Phytochemistry*. v. 69, p. 1135-1140, 2008.

SUGA, T.; HIRATA T. Biotransformação of exogenous substrates by plant cell cultures. *Phytochemistry*, v. 20, p.2393-2406, 1990.

TORQUATO, E.F.B., PRIOLI, A.J., MACHADO, M.F.P.S. Differential alcohol dehydrogenase and malate dehydrogenase isozyme expression in long-term callus tissue cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Biochem. Genet.*, v. 33, p. 389-399, 1995.

TURBAK, A.F. Cellulose. In: Kirk-Othmer (Ed.), Encyclopedia of Chemical Technology. 3^a. ed. New York: Willey-Interscience, 1979.

VRIES, J. X.; MOYNA, P.; DIAS, V. Alcalóides cactos Uruguay. *Revista Latinoamericana Química*, v. 3, p. 21 -23, 1971.

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

YADAV, J. S.; NANDA, S.; REDDY, P. T.; RAO, A. B. Stereoselective synthesis of (R)-(-)-denopamine, (R)-(-)-tembamide and (R)-(-)-aegeline via asymmetric reduction of azidoketones by *Daucus carota* in aqueous medium. *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 12, p. 3381-3386, 2002b.

WALLACE R. S.; GIBSON, A. C. Evolution and systematics. In: Nobel PS (ed) Cacti: biology and uses. *University of California Press*, Berkeley, p. 1–22, 2002.

WEISS, J.; NERD, A.; MIZRAHI, Y. Flowering and pollination requirements in *Cereus peruvianus* cultivated in Israel. *Israel J. Plant Sci.* p. 149–158, 1994.

WHISTTER, R.L. Methods of Carbohydrate Chemistry. London: Ed. Academic Press., 1963.

APÊNDICE A

MEIO MS (MURASHIGE e SKOOG)

Macronutrientes

- Nitrato de amônio (NH_4NO_3) 1,650 mg/l= 20.6 ml/L
- Cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) = 440 mg/L
- Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) = 370 mg/L
- Fostato de potássio (KH_2PO_4) = 170 mg/L
- Nitrato de potássio (KNO_3) = 1,900 mg/L

Micronutrientes

- Ácido bórico (H_3BO_3) = 6.2 mg/L
- Cloreto de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) = 0.025 mg/L
- Sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) = 0.025 mg/L
- Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) = 27.8 mg/L
- Sulfato de manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) = 22.3 mg/L
- Iodeto de potássio (KI) = 0.83 mg/L
- Molibdato de sódio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) = 0.25 mg/L
- Sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) = 8.6 mg/L
- $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 37.2 mg/L

Aditivos

- Cinetina = 4 mg/L
- 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) = 4mg/L
- Sacarose = 30 g/L

APÊNDICE B

Revelador: *p*-anissaldeído.

Em balão volumétrico de 50 mL adicionar 0,5 mL de *p*-anissaldeído, 0,5 mL de ácido acético (P.A.) e 1,0 mL de ácido sulfúrico (P.A.). Completar o volume com etanol.

Revelador: 2,4-dinitrofenilhidrazina

Solução A: - 3 g de 2,4-dinitrofenilhidrazina

- 15 mL de ácido sulfúrico (P.A.)

