



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

EDIJANE MATOS SALES

**REGIOSSELETIVIDADE NA BIOTRANSFORMAÇÃO DE
FURANO E PIRANO CUMARINAS**

SALVADOR-BAHIA

2012

EDIJANE MATOS SALES

**REGIOSSELETIVIDADE NA BIOTRANSFORMAÇÃO DE
FURANO E PIRANO CUMARINAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Eudes da Silva Velozo

Co-orientadora: Dr^a. Tânia Fraga Barros

SALVADOR-BAHIA

2012

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde, SIBI - UFBA.

S163 Sales, Edijane Matos

Regiosseletividade na biotransformação de furano e pirano cumarinas/ Edijane Matos Sales – Salvador, 2012.

87 f.

Orientador: Prof. Dr. Eudes da Silva Velozo

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2012.

1. Biotransformação. 2. Biorredução. 3. Cumarinas. 4. Saccharomyces Cerevisiae. I. Velozo, Eudes da Silva. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 547.9



TERMO DE APROVAÇÃO

A dissertação:

REGIOSSELETIVIDADE NA BIOTRANSFORMAÇÃO DE FURANO E PIRANO CUMARINAS

Elaborada por:

EDIJANE MATOS SALES

e aprovada por todos os membros da Banca Examinadora foi aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia como requisito parcial à obtenção do título de

MESTRE EM BIOTECNOLOGIA

Salvador, Bahia, 06 de julho de 2012.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Eudes da Silva Velozo

Orientador
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque

Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Massuo Jorge Kato

Universidade de São Paulo

“Confiar é ter certeza que assim, como o sol, a cada dia sempre nascerão novas chances de brilhar.” (Autor Desconhecido)

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus queridos pais, Carmem e Nelson, e ao meu irmão Rodrigo pelo amor, carinho, compreensão e confiança.

Ao professor Dr. Eudes Velozo que durante estes seis anos e meio no LAPEMM contribuiu muito para o meu crescimento científico e profissional. Agradeço pela amizade, apoio, dedicação, paciência e por acreditar no meu potencial. Minha imensa gratidão pela oportunidade de realizar este trabalho juntos.

À minha co-orientadora professora Dr^a Tânia Barros pelos ensinamentos, dedicação e amizade. Agradeço muito pela contribuição neste trabalho e pelo acolhimento no LPMC.

À minha querida amiga Sandra, que me aceitou de braços abertos no LAPEMM. Muito obrigada pela co-orientação na iniciação científica e pelos ensinamentos que enriqueceram o meu crescimento científico.

À minha amiga Railda pela amizade e por toda colaboração nestes anos no LAPEMM.

As minhas amigas Jariana, Larissa e Thaíze que sempre estiveram ao meu lado e me incentivou em todos os momentos.

Aos amigos Douglas e Ygor pela amizade e pelos momentos de descontração.

Aos IC's voluntários Lorena, Nicolly, Thalisson e Thamires pela amizade e por terem aceitado minha tutoria.

Aos colegas do LAPEMM: Anderson, Bárbara, Cinara, Daniel, Erica, Lígia, Leandro, Lucas, Mônica, Paula, Rafael e Vanessa por todos os momentos.

Aos colegas do LPMC: Carolina, João, Manuela, Mariela, Renata, Talita e Vinícius pela amizade.

As técnicas do LPMC, Débora e Mira, pela colaboração.

Aos colegas do mestrado pela troca de conhecimentos e em especial a Ana Carolina Arraes.

Ao LABAREMN pelo fornecimento dos espectros de ressonância magnética nuclear, que contribuíram para os resultados neste trabalho.

Ao Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos da Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto, em especial a Izabel Cristina Turatti, pelo fornecimento dos espectros de massas.

Aos professores do programa de pós-graduação em Biotecnologia por transmitirem seus conhecimentos e experiências.

Á CAPES, FAPESB e CNPq pela bolsa e suporte financeiro concedido para este trabalho.

Á todas as pessoas que direta ou indiretamente me auxiliaram para o desenvolvimento deste trabalho.

Os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O uso de células e enzimas oriundas de micro-organismos como biocatalisadores é bem documentado na literatura. A redução de carbonilas em sistemas α , β insaturados é de grande interesse para a produção de fármacos e insumos para química fina. A literatura registra apenas a biorredução de carbonilas em sistemas α , β insaturados em sistemas abertos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de células íntegras de *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de pão) como catalisador na redução de carbonilas presentes em sistemas α , β insaturados cíclicos como cumarinas. Neste trabalho furano e pirano cumarinas, obtidas de *Zanthoxylum tingoassuiba* e *Metrodorea mollis* (Rutaceae) respectivamente, e padrão comercial de xantotoxina foram reduzidas com borohidreto de sódio (NaBH_4) e fermento de pão em sistema bifásico contendo solvente orgânico e tampão fosfato. O meio reacional foi extraído e os produtos obtidos foram purificados através de técnicas cromatográficas como CLAE, identificados e caracterizados por métodos espectroscópicos como IV e RMN ^1H e ^{13}C e espectroscopia de massa. Na redução com NaBH_4 , das furanocumarinas, foram identificados o 9-metoxi-3,5,6,7-tetrahidro-2*H*-furo[3,2-*g*]cromen-7-ol e 9-metoxi-6,7-dihidro-5*H*-furo[3,2-*g*]cromen-7-ol. Na redução com fermento de pão das furanocumarinas foi identificada apenas a 9-metoxi-6,7-dihidro-5*H*-furo[3,2-*g*]cromen-7-ol. A baixa solubilidade da piranocumarina não permitiu sua redução pela via química. Pela via biológica foi possível identificar o produto 3',4'-dihidrobrailina. O uso de células íntegras de *S. cerevisiae* na biotransformação de cumarinas é dependente da solubilidade do substrato em solvente não tóxico para a levedura. Este método se constitui numa alternativa para a redução de sistemas α , β insaturados cíclicos contendo carbonilas. Este estudo relata ainda, pela primeira vez, a ocorrência da piranocumarina brailina na espécie *Metrodorea mollis*.

Palavras-chave: biotransformação; biorredução; cumarinas; *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

The use of cells and enzymes from microorganisms as biocatalysts is well documented in the literature. The reduction of the carbonyl present in the α,β unsaturated systems is an important step for the production of pharmaceuticals and fine chemicals. The objective of this study was to evaluate the potential of the whole cell *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) as a catalyst in the reduction of coumarins. In this work, furan and pyran coumarins obtained from *Zanthoxylum tingoassuiba* and *Metrodorea mollis* (Rutaceae) respectively, and a standard xanthotoxin were reduced with sodium borohydride (NaBH_4) and baker's yeast in a biphasic system containing organic solvent and phosphate buffer. The reaction medium was extracted and the products purified by chromatographic techniques such as HPLC. Starting materials, products, and impurities were characterized and identified by spectroscopic methods as IR, ^1H and ^{13}C NMR and mass spectroscopy. In the reduction with NaBH_4 of the furanocoumarins were identified 9-methoxy-3,5,6,7-tetrahydro-2H-furo[3,2-g]chromen-7-ol and 9-methoxy-6,7-dihydro-5H-furo[3,2-g]chromen-7-ol. In furanocoumarins reduction with baker's yeast the product identified was the 9-methoxy-6,7-dihydro-5H-furo[3,2h]chromen-7-ol. The biotransformation of the pyranocoumarin was identified 3',4'-dihydrobraylin. The use of whole cells of *S. cerevisiae* in the biotransformation of coumarins is dependent of the solubility of the substrate in a non-toxic solvent to fungi. This method is an alternative to reducing carbonyl present in the α,β unsaturated systems. This study also reports for the first time, the occurrence of pyranocoumarin braylin in *Metrodorea mollis*.

Keywords: Biotransformation; biorreduction; coumarins; *Saccharomyces cerevisiae*

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADH – Álcool desidrogenase

CCD - Cromatografia em camada delgada

CDCl_3 - Clorofórmio deuterado

CG/EM - Cromatografia gasosa acoplado ao espectro de massa

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

CO - Monóxido de carbono

CP - Cromatografia preparativa

ER - Enolato redutase

FP - Fermento de pão

Hz - Hertz

IV - Infravermelho

J - Constante de acoplamento

K_2HPO_4 - Fosfato bibásico de potássio

MHz - Mega hertz

M. mollis - *Metrodorea mollis*

MMH- Extrato hexânico de *Metrodorea mollis*

m/z - Relação massa/carga

NaBH_4 - Borohidreto de sódio

nm - nanômetro

RMN ^1H - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN ^{13}C - Ressonância magnética nuclear de carbono

Z. tingoassuiba - *Zanthoxylum tingoassuiba*

TR - Tempo de retenção

δ - Deslocamento químico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação com o fermento de pão biológico (FP) e as enzimas responsáveis pela atividade catalítica.....	22
Figura 2 - Produção da L-carnitina através do <i>S. cerevisiae</i>	22
Figura 3 - Redução de cetona por NaBH ₄	23
Figura 4 - Biorredução de carbonil assimétricos usando o FP.....	24
Figura 5 - Biorredução do (S)-2-etil-hexan-2-enal por FP.....	24
Figura 6 - Cumarinas encontradas no gênero <i>Zanthoxylum</i>	27
Figura 7 - Biogenética de cumarinas e derivados.....	27
Figura 8 - Exemplos de estruturas das principais cumarinas.....	28
Figura 9 - Estrutura da composição química do óleo essencial de <i>Z. tingoassuiba</i>	30
Figura 10 - Estruturas das possíveis reduções com FP da furanocumarina isopimpineline.....	31
Figura.11. - CCD dos produtos das reações com FP e NaBH ₄ da xantotoxina.....	46
Figura 12 - Cromatograma observado em 365 nm da xantotoxina padrão.....	47
Figura 13 - Cromatograma observado em 365 nm do produto da redução com FP da xantotoxina.....	47
Figura 14 - Cromatograma observado em 365 nm do produto da reação com NaBH ₄ da xantotoxina.....	47
Figura 15 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da xantotoxina	49
Figura 16 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do produto da reação com NaBH ₄ da xantotoxina.....	50
Figura 17 - Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) do produto da reação com NaBH ₄ da xantotoxina.....	50
Figura 18 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do produto da reação com FP da xantotoxina.....	51
Figura 19 - Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) do produto da reação com FP da xantotoxina.....	51
Figura 20 - Cromatograma do produto da redução com NaBH ₄ da xantotoxina...	52

Figura 21- Espectro de massa do produto NaBH ₄ no TR 24,68 minutos.....	53
Figura 22 - Espectro de massa do produto NaBH ₄ no TR 25,40 minutos.....	53
Figura 23 - Espectro de massa do produto NaBH ₄ no TR 26,99 minutos.....	53
Figura 24 - Cromatograma do produto da redução com FP da xantotoxina.....	54
Figura 25 - Espectro de massa do produto FP no TR 26,86 minutos.....	54
Figura 26 - Constituintes químicos isolados de <i>Z. tingoassuiba</i>	55
Figura 27 - CCD dos produtos das reações com FP e NaBH ₄ das furanocumarinas.....	56
Figura 28 - Espectro no Infravermelho do material de partida e do produto da reação com FP e NaBH ₄ das furanocumarinas.....	57
Figura 29 - Cromatograma observado em 254 nm das furanocumarinas.....	58
Figura 30 - Cromatograma observado em 254 nm do produto da reação com FP das furanocumarinas.....	58
Figura 31 - Cromatograma observado em 254 nm do produto da reação com NaBH ₄ das furanocumarinas.....	58
Figura 32 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do produto da reação com NaBH ₄ das furanocumarinas.....	60
Figura 33 - Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) do produto da reação com NaBH ₄ das furanocumarinas.....	60
Figura 34 - Espectro de RMN ¹³ C (125MHz, CDCl ₃) do produto da reação com FP das furanocumarinas.....	61
Figura 35 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do produto da reação com FP das furanocumarinas.....	61
Figura 36 - Estruturas obtidas da reação de biotransformação com o FP.....	62
Figura 37 - Cromatograma do produto da redução por NaBH ₄ das furanocumarinas.....	62
Figura 38 - Espectro de massa do produto NaBH ₄ no TR 26,83 minutos.....	63
Figura 39 - Espectro de massa do produto NaBH ₄ no TR 30,38 minutos.....	63
Figura 40- Cromatograma do produto da redução FP das furanocumarinas...	64
Figura 41 - Espectro de massa do produto FP no TR 25,55 minutos.....	64
Figura 42 - Espectro de massa do produto FP no TR 25,81 minutos.....	64
Figura 43 - Espectro de massa do produto FP no TR 26,24 minutos.....	65
Figura 44 - Espectro de massa do produto FP no TR 29,97 minutos.....	65