solução B: - 20 mL de água destilada

- 70 mL de etanol 95°

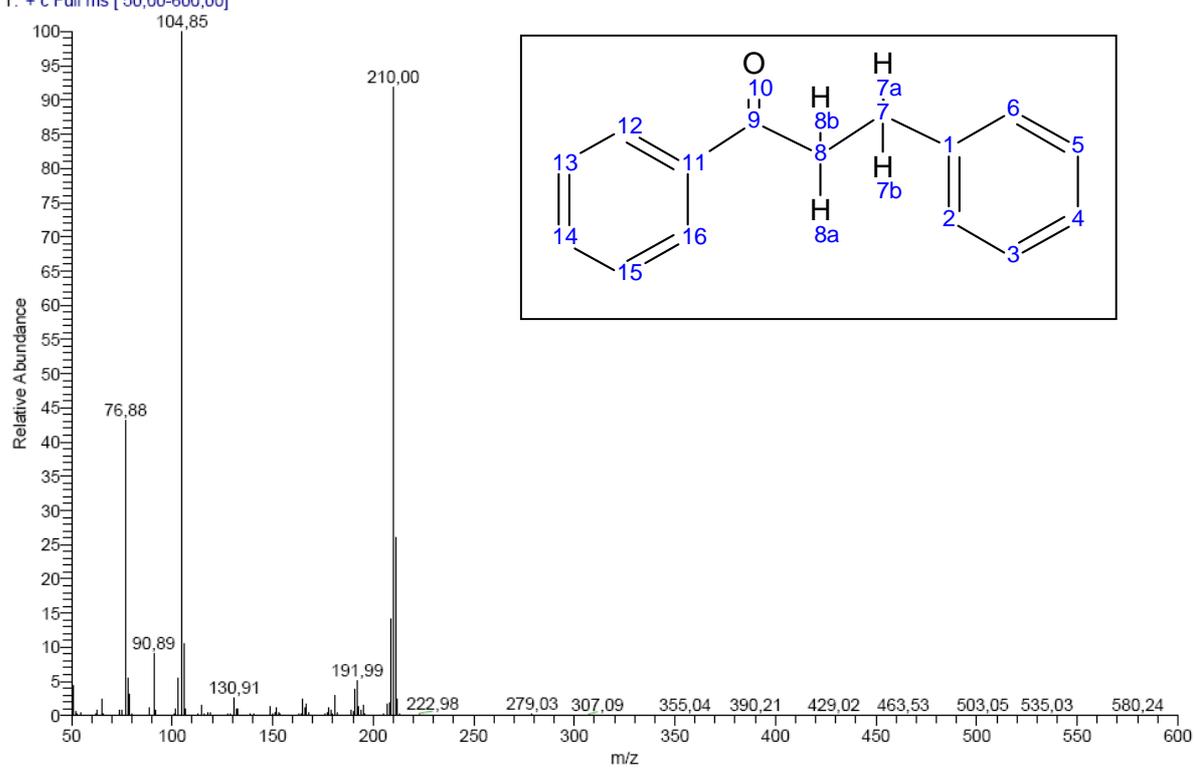
Misturar a solução A com a B sob agitação.

Solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,0

- Dissolver 0,908 g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) em água e diluir para 100 mL;
- Dissolver 2,38 g de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) em água e diluir para 100 mL;
- Misturar 38,9 mL da solução de KH_2PO_4 com 61,1 mL de Na_2HPO_4 .

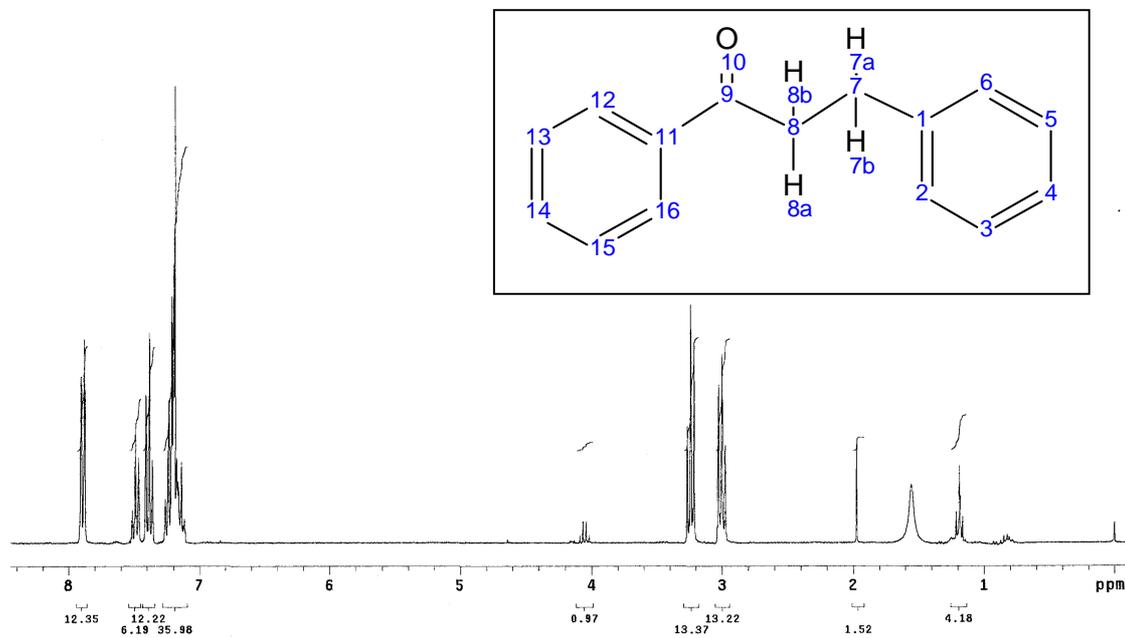
APÊNDICE C

RM03(biotransf) #26 RT: 0,58 AV: 1 NL: 1,07E9
T: + c Full ms [50,00-600,00]



C1: Espectro de massas do 1,3-difenil-propanona-1 (29).