Figura 45 - Espectro de massa do produto FP no TR 36,55 minutos.....	65
Figura 46 - CCD dos produtos das reações com FP e NaBH ₄ da piranocumarina.....	66
Figura 47 - Cromatograma observado em 365 nm da piranocumarina.....	67
Figura 48 - Cromatograma observado em 365 nm do produto da reação com FP da piranocumarina.....	67
Figura 49 - Cromatograma observado em 365 nm do produto da reação com NaBH ₄ da piranocumarina.....	67
Figura 50 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da piranocumarina.....	69
Figura 51 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do produto da reação com NaBH ₄ da piranocumarina.....	70
Figura 52 - Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) do produto da reação com NaBH ₄ da piranocumarina.....	70
Figura 53 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do produto da reação com FP da piranocumarina.....	71
Figura 54 - Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) do produto da reação com FP da piranocumarina.....	71
Figura 55 - Cromatograma da fração de MMH.....	73
Figura 56 - Espectro de massa da fração de MMH no TR 26,85 minutos.....	73
Figura 57 - Espectro de massa da fração de MMH no TR 27,23 minutos.....	73
Figura 58 - Espectro de massa da fração de MMH no TR 30,49 minutos.....	74
Figura 59 - Espectro de massa da fração de MMH no TR 31,14 minutos.....	74
Figura 60 - Cromatograma do produto da redução com NaBH ₄ da piranocumarina.....	75
Figura 61 - Espectro de massa do produto NaBH ₄ no TR 30,43 minutos.....	75
Figura 62 - Espectro de massa do produto NaBH ₄ no TR 30,51 minutos.....	75
Figura 63 - Cromatograma do produto da redução com FP da piranocumarina.....	76
Figura 64 - Espectro de massa do produto FP no TR 28,52 minutos.....	76
Figura 65 - Espectro de massa do produto FP no TR 30,33 minutos.....	76
Figura 66 - Espectro de massa do produto FP no TR 30,43 minutos.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens do uso das enzimas isoladas.....	20
Tabela 2 - Composição do óleo volátil das folhas de <i>Z. tingoassuiba</i>	31
Tabela 3 - Dados de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da xantotoxina padrão e dos produtos das reações com FP e NaBH ₄ comparado com a literatura.....	49
Tabela 4 - Dados de RMN ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) da brailina e dos produtos das reações com FP e NaBH ₄ (125MHz, CDCl ₃).....	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Substâncias isoladas nas espécies <i>M. flavida</i>	32
Quadro 2 - Substâncias isoladas nas espécies <i>M. nigra</i>	35
Quadro 3 - Estrutura do produto obtido da reação com FP da brailina.....	77

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Obtenção do extrato das folhas de <i>Z. tingoassuiba</i> (ZT).....	40
Esquema 2 - Obtenção dos extratos hexânico e metanólico das raízes de <i>M. mollis</i>	42
Esquema 3 - Fragmentação da xantotoxina.....	54
Esquema 4 - Proposta de fragmentação da brailina.....	78

SUMÁRIO

1. Introdução	18
1.1 Considerações gerais.....	18
1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
1.3 Via química reações com NaBH ₄	23
1.4 Sistemas α,β -insaturados.....	23
1.5 Cumarinas.....	25
1.6 Família Rutaceae.....	28
1.6.1 <i>Zanthoxylum tingoassuiba</i>	29
1.6.2 <i>Metrodorea mollis</i>	32
2. Justificativa e Objetivos	36
2.1 Justificativa.....	36
2.2 Objetivos.....	36
2.2.1 Objetivo geral.....	36
2.2.2 Objetivo específico.....	36
3. Materiais e Métodos	38
3.1 Solventes, Reagentes, Fase estacionária e Biocatalisador.....	38
3.1.1 Solventes.....	38
3.1.2 Reagentes.....	38
3.1.3 Fase Estacionária.....	38
3.1.4 Biocatalisador	39
3.2 Equipamentos.....	39
3.3 Obtenção das furanocumarinas.....	40
3.4 Obtenção da piranocumarina.....	41
3.5 Procedimento para a redução das cumarinas mediada por NaBH ₄	42
3.6 Biotransformação das cumarinas mediada por FP.....	43
3.7 Procedimento de identificação.....	43
3.7.1 Condições cromatográficas do CG/EM.....	43
3.7.2 Condições cromatográficas do CLAE.....	44
4. Resultados e Discussões	45
4.1 Efeito do solvente.....	45

4.2 Reduções mediadas por FP e NaBH ₄	46
4.2.1 Padrão xantotoxina.....	46
4.2.1.1 Análise por CCD.....	46
4.2.1.2 Análises dos cromatogramas por CLAE.....	46
4.2.1.3 Análises dos espectros de RMN.....	48
4.2.1.4 Análises dos cromatogramas de íons totais dos produtos da redução da xantotoxina.....	52
4.2.2 Furanocumarinas do decocto de <i>Z. tingoassuiba</i>	55
4.2.2.1 Análise por CCD.....	55
4.2.2.2 Análise do espectro no IV.....	56
4.2.2.3 Análises dos cromatogramas por CLAE.....	57
4.2.2.4 Análises dos espectros de RMN.....	59
4.2.2.5 Análise dos cromatogramas de íons totais dos produtos da redução das furanocumarinas.....	62
4.2.3 Piranocumarina.....	66
4.2.3.1 Análise por CCD.....	66
4.2.3.2 Análises dos cromatogramas por CLAE.....	66
4.2.3.3 Análises dos espectros de RMN.....	68
4.2.3.4 Análises dos cromatogramas de íons totais dos produtos da redução da piranocumarina.....	72
5. Conclusões.....	79
6. Perspectivas.....	80
Referências.....	81

Introdução

1.1 Considerações gerais

A biotecnologia tem sua origem na produção de alimentos como pão, cerveja e vinho através da fermentação. Este processo conhecido desde a antiguidade por diversas culturas foi o único método para obtenção de bebidas alcóolicas e derivados do leite (SERRA et al, 2005). A partir de 1858, Louis Pasteur, estabeleceu as bases para o entendimento do papel dos microrganismos como promotores das biotransformações (PARALES et al, 2002).

A biotransformação se define como sistemas biológicos para produzirem mudanças químicas de compostos naturais ou sintéticos (SIMEO et al, 2009). O desenvolvimento da biocatálise possibilitou a aplicação de métodos em escala comercial, assim foi possível um maior crescimento, principalmente, na indústria de química fina (STRAATHOF et al, 2002). A aplicação de uma tecnologia econômica, como a biotransformação, foi necessária para a produção de novos produtos para a química fina, agropecuária e farmacêutica (FUJIWARA et al, 2011).

A produção biotecnológica fornece uma alternativa viável para a obtenção de compostos usando substratos simples (KHOR et al, 2011). Com o uso de vias sintéticas e matérias-primas baratas para uma variedade de novas moléculas interessantes (NESTL et al, 2011). As reações catalisadas são enantiosseletivas e regioseletivas, além de serem realizadas em temperatura ambiente e pressão atmosférica, evitando a utilização de condições extremas e não havendo a necessidade de proteção aos grupos funcionais reativos, que poderiam causar problemas como racemização, isomerização, rearranjo e epimerização (PATEL, 2008).

Devido as suas aplicações ocorreu um crescimento nos últimos anos de publicações, principalmente, na área farmacêutica no uso de biocatalisadores (THOMAS et al, 2002). O uso da biotransformação para se obter produto com um único enantiômero é economicamente viável do que as reações químicas tradicionais (SIMEO et al, 2009). Assim, tornou-se uma ferramenta alternativa

na modificação estrutural de complexos, principalmente, obtidos de produtos naturais (MARUMOTO et al, 2011)

1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *S. cerevisiae* é um dos modelos de organismos eucarióticos mais estudados e isso se deve ao melhor conhecimento de sua fisiologia, genética e bioquímica favorecendo para a sua aplicação industrial (HUANG et al, 2008). Além disso, a facilidade de acesso e do baixo preço contando com o longo histórico de sua utilização segura na indústria de alimentos tornando-se a escolha ideal para conduzir reações de oxidação-redução e conseqüentemente aplicação química para conversões (CHIN-JOE et al, 2001; NASCIMENTO et al, 2002; PSCHEIDT, 2008).

Algumas vantagens na utilização de enzimas das células íntegras *S. cerevisiae* nas reações (HUDLICKY et al, 2009; FABER, 2011):

- Não é necessário reciclar o cofator
- Tolerância a uma variedade de substratos estruturalmente diversos
- Condições de reações suaves e “química verde”
- Facilidade na manipulação
- Não é tóxico
- Alto grau de regio, estéreo e enantiosseletividade
- As enzimas e cofatores são bem protegidos dentro do seu ambiente celular
- As células imobilizadas podem ser novamente usadas

Devido a grande variedade de atividade enzimática presente nas células íntegras apresenta algumas desvantagens (NASCIMENTO et al, 2002; HUDLICKY et al, 2009; FABER, 2011):

- Baixa seletividade e produtividade, já que o mesmo substrato pode sofrer cinéticas e velocidades de conversão diferentes

- Necessidade de cofatores ou reciclagem dos mesmos, quando utilizar para reações de oxirredução
- A grande quantidade de biomassa presente no meio da reação provoca baixo rendimento e muitos subprodutos
- Pouca solubilidade em solventes orgânicos
- As células imobilizadas tem baixa atividade enzimática

A aplicação de enzimas isoladas foi implantada na indústria para resolver as dificuldades com o uso de células integras. No entanto, apresentam também têm algumas vantagens e desvantagens conforme a Tabela 1 (FABER, 2011):

Tabela 1: Vantagens e desvantagens do uso das enzimas isoladas

Tipo	Vantagens	Desvantagens
Geral	Melhor produtividade, maior tolerância de concentração.	Necessário reciclar o cofator
Dissolvidas em água	Alta atividade enzimática	Partes das reações são realizadas, substratos lipofílicos são insolúveis.
Suspensas em solventes orgânicos	Facilidade para trabalhar, substratos são solúveis, as enzimas são recuperadas.	Baixa atividade
Imobilizadas	As enzimas são recuperadas facilmente	Perda da atividade enzimática

Existem no mercado, aproximadamente, 3000 enzimas conhecidas e estas são usadas em diversas reações (HUDLICKY et al, 2009). As enzimas são classificadas em seis grupos principais:

- Oxidoredutases: catalisam as reações envolvendo transferência de elétron como em ligações duplas e oxidação de álcoois

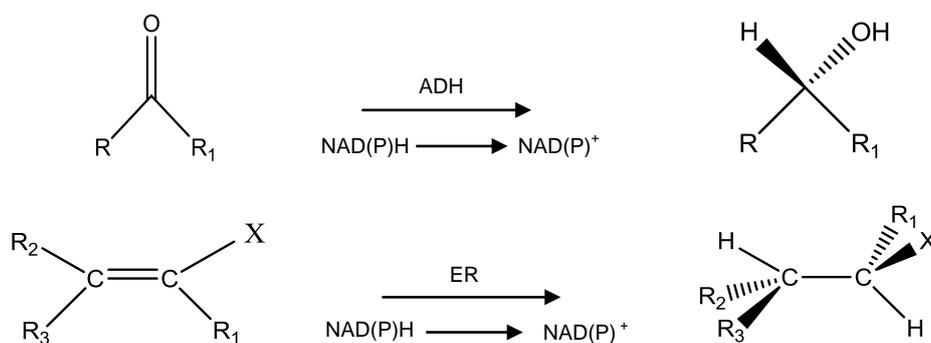
- Hidrolases: catalisam por hidrólise como de grupos ésteres
- Liases: reações catalisadas por adição ou remoção de grupos envolvendo ligações como C=C, C=O e C=N
- Ligases: reações de formação catalisadas a partir de ligações já existentes e clivagem de ligações C-N, C-O, C-S
- Transferases: reações envolvendo transferência de diversos grupos funcionais como cetona, aldeído e amina
- Isomerases: catalisam reações de isomerização como olefinas e racemização

O fermento de pão, *S. cerevisiae*, pode catalisar diversas reações como condensação, ciclização, redução e oxidação (PEREIRA, 1995). A aplicação mais usada é, principalmente, na catálise de reações em estruturas contendo grupos carbonílicos e ou ligações duplas carbono-carbono, isoladas ou conjugadas. A enzima responsável pela atividade catalítica nas reduções de carbonilas é a álcool desidrogenase (ADH) e das ligações duplas carbono-carbono a enolato redutase (ER), Figura 1 (KHOR et al, 2011).

Com a aplicação das enzimas a partir de células íntegras se tornou viável a produção de fármacos com o uso menor quantidade de rotas sintéticas. Como por exemplo, *Escherichia coli* e *Cândida boidinii*, o uso de células recombinantes liofilizadas. Como fonte das enzimas fenilalanina e desidrogenase de formiato permitindo a produção do anti-hipertensivo utilizado para inibir a enzima conversora de angiotensina, omapatrilat® (PATEL, 2001; ZAKS, 2001). A produção do fármaco tamiflu®, um inibidor da neuraminidase, faz o uso de um intermediário, o ácido chiquimico, obtido através das enzimas *E. coli* recombinante (PANKE et al, 2005).

Outro micro-organismo aplicado na para produção de fármacos com menores etapas sintéticas para a produção de vacinas para hepatite B e contra papiloma humana vírus (HPV) é o *S. cerevisiae* (ROBERTS et al, 2011). A L-carnitina é outro fármaco desenvolvido a partir de células íntegras de *S. cerevisiae*, Figura 2. Esta droga é aplicada na prevenção do infarto agudo do miocárdio obtida em duas etapas sintéticas na indústria farmacêutica (BEATRIZ et al, 2005).

As reações de redução catalisadas por *S. cerevisiae* apresentam boa estereo e enantiosseletividade. Podendo ser aplicadas na redução de carbonilas isoladas ou conjugadas, onde podem atuar as enzimas ADH e ER. Estruturas contendo sistemas alfa-beta insaturado são amplamente distribuídas em produtos naturais de origem vegetal como, por exemplo, as cumarinas.



NAD(P)H, forma reduzida; NAD(P)⁺, forma oxidada; ADH, álcool desidrogenase; ER, enolato redutase; X, substituinte retirador de elétron

Figura 1: Reação com o fermento de pão biológico (FP) e as enzimas responsáveis pela atividade catalítica

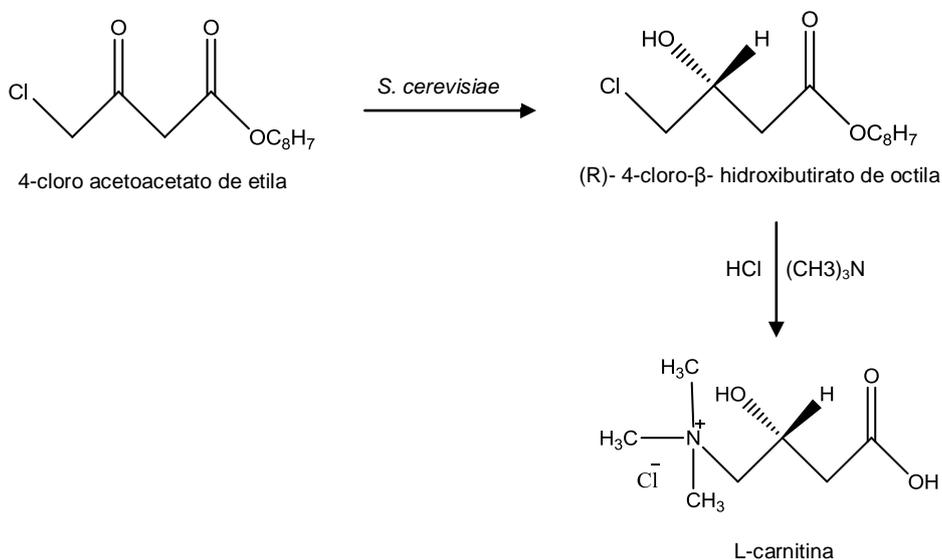


Figura 2: Produção da L-carnitina usando o micro-organismo *S. cerevisiae*

1.3 Via química reações com NaBH₄

O borohidreto de sódio (NaBH₄) é um agente redutor tradicional muito usado na produção de compostos inorgânicos e orgânicos. Sendo muito utilizado na redução de aldeídos e cetonas e tendo como principal vantagem o fato de ser usado nas reações com solventes práticos (ZEYNIZADEH et al, 2005).

O NaBH₄ atua como um nucleófilo protonando simultaneamente o oxigênio do grupo carbonila e o solvente. Quando a cetona é exposta ao íon tetraidretoborato ocorre a doação de um hidrogênio ao carbono do grupo carbonílico, que está com deficiência eletrônica. O solvente (metanol ou etanol) perde um hidrogênio do grupo (OH⁻) dando origem a um metóxido que se combina com os fragmentos do boro formando o metóxido borato de sódio, Figura 3 (SILVA et al, 1996).

O reagente NaBH₄ pode ser substituído por enzimas desidrogenases que fazem o papel de redutoras nas ligação dupla carbono-carbono e a carbonila (PEREIRA, 1995).

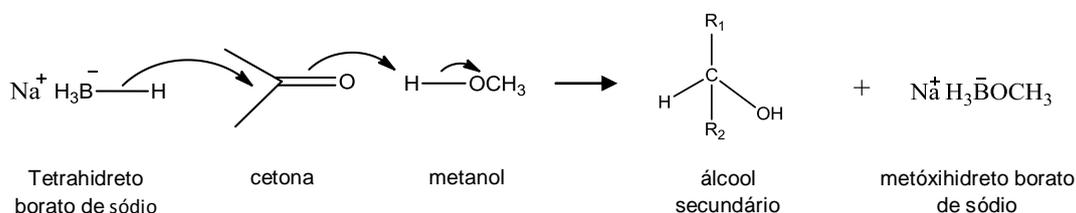
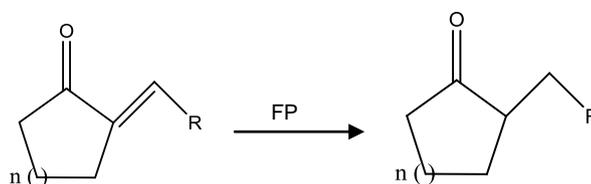


Figura 3: Redução de cetona por NaBH₄

1.4 Sistemas α,β-insaturados

As reações utilizando compostos carbonílicos α,β-insaturados são empregados como etapas chaves na produção de diversas moléculas. A redução de aldeídos e cetonas pode formar em álcool saturado ou especificamente nas carbonilas pode levar a formação de álcool alílico. A aplicação de microorganismos em reduções nos sistemas α,β insaturados é mais frequente para a obtenção de produtos quirais (MACHADO et al, 2006).

Stuermer e colaboradores (2007) estudaram a redução assimétrica empregando o fermento de pão (FP) e pode demonstrar a regioseletividade em cetonas cíclicas através da enzima enolato redutase, Figura 4.



R= cadeia alquila curta; n=1,2

Figura 4: Biorredução de cetonas cíclicas

Outro exemplo da redução de compostos carbonílicos α,β -insaturados é apresentado no trabalho de Huang e colaboradores (2005), Figura 5. A síntese do (S)-2-etil-hexan-1-ol através da biorredução usando FP no substrato 2-etil-hexan-2-enal em meio aquoso e obtendo como produtos formados o álcool saturado e o álcool alílico.

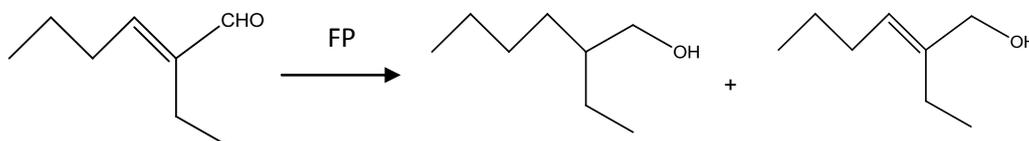


Figura 5: Biorredução do (S)-2-etil-hexan-2-enal por FP

A estrutura das cumarinas apresenta carbonila α,β -insaturados e pode ser usadas para as reações de redução, pois oferece opções de ataque para as enzimas de FP. Abaixo, Figura 6, são exemplos de cumarinas encontradas em espécies de Rutaceae como *Zanthoxylum tingoassuiba*, que podem ser usadas para biorreduções (HOHLEMWERTGER, 2010).

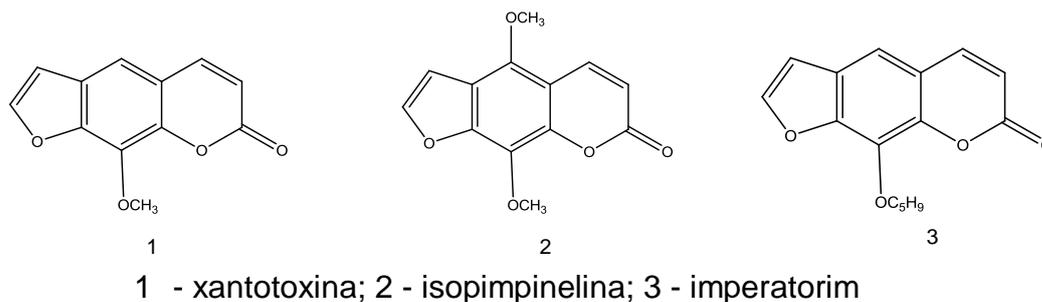


Figura 6: Cumarinas encontradas no gênero *Zanthoxylum*

1.5 Cumarinas

As cumarinas são fenilpropanóides encontrados em diversos clados de plantas que compartilham uma estrutura química comum 2H-1-benzopirano-2-ona. São lactonas do ácido orto-hidróxi-cinâmico e a maioria são substituídas na posição 7 oxidada. Seus metabólitos secundários são produzidos pela rota do ácido chiquímico derivada do metabolismo da fenilalanina (SIMÕES et al, 2010).

O ácido para-hidroxi-cinâmico é hidroxilado na posição C2' (orto-hidroxilação). O derivado orto-hidroxilado sofre isomerização fotocatalizada da ligação dupla (E-Z), espontaneamente, o isômero Z, lactoniza-se produzindo a umbeliferona. Assim, a prenilação do anel benzênico nas posições 6 ou 8 do derivado 7-hidroxi-cumarina inicia a biogênese das furano e pirano cumarinas. A ciclização dos derivados 6 ou 8 isoprenilcumarina ocorre por ataque nucleofílico do grupo hidroxila em C7 ao epóxido formado pela oxidação da ligação dupla do resíduo isopentenila. O produto será o hidróxi-isopropil-di-hidrofuranocumarina ou hidróxi-dimetil-di-hidropiranocumarina, de acordo com a orientação do ataque nucleofílico, Figura 7 (SIMÕES et al, 2010).