APÊNDICE D

D1: Espectro de RMN ^1H do 1,3-difenil-1-propanona (29).

APÊNDICE E

RM02-Biotransformacao-C13

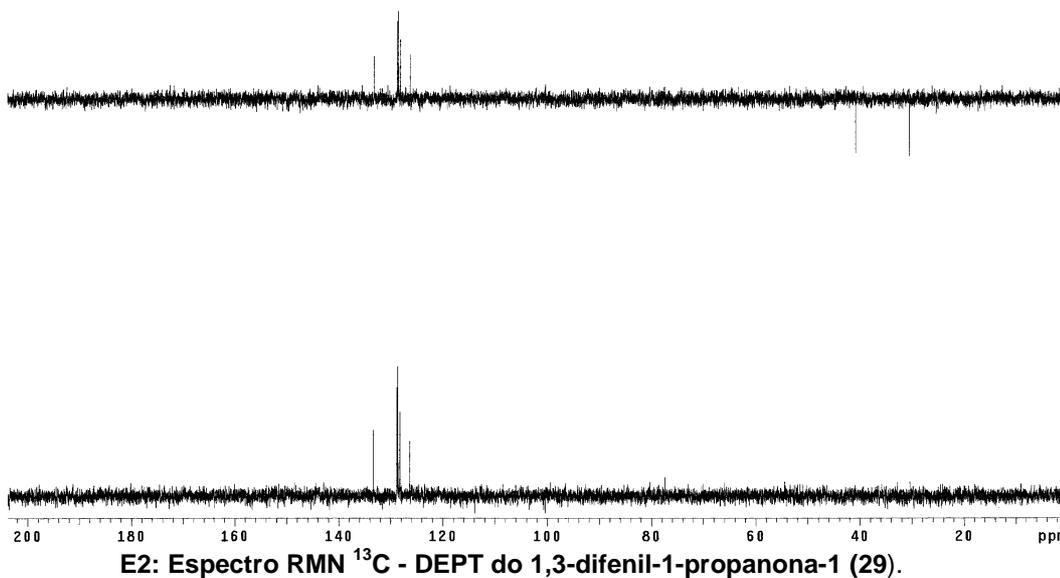
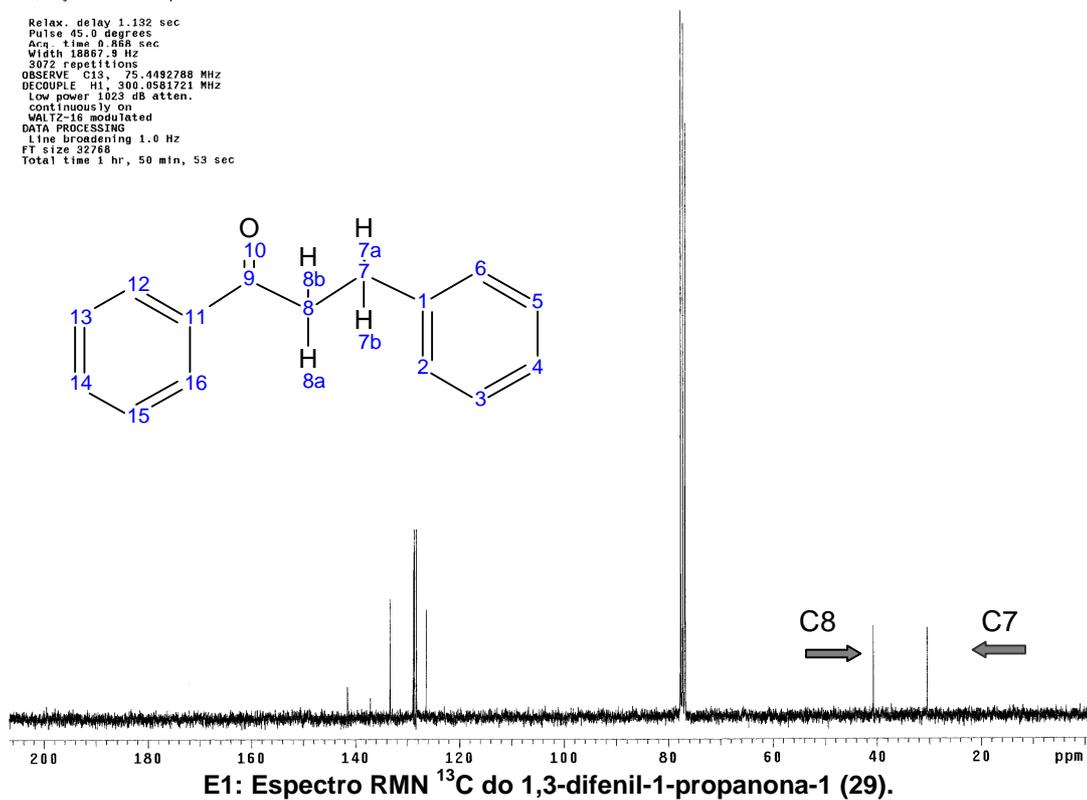
Pulse Sequence: s2pu1