As cumarinas têm importantes atividades biológicas tendo propriedades antioxidante, anti-inflamatório, anticoagulante, antiviral e anticancerígeno (AGUIRRE-PRANZONI et al, 2011).

Ocorrem principalmente nas famílias Asteraceae, Fabaceae, Moraceae, Apiaceae e Rutaceae ocorrendo na forma livre ou como glicosídeos. Dentre estas famílias, a segunda ordem em ocorrência de cumarinas é a família Rutaceae, que apresenta uma grande diversidade e produz de quatro a sete

tipos de cumarinas, sendo considerados verdadeiros marcadores quimiotaxonômicos. Existem quatro classes principais de cumarinas a simples (umbeliferona, ostol), cumarina dimérica (dicumarol), piranocumarina (xantiletina) e furanocumarina (psoraleno, xantotoxina, isopimpinellina) conforme Figura 8 (RIBEIRO et al, 2002).

Normalmente, as cumarinas são encontradas em misturas formando cristais incolores ou amarelos. A extração ácido-base pode ser em meio alcalino, no qual ocorre à abertura do anel lactônico, proporcionando a obtenção de substâncias na forma de sais solúveis em água e a relactonização ocorre por acidificação do meio aquoso. Na cromatografia em camada delgada suas manchas aparecerem em cores diversas como amarelo, azul, roxa, sendo, são realçadas pelo vapor de amônia e visualizadas por luz ultravioleta em comprimento de onda característico 300-400 nm e sendo fortemente influenciado pela natureza e posição dos grupos substituintes (SIMÕES et al, 2010; RAO, 2012).

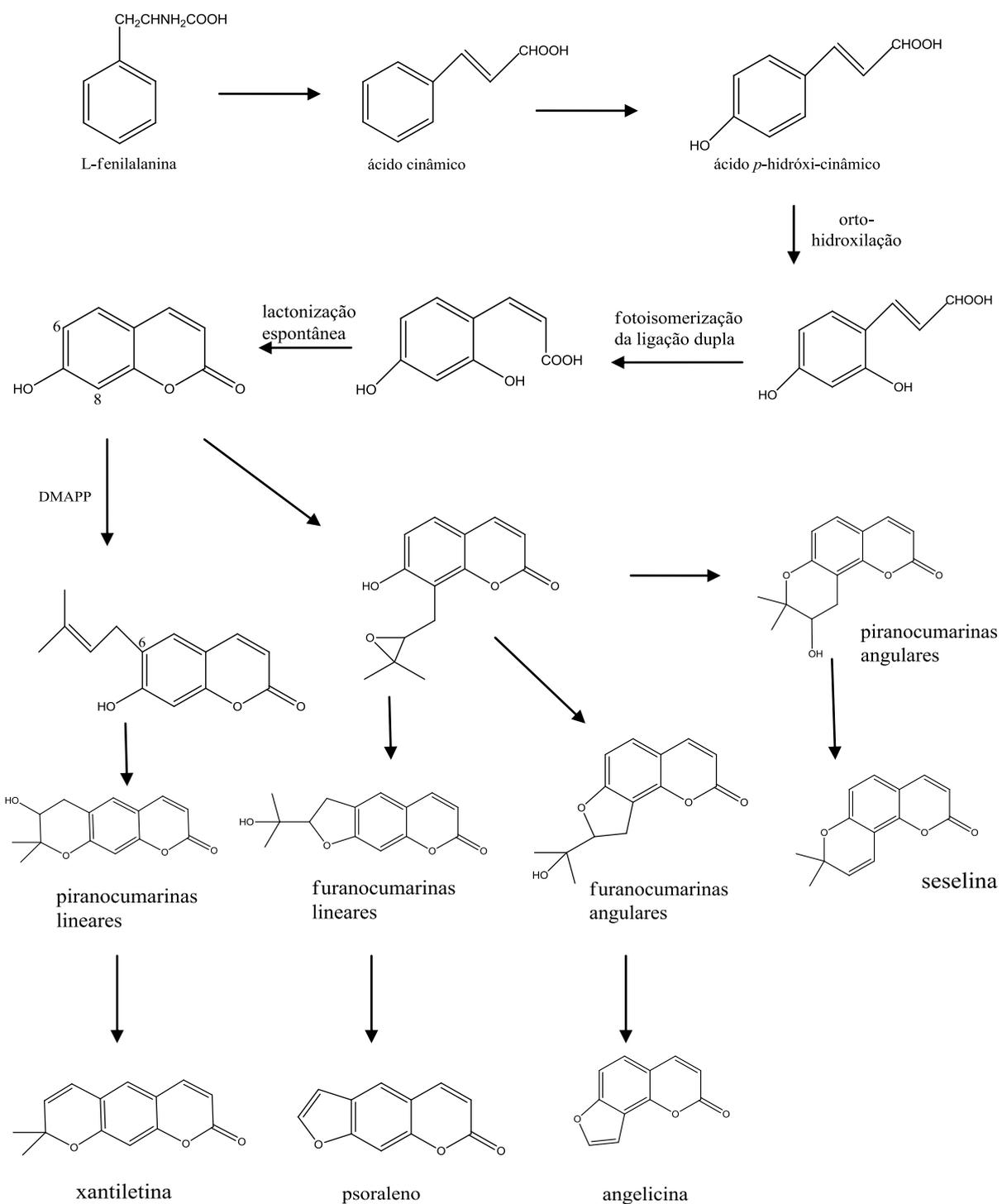


Figura 7: Biogenética de cumarinas e derivados

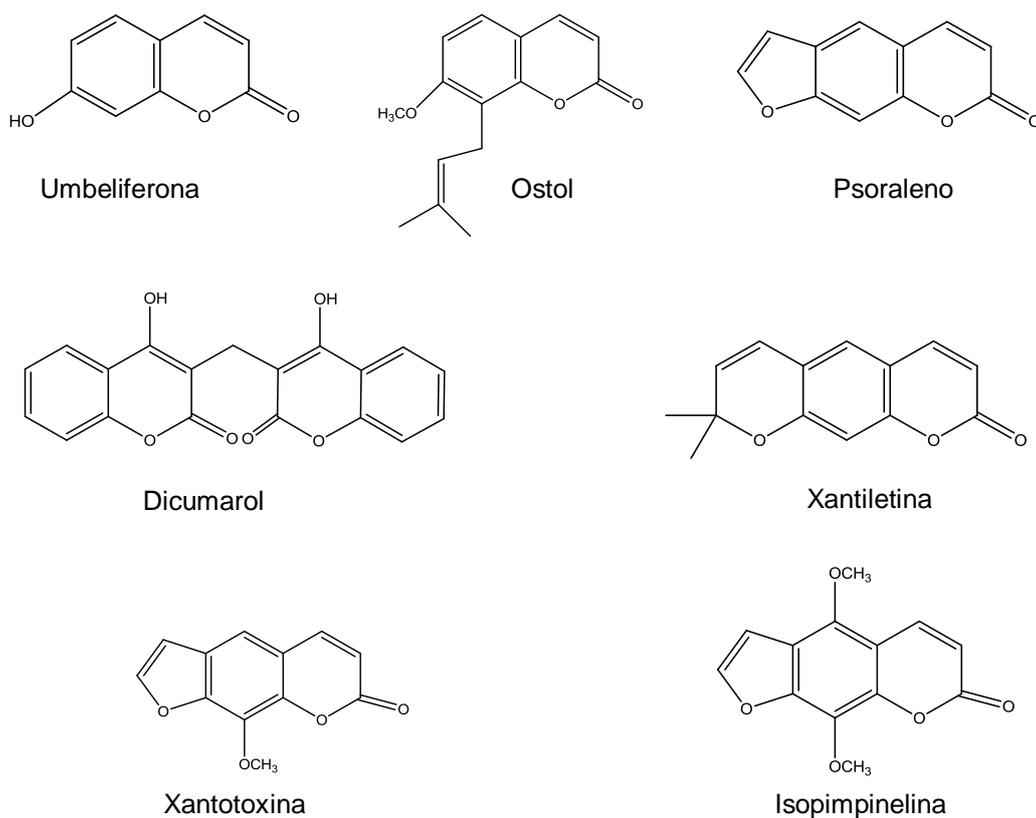


Figura 8: Exemplos de estruturas das principais cumarinas

1.6 Família Rutaceae

A família Rutaceae é composta por aproximadamente 150 gêneros e cerca de 1600 espécies distribuídas pelas regiões temperadas e tropicais no mundo. Possui uma composição química bastante diversificada sendo capaz de produzir alcalóides e fenilpropanóides como: cumarinas, lignanas, flavonóides, limonóides e terpenóides (WATERMAN et al, 1983). Então, muitos estudos quimiotaxonômicos têm sido realizados devido a grande ocorrência de metabólitos restritos (HOHLEMWERTGER, 2010).

No Brasil, a família Rutaceae possui 32 gêneros com 154 espécies e tem como grande representante o gênero *Zanthoxylum* (PIRANI, 1999). Este gênero possui importância etnobotânica, fitoquímica e biológica é frequentemente usado como fonte de matéria-prima para produtos farmacêuticos e cosméticos. Os alcalóides e cumarinas são os principais

constituintes do gênero sendo atribuído um amplo espectro de atividades biológicas com aplicações terapêuticas (VELOZO, 1995; NEGI et al, 2011).

As espécies pertencentes ao gênero são muito utilizadas na medicina popular para tratamento anti-inflamatória, antiparasitária, antiespasmódico e antimalárico (JULLIAN et al, 2006; SILVA et al, 2008; PENELUC et al, 2009; SILVA et al, 2010). Dentre o gênero *Zanthoxylum*, que apresenta potencial biológico e constituinte químico diverso se encontra na espécie *Z. tingoassuiba*.

1.6.1 *Zanthoxylum tingoassuiba*

A espécie *Z. tingoassuiba* A. St. Hil. é uma das 710 plantas medicinais presentes na 1ª. edição da Farmacopéia Brasileira (1926) e foi estudada pela primeira vez em 1825 por Gottlieb e Antonaccio. Esta distribuída nos estados Rio de Janeiro, Goiás, São Paulo, Pernambuco, Maranhão, Minas Gerais, Amazonas e Bahia, no entanto, encontra-se em risco de extinção sem o estudo completo de seus metabólitos (PIRANI, 1999).

Esta espécie também conhecida popularmente como limão bravo, laranjeira-do-mato, casca preciosa e limãozinho é usado na medicina popular como antiespasmódico, anti-hipertensivo, analgésico e diurético. Estudos anteriores evidenciaram a presença de metabólitos como alcalóides, triterpenos e cumarinas (SILVA et al, 2008).

Nas folhas foram realizadas análises do óleo essencial por Detoni e colaboradores (2009) apresentando o seu potencial antimicrobiano e antifúngico, além da composição química (Figura 9 e Tabela 2). Nos frutos e caule de *Z. tingoassuiba* foi possível a identificação de cumarinas o-prenilada e furanocumarinas lineares mais frequentemente associado com as Rutaceae mais primitivas, as proto-Rutaceae (SILVA et al, 2008). Além disso, na água da hidrodestilação das folhas foi encontrada as furanocumarinas (xantotoxina e isopimpinellina) e estas foram usadas para estudo de atividade citotóxica contra células GL-15 in vitro obtendo resultado positivo para o desenvolvimento de novos agentes anticancerígenos (HOHLEMWERGER, 2010; EL-BACHA et al, 2010).