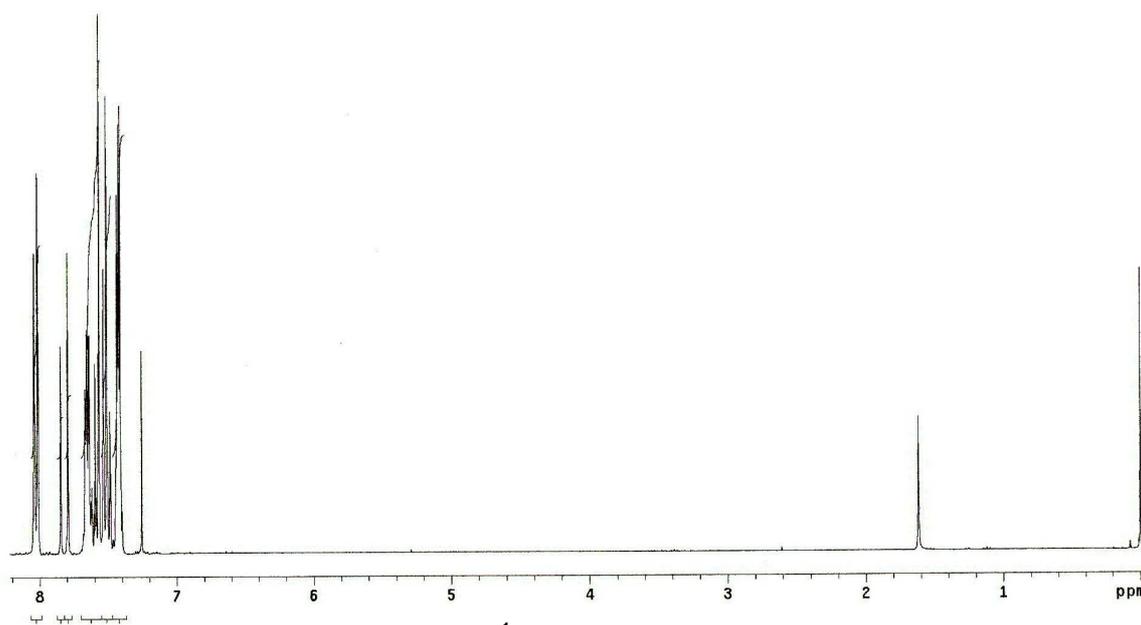
Solvent: CDCl3

Ambient temperature

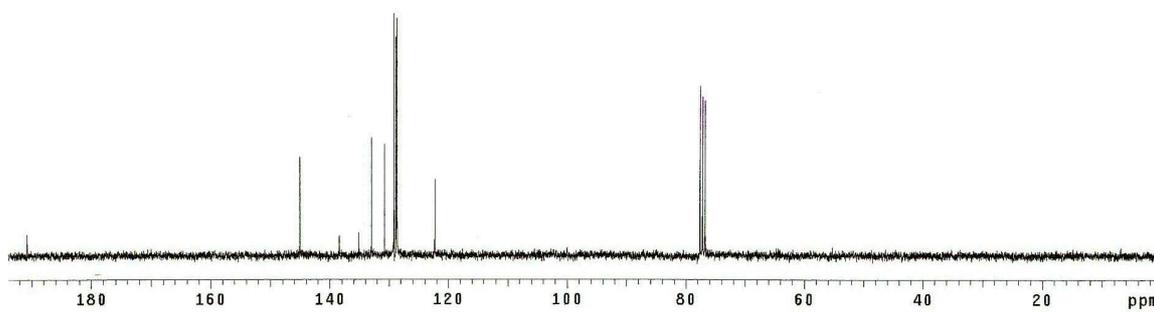
Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Relax. delay 1.132 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 0.868 sec
 Width 18867.8 Hz
 3072 repetitions
 OBSERVE C13, 75.4492788 MHz
 DECOUPLE H1, 300.0581721 MHz
 Low power 1023 dB atten.
 continuously on
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 32768
 Total time 1 hr, 50 min, 53 sec





E3: Espectro de RMN ^1H da *trans*-benzalacetofenona (22).



E4: Espectro RMN ^{13}C da *trans*-benzalacetofenona (22).