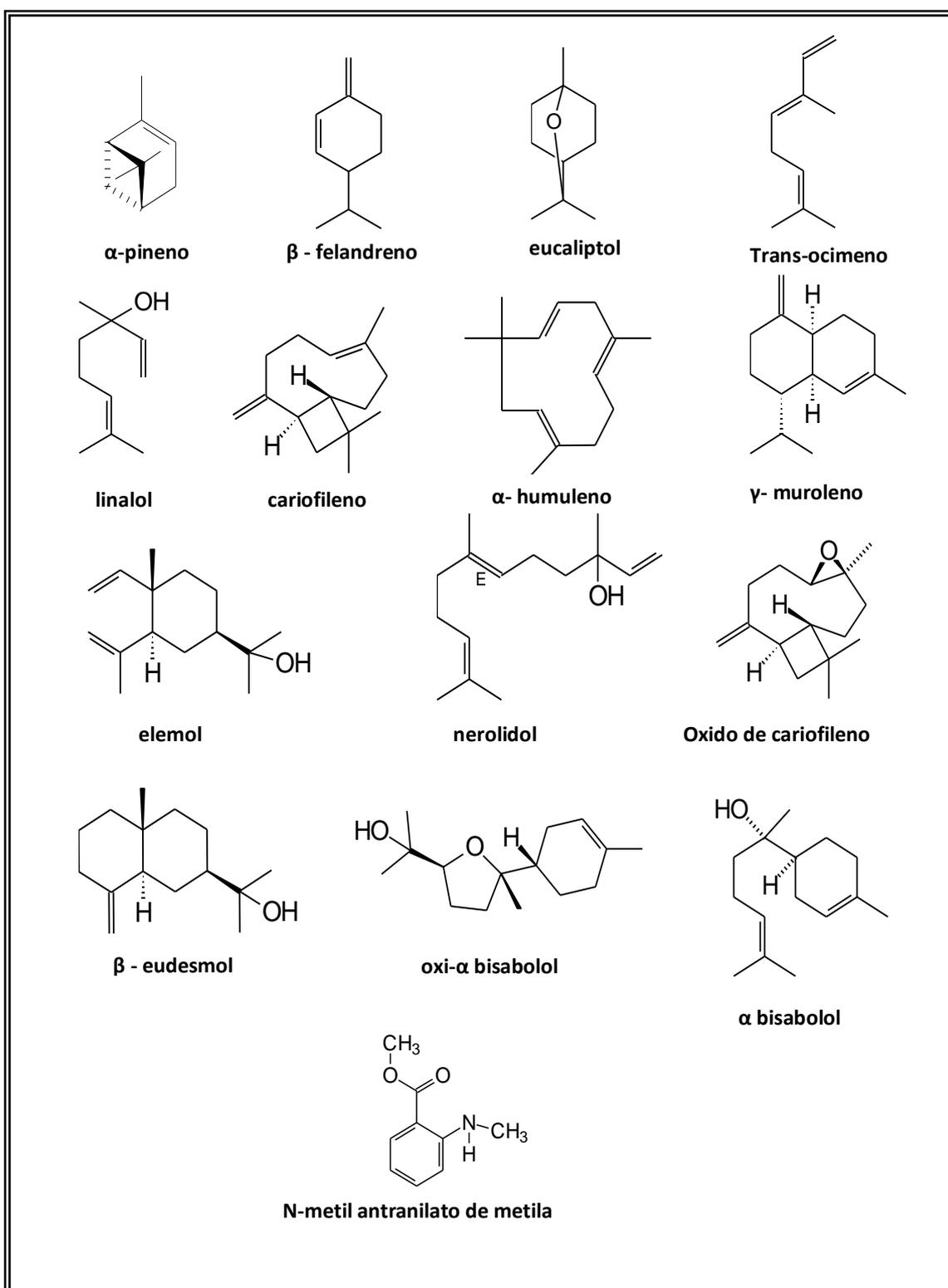


Figura 9: Estruturas da composição química do óleo essencial de *Z. tingoassuiba*

Dessa forma, esta espécie se apresenta como produtora de cumarinas de classes diversificadas para estudos biológicos e para reduções por biotransformação. Na figura 10 se mostra os possíveis produtos das reduções de uma furanocumarina isopimpinelina.

Tabela 2: Composição do óleo volátil das folhas de *Z. tingoassuiba*

Componentes	%	Componentes	%
α -pineno	0,27	elemol	1,33
β -felandreno	0,63	neroliol	0,97
eucaliptol	0,30	oxide cariofileno	0,42
trans-ocimeno	0,81	β -eudesmol	7,11
linalol	0,50	oxi- α bisabolol	2,38
cariofileno	1,15	α bisabolol	11,60
α -humuleno	0,74	N-metil antranilato de metila	66,38
γ -muroleno	0,83		

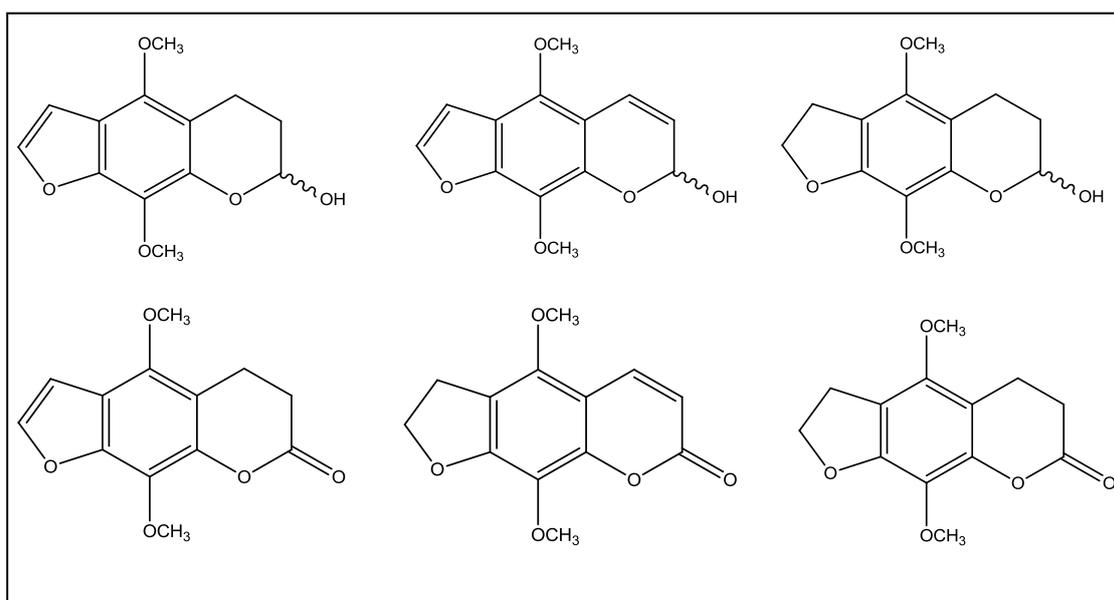


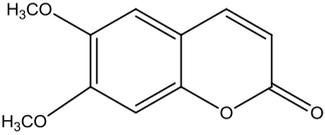
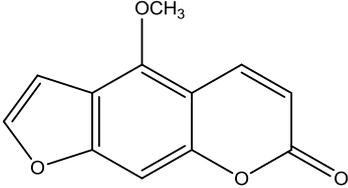
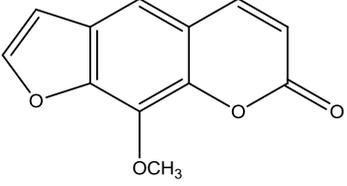
Figura 10: Estruturas dos possíveis produtos de redução com FP da isopimpinelina

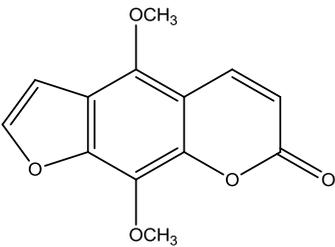
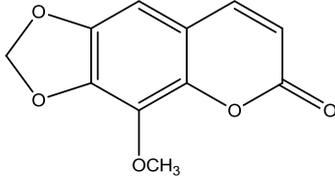
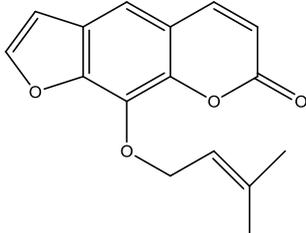
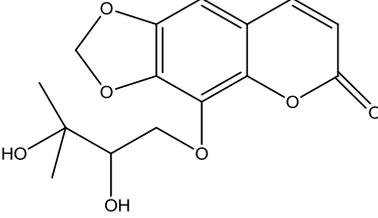
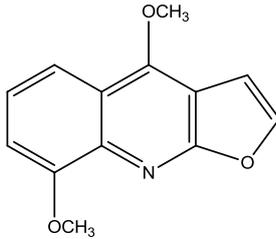
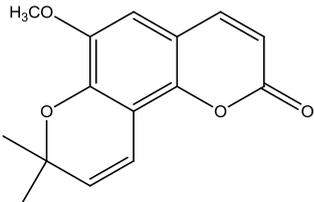
1.6.2 *Metrodorea mollis*

A subfamília Rutoideae possui 5 tribos e 32 gêneros nativos do Brasil. A tribo Galipeae é a melhor representada no território nacional, com 26 gêneros nativos entre os quais encontra-se *Metrodorea* com cinco espécies identificadas. As espécies *M. nigra* e *M. flavida* foram descritas na literatura como fontes naturais, principalmente, de pirano e furanocumarinas (BAETAS et al, 1999). No quadro 1 e 2, se pode observar algumas substâncias isoladas nas espécies *M. flavida* e *M. nigra* (BAETAS et al, 1996; BAETAS et al, 1999; MÜLLER et al, 1995).

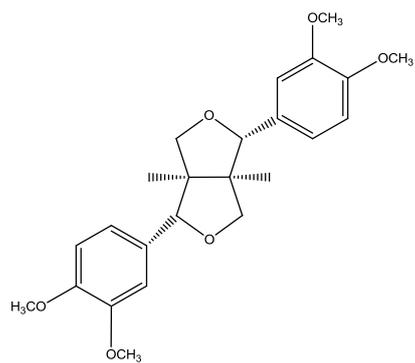
A espécie *M. mollis* é endêmica no estado da Bahia não havendo relatos na literatura da sua composição química. Este é o primeiro trabalho descrito sobre a composição desta espécie.

Quadro 1: Substâncias isoladas nas espécies *M. flavida*

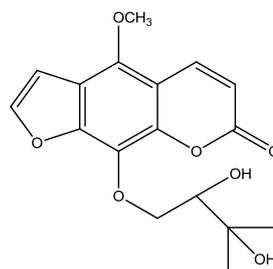
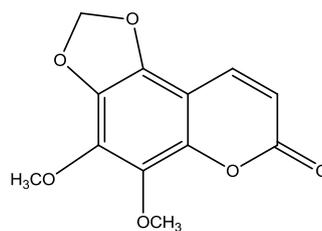
Nome	Estrutura
Escoparona	
Bergapteno	
Xantotoxina	

<p>Isopimpinina</p> <p>6,7-metilenodioxo-8-metoxicumarina</p> <p>Imperatorina</p>	  
<p>8-(2,3-diidroxi-3-metilbutioxi)-6,7-metilenodioxocumarina</p> <p>γ-Fagarina</p> <p>Brailina</p>	  

Eudesmina



Heraclenol

5,6-metilenodioxi-7,8-
dimetoxicumarina

2. Justificativa e Objetivos

2.1 Justificativa

A biocatálise se tornou uma alternativa com grande potencial para a crescente utilização nas reações de biotransformação. Por isto, está sendo possível uma produção variável de ingredientes para alimentos, produtos da química fina e agropecuária.

O uso de micro-organismos como *S. cerevisiae*, que funciona como catalisador atingindo o seu pleno potencial na síntese de substâncias e exigindo técnicas com poucos recursos, além, de ecologicamente viável tornou-se um grande atrativo para a produção em grande escala na indústria farmacêutica.

As espécies *Z. tingoassuiba* e *M. mollis* foram selecionadas para este estudo por serem plantas nativas do semi-árido baiano e por apresentarem fontes de cumarinas na família Rutaceae.

Por isso, este projeto se caracteriza pela inovação no grupo de pesquisa, que há uma década isola e identifica as cumarinas em espécies de Rutaceae. Porém a utilização das cumarinas para a modificação nas estruturas de micromoléculas em sistemas cíclicos ainda é incipiente não se conhecendo a regio e estereosseletividade do amparo enzimático do *S. cerevisiae* nas reduções.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo geral

Avaliar a regiosseletividade de células de *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de pão comercial) na redução de furano e pirano cumarinas.

2.2.2 Objetivos específicos

- Isolar, identificar e caracterizar as cumarinas puras ou em misturas presentes no decocto da hidrodestilação das folhas de *Z. tingoassuiba* e

das raízes de *M. mollis* através das técnicas de espectroscopia Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^1H e ^{13}C .

- Reduzir as cumarinas isoladas de *Z. tingoassuiba*, *M. mollis* e do padrão xantotoxina com borohidreto de sódio (NaBH_4) e fermento de pão (FP).
- Avaliar e caracterizar os produtos obtidos através das técnicas Cromatografia Gasosa acoplado com Espectro de Massa (CG/EM), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e RMN ^1H e ^{13}C .

3. Material e Métodos

3.1 Solventes, Reagentes, Fase estacionária e Biocatalisador

3.1.1 Solventes

Os solventes utilizados foram acetato de etila, acetonitrila, diclorometano, dicloroetano, dimetilsulfóxido, éter etílico, hexano, metanol e octanol de grau analítico das marcas Nuclear, Qhemis e Quimex.

Os solventes para Cromatografia Gasosa acoplado ao espectro de massa (CG/EM) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram de grau 99,5% sendo o diclorometano marca Tedia®, acetonitrila e metanol marca Merck®, respectivamente. Além disso, água tipo 1 por sistema de purificação e filtração Option-Q para o CLAE.

Para a obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foi usado clorofórmio deuterado da marca Cambridge®, tendo como referência interna o tetrametilsilano.

3.1.2 Reagentes

- Potássio fosfato bibásico da marca FMaia®
- Ácido cítrico da marca Merck®
- Cloreto de sódio marca Quimex®
- Borohidreto de sódio marca Neon®
- Sulfato de magnésio marca QHemis®
- Padrão xantotoxina de marca Deg®

3.1.3 Fase Estacionária

Para as separações através de cromatografia em coluna foram usadas sílica gel 70-230 mesh da marca Merck®. Além disso, foram usadas placas cromatográficas camada delgada comparativa (CCD) UV 254 da marca Merck.

Para a revelação das placas CCD foram utilizados luz de ultravioleta em 254 e 366nm, e reveladas em câmara com vapor de iodo.

3.1.4 Biocatalisador

Para as reações foi usado o fermento biológico comercial como agente biológico, leveduras secas de *Saccharomyces cerevisiae*, da marca Fleischmann®.

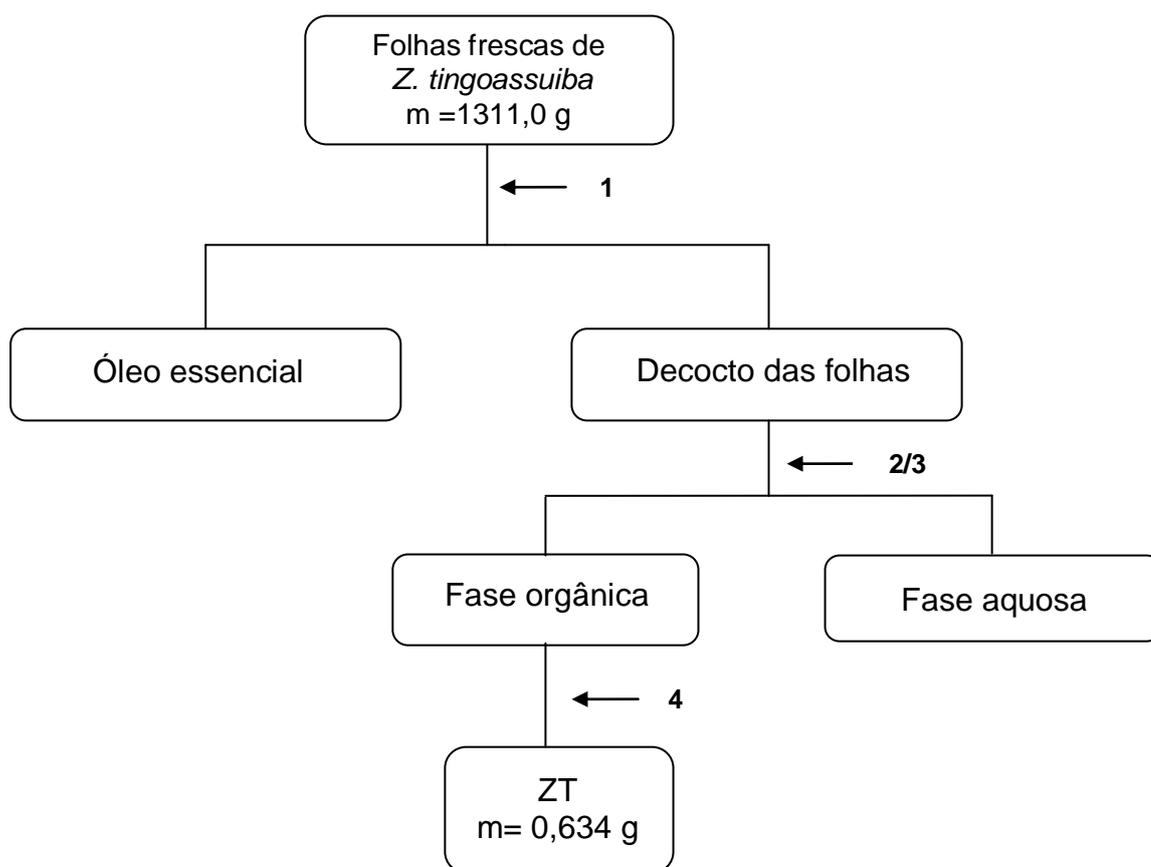
3.2 Equipamentos

- Os solventes dos extratos e frações foram sob pressão reduzida utilizando evaporadores rotativos da marca FISATOM
- A hidrodestilação foi realizada numa aparelhagem Clevenger modificado preconizada pela Farmacopéia Brasileira da 3ª edição
- Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram obtidos nos aparelhos da marca VARIAN modelo Inova 500 operando a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C .
- Para analisar as cumarinas e o produto da reação com o aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de marca SHIMADZU modelo Prominence 20 A.
- Para obtenção dos cromatogramas foi usado um Cromatógrafo a Gás acoplado ao Espectro de Massa (CG/EM) com analisador quadrupolo da marca SHIMADZU modelo QP-2010.
- Os espectros obtidos na região do infravermelho (IV), $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, foram registrados no aparelho de marca SHIMADZU modelo IRAffinity-1 em filme de KBr.

3.3 Obtenção das furanocumarinas

As folhas de *Z. tingoassuiba* foram coletadas no distrito de Jaíba em Feira de Santana - Bahia em 2009. Sendo identificada pela professora Msc. Maria Lenise da Silva Guedes, curadora do Herbário Alexandre Leal Costa (ALCB), do Instituto de Biologia da Universidade de Federal da Bahia e tendo sua exsicata depositada sob o número 88005.

Aproximadamente 1311,0 g de folhas frescas foram submetidas à hidrodestilação, durante 4 horas, em um aparelho Clevenger modificado a temperatura de 100°C, conforme descrito no Esquema 1. A água obtida após o processo de hidrodestilação das folhas foi filtrada e submetida à partição com acetato de etila, esta solução foi concentrada sob pressão reduzida usando evaporador rotatório originando o extrato acetato de etila a partir das folhas de *Z. tingoassuiba* (ZT). Este material foi analisado por IV, CLAE e RMN ^1H , ^{13}C .



Esquema 1: Obtenção do extrato das folhas de *Z. tingoassuiba* (ZT)

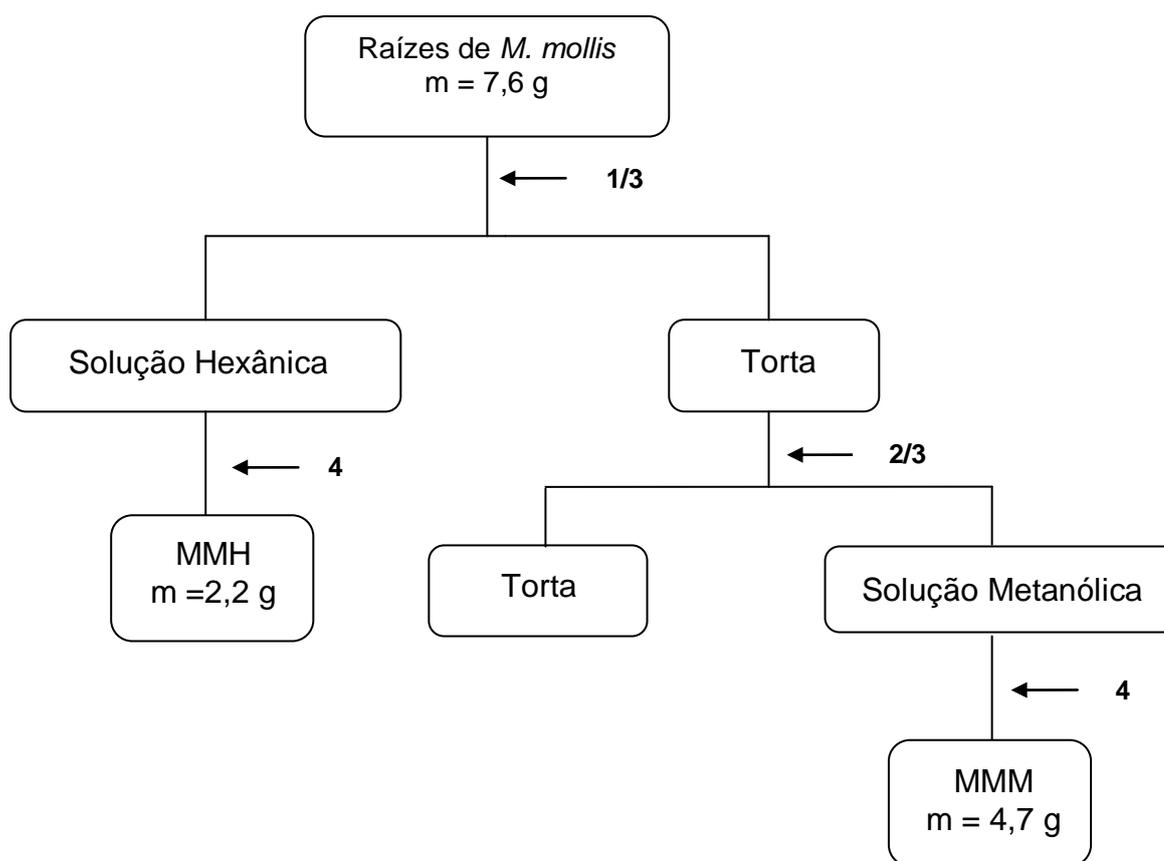
1- Hidrodestilação; 2- Filtração; 3- Partição com acetato de etila; 4- Evaporação a baixa pressão.

3.4 Obtenção da piranocumarina

A espécie de *Metrodorea mollis*, escolhida para obtenção das piranocumarinas, foi coletada na estrada de Catolés, município de Piatã – Bahia em 2004. Esta espécie foi identificada pela professora Msc. Maria Lenise da Silva Guedes e sua exsicata foi depositada no Herbário Alexandre Leal Costa do Instituto de Biologia da Universidade de Federal da Bahia, sob o número 69153.

As raízes de *M. mollis* foram secas à temperatura ambiente, trituradas e submetidas à extração com hexano e posteriormente com metanol a temperatura ambiente. O solvente foi destilado sob pressão reduzida resultando nos extratos hexânico (MMH) e metanólico (MMM) das cascas das raízes de *M. mollis*, conforme o Esquema 2.

O extrato hexânico foi fracionado por cromatografia em coluna eluida com hexano/acetato de etila em gradiente de concentração obtendo-se 37 frações. As frações foram monitoradas por CCD, reveladas em câmara com vapor de iodo, lâmpada ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm. A fração 17 foi submetida à cromatografia em coluna eluida com diclorometano/acetato de etila em gradiente de concentração, obtendo-se a fração 3. Na purificação desta fração, utilizou-se cromatografia em coluna isocrática com hexano/diclorometano/acetato de etila (7:2:1), no qual foi possível o isolamento da piranocumarina. A substância foi identificada e caracterizada através das análises por CLAE, CG/EM e RMN ^1H , ^{13}C .



Esquema 2: Obtenção dos extratos hexânico e metanólico das raízes de *M. mollis*

1 - Maceração com hexano (3x); 2 - Maceração com metanol (3x); 3 - Filtração simples; 4 - Evaporação sob baixa pressão

MMH- Extrato hexânico de *M. mollis*; MMM – Extrato metanólico de *M. mollis*

3.5 Procedimento para a redução das cumarinas mediada por NaBH_4

As furanocumarinas obtidas do extrato de *Z. tingoassuiba* (ZT), a piranocumarina obtida de *M. mollis* e o padrão comercial xantotoxina foram submetidas a reação de borohidreto de sódio (NaBH_4) (VOGEL,1971).

Em um balão de fundo redondo de 250 mL, foram adicionados, aproximadamente 500 mg, do substrato dissolvida em 30 mL de metanol e, a seguir adicionou-se em excesso aproximadamente 300 mg NaBH_4 . A reação foi acompanhada por CCD utilizando como eluente hexano/acetato de etila (1:1). No final a fase orgânica foi tratada com solução saturada de NaCl e extraída

com diclorometano e acetato de etila (3 x 30mL/solvente). A fase orgânica foi seca com Mg_2SO_4 anidro e depois concentrada sob pressão reduzida dando origem à fração de diclorometano e acetato de etila, respectivamente. As frações foram submetidas à CCD comparando com o material de partida.

Os produtos da redução química, a xantotoxina padrão e a piranocumarina, foram purificadas através de cromatografia preparativa (CP) tendo como eluente hexano/acetato de etila (4:1).

3.6 Biotransformação das cumarinas mediada por FP

As furanocumarinas de *Z. tingoassuiba*, a piranocumarina de *M. mollis* e o padrão comercial xantotoxina foram usados como substratos. As reações de biotransformação foram realizadas usando as células integras das leveduras *S. cerevisiae* (FP) obtidas na sua forma liofilizada pronta no comércio local.

Aproximadamente 500 mg do substrato, em um erlenmeyer de 250 mL, solubilizadas, em 30 mL de uma mistura de hexano/diclorometano (95:5), e a seguir adicionou-se 30 mL de solução tampão K_2HPO_4 /ácido cítrico (0,2 M / 0,1 M pH 4,5) e o biocatalisador (2 g), no qual a mistura reacional foi submetida à agitação magnética e a temperatura ambiente. O meio reacional foi submetido a extração com diclorometano e acetato de etila (3 x 15mL/solvente) (WIMMER et al, 1992). A formação do produto foi analisada por CLAE, CG/EM e RMN 1H , ^{13}C .

Os produtos da redução com FP, xantotoxina padrão e a piranocumarina, foram purificadas por CP tendo como eluente hexano/acetato de etila (4:1).

3.7 Procedimento de identificação

3.7.1 Condições cromatográficas do CG/EM

O cromatógrafo a gás acoplado com espectro de massa (CG/EM) com analisador quadrupolo com impacto eletrônico a 70 eV foi usado para analisar os produtos obtidos da reação com FP e $NaBH_4$. O volume de injeção foi de 1 μ L, para todas as amostras e no modo SPLIT. O gás de arraste foi o hélio

com fluxo de 1,0 mL/min. A coluna utilizada para análises foi a DB5-MS (30m x 0,25mm x 0,25µm). A temperatura do injetor foi de 240°C e a temperatura inicial da corrida foi de 100°C, durante 4min, incrementando 5°C/min até alcançar a temperatura de 280°C, mantendo-se por mais 10 min. e com o tempo total de corrida de 50 minutos. Os espectros foram comparados com a biblioteca de espectros, WILEY 7.0 e NIST 08.

3.7.2 Condições cromatográficas do CLAE

O volume usado na injeção manual no loop de 20 µL, tanto do padrão quanto as amostras. A coluna cromatográfica utilizada foi a C18 (5µmx4,6x150mm) marca Shimadzu, no modo de eluição gradiente binário acetonitrila:água (1:1) com vazão da fase móvel de 1mL/min, tendo o tempo de eluição de 20 min. O detector do CLAE foi o UV-Vísivel com arranjo de diodo (DAD) comprimento de onda de 200-800 nm e tendo o software para obtenção dos cromatogramas o LC-Solution.

4. Resultados e Discussões

4.1 Efeito do solvente

Nas reações em química orgânica os solventes desempenham papel fundamental permitindo a solubilização de substratos e produtos, além de impedir reações laterais pela água. Além disso, promove uma maior seletividade do FP pelo substrato. No entanto, para que a enzima se mantenha cataliticamente ativa é importante a presença de pequenas quantidades de água no meio reacional (NASCIMENTO et al, 2002).

Os produtos são mais facilmente isolados em meio orgânico do que em meio aquoso e essa variação da solubilidade pode ser explicada, devido ao log P. Solventes com $\log P \leq 2$, são hidrofílicos, e promovem desnaturação ou inativação do biocatalisador, devido à alteração na interação água-biocatalisador, já os solventes com o log P entre 2 e 4 são moderados e alteram pouco a interação, apesar de também serem hidrofílicos. Os solventes com $\log P > 4$ permitem que o biocatalisador esteja ativo com menos interações com a fase aquosa (LAANE et al, 1987).

Silva e colaboradores (2010) realizaram estudos avaliando a importância dos solventes para solubilização dos substratos para reações usando o *S. cerevisiae*, principalmente, o diclorometano, no entanto, este solvente é veneno para o biocatalisador, sendo necessário testar outros solventes para substituir no meio reacional como hexano (Log P 3,5), dicloroetano (Log P 1,91), acetonitrila (Log P -0,33), dimetilsufóxido (Log P -1,49), tetracloreto de carbono (Log P 2,86) e octanol (Log P 2,64). Os solventes foram testados, no entanto, os substratos apresentaram solubilidade moderada com estes solventes, sendo bastante solúveis em diclorometano (Log P 1,0), então, foi escolhido o solvente hexano e como co-solvente o diclorometano para auxiliar na solubilização dos substratos.

A escolha do sistema bifásico para reações catalisadas por células íntegras e ou enzimas apresenta como vantagem produção moderada de compostos com baixa toxicidade e menor número de subprodutos (LEÓN et al, 1998).

4.2 Reduções mediadas por FP e NaBH₄

4.2.1 Padrão xantotoxina

4.2.1.1 Análise por CCD

Para acompanhamento das reações de redução foram realizadas CCD tendo como eluente hexano:acetato (4:1). No qual pode ser observado tanto no UV e exposto no iodo, o material de partida (xantotoxina) (1); produto da reação FP(2) e o produto da reação NaBH₄ (3). No produto formado pela via biológica pode ser observada a redução da xantotoxina, Figura 11.

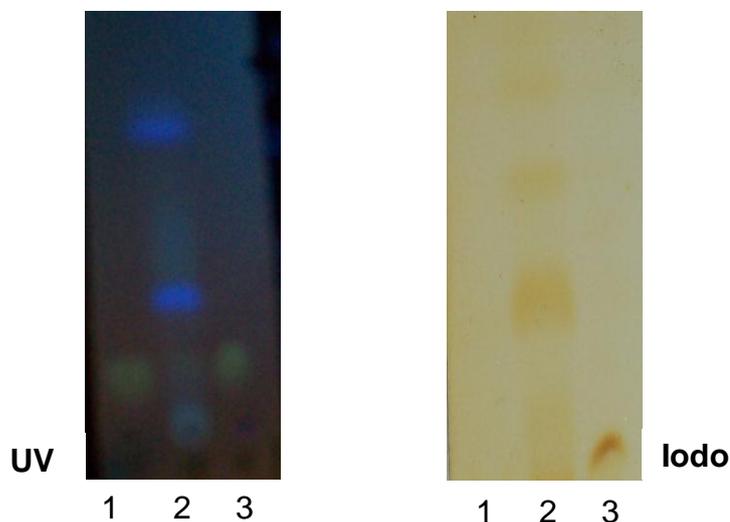


Figura 11: CCD dos produtos das reações com FP e NaBH₄ da xantotoxina

4.2.1.2 Análises dos cromatogramas por CLAE

A análise através da CLAE permitiu uma comparação qualitativa dos tempos de retenção da xantotoxina padrão com os produtos das reações com NaBH₄ e FP observado no comprimento de 365 nm, conforme apresentadas nas Figuras 12, 13 e 14. Podendo ser inferido que ocorreu a formação do produto da reação com NaBH₄, mas não foi possível observar diferenças no cromatograma do produto da reação com FP, que se apresenta com o mesmo TR obtido do padrão xantotoxina.

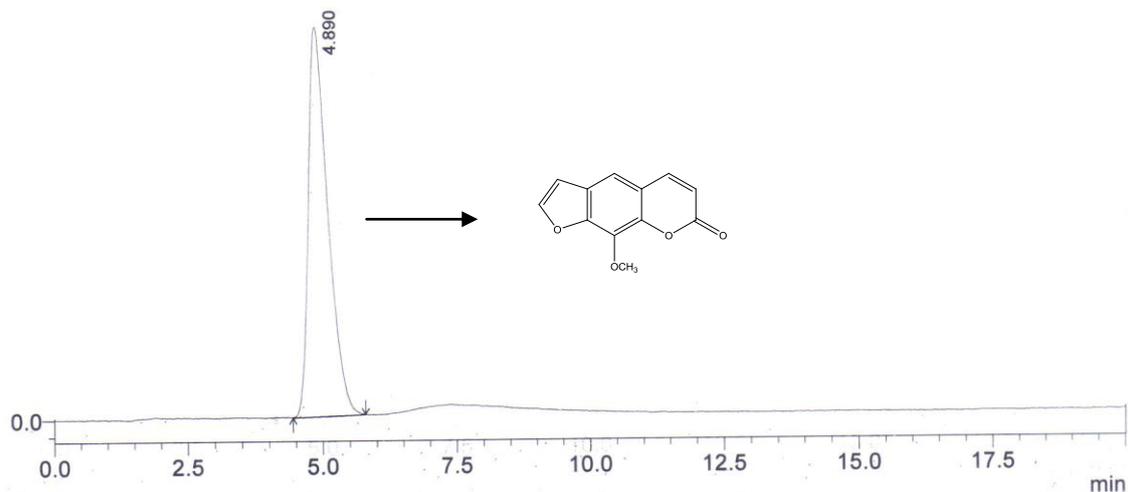


Figura 12: Cromatograma observado em 365 nm da xantotoxina padrão

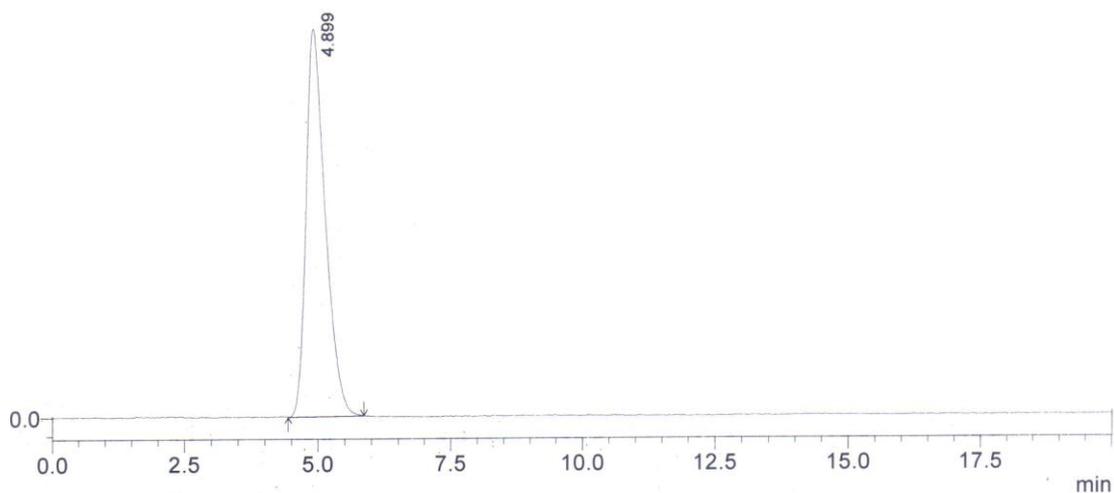


Figura 13: Cromatograma observado em 365 nm do produto da reação com FP da xantotoxina

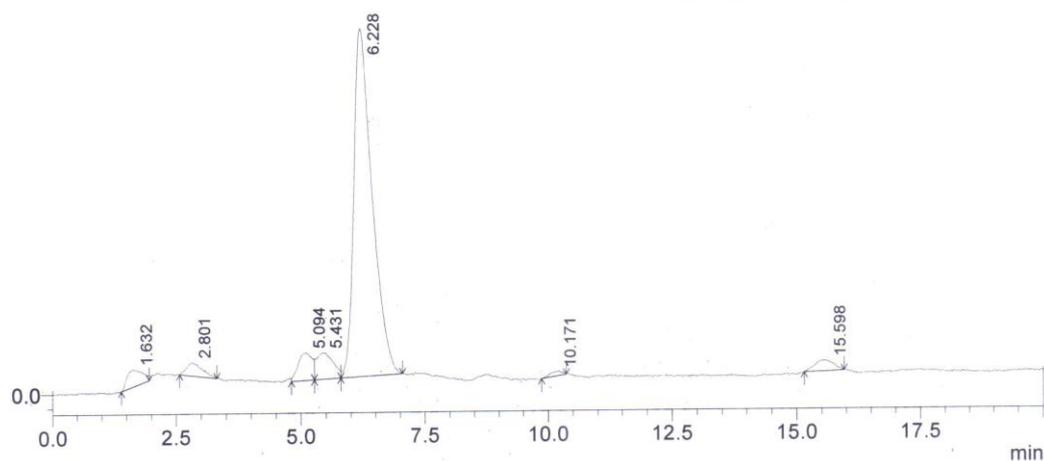


Figura 14: Cromatograma observado em 365 nm do produto da reação com NaBH₄ da xantotoxina

4.2.1.3 Análises dos espectros de RMN

O espectro de RMN ^1H (Figura 15) da xantotoxina apresenta dois pares de dubletos em δ 7,68 e δ 6,29 em ($J = 9,5$ Hz) característicos de acoplamento *orto* integrando para um hidrogênio e cada outro par de dubletos em δ 7,61 e δ 6,74 ($J = 1,5$ Hz), integrando para um hidrogênio típico do acoplamento dos prótons do anel furânico. Outro sinal característico é o singlete em δ 7,19 que integra para um hidrogênio e da metoxila em δ 4,22 integrando para três hidrogênios estes dados são compatíveis com a estrutura xantotoxina conforme a literatura (STECK et al, 1972; MARUMOTO et al, 2010).

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C (Tabela 3) da xantotoxina padrão serviram como modelo para comparação com os dados obtidos nos produtos obtidos da redução por via química e biológica.

O deslocamento químico do produto da redução por via química no espectro RMN ^1H apresenta majoritariamente os sinais característicos da xantotoxina indicando que a redução ocorreu, mas com baixo rendimento (figura 16), sendo necessária a análise no espectro de RMN ^{13}C para confirmar os dados dos espectros de próton. Com os dados de RMN ^{13}C (tabela 3 e figura 17) foi possível inferir a redução nos C3 e C4 devido aos sinais em δ 29,7 e δ 26,0, respectivamente, passaram a ser saturados e δ 173,7 atribuído a carbonila da lactona insaturada indicando que a redução com NaBH_4 ocorreu no C3 e C4.

Os dados de RMN ^1H (figura 18), da via biológica mostraram sinais de um singlete na região de δ 4,15 da metoxila, além de dois pares como o dubleto em δ 7,72 e δ 6,36 em ($J = 9,5$ Hz) característicos de acoplamento em *orto*. Outros dois dubletos em δ 7,61 e δ 6,74 ($J = 1,5$ Hz) característicos do acoplamento dos prótons do anel furânico demonstrando que não houve redução nesta posição. No H3 apresenta multipletos em δ 2,71 e no H4 sinais em δ 3,01 e tendo H5 um singlete em δ 7,00 e em δ 4,27 a integração para três hidrogênios da metoxila em C8. Estas informações em conjunto com os dados de RMN ^{13}C (tabela 3 e figura 19) permitiram deduzir a formação do produto de redução por FP.

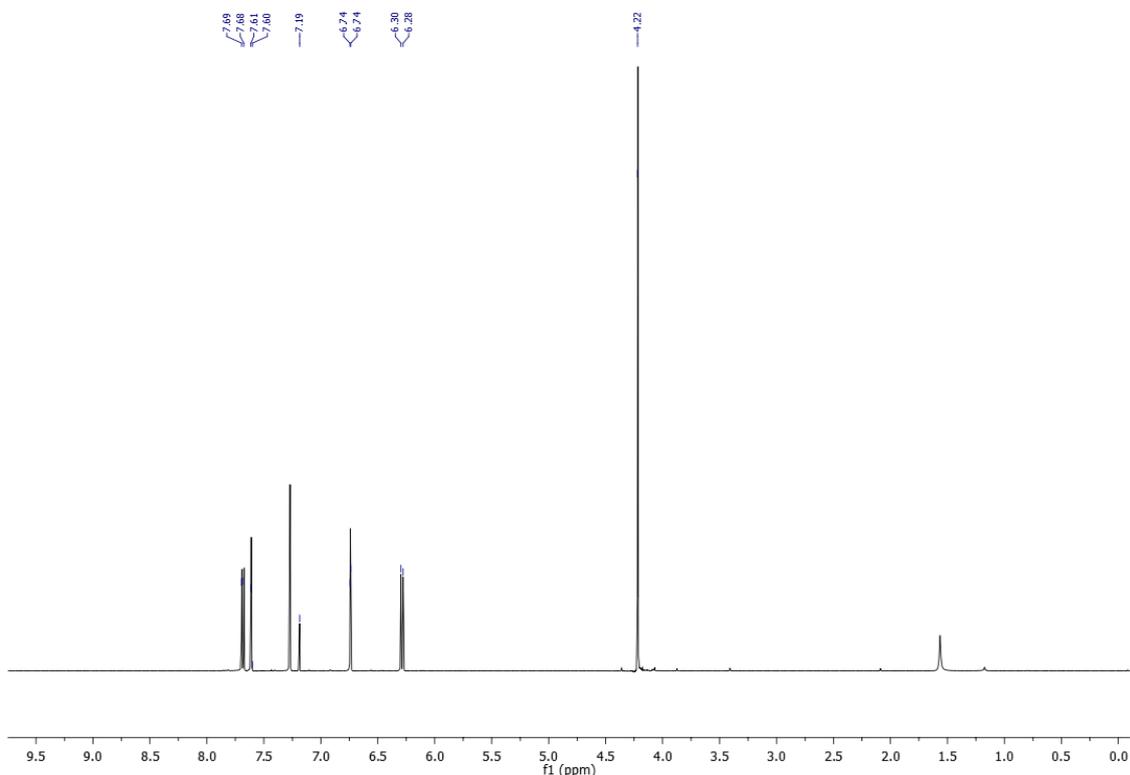


Figura 15: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da xantotoxina

Tabela 3: Dados de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da xantotoxina padrão e do produtos das reações com FP e NaBH_4 comparado com a literatura

Posição	xantotoxina	Marumoto et al, 2010		
		(100 MHz, CDCl_3)	FP	NaBH_4
C2	160,6	160,4	173,4	173,7
C3	114,9	114,7	28,4	29,7
C4	144,5	144,3	24,5	26,0
C5	113,1	112,9	114,7	114,8
C6	126,3	126,1	129,7	126,2
C7	147,9	147,7	146,7	146,7
C8	133,0	132,8	131,8	132,6
C2'	146,8	146,6	147,7	147,8
C3'	106,9	106,7	106,7	106,6
C4a	116,7	116,5	114,5	114,8
C8a	143,2	143,0	143,7	144,3
8-OMe	61,5	61,3	60,5	61,3

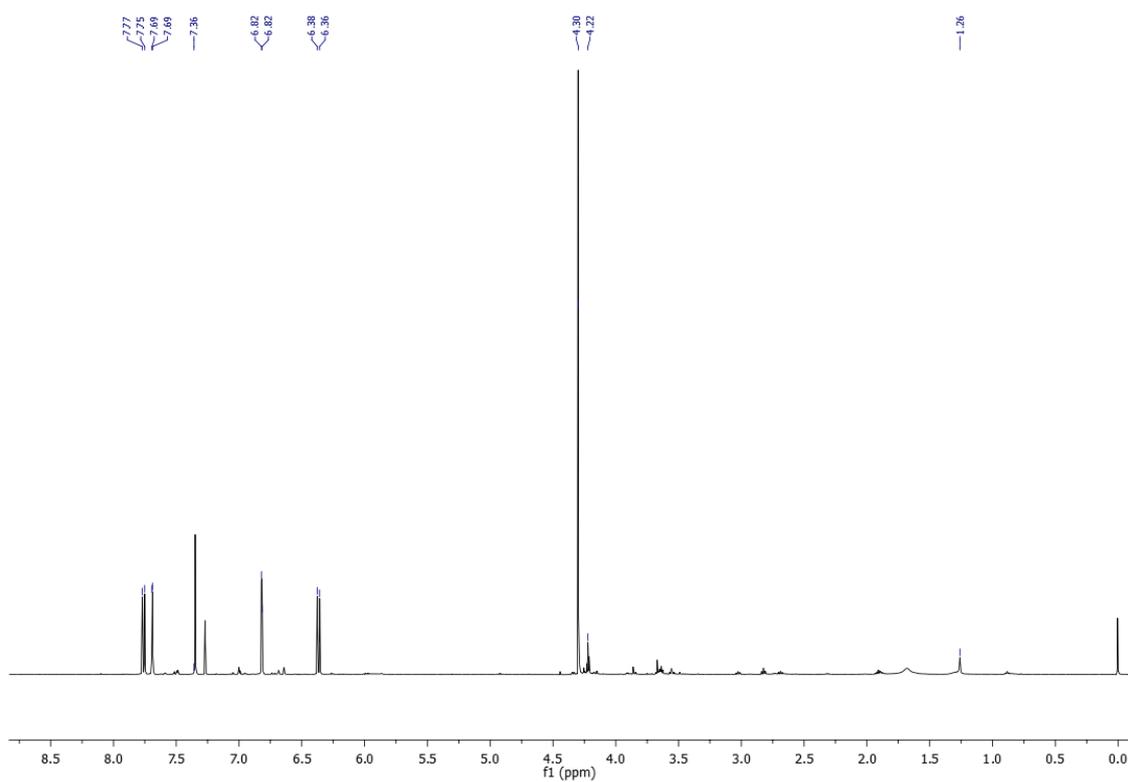


Figura 16: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do produto da reação com NaBH_4 da xantotoxina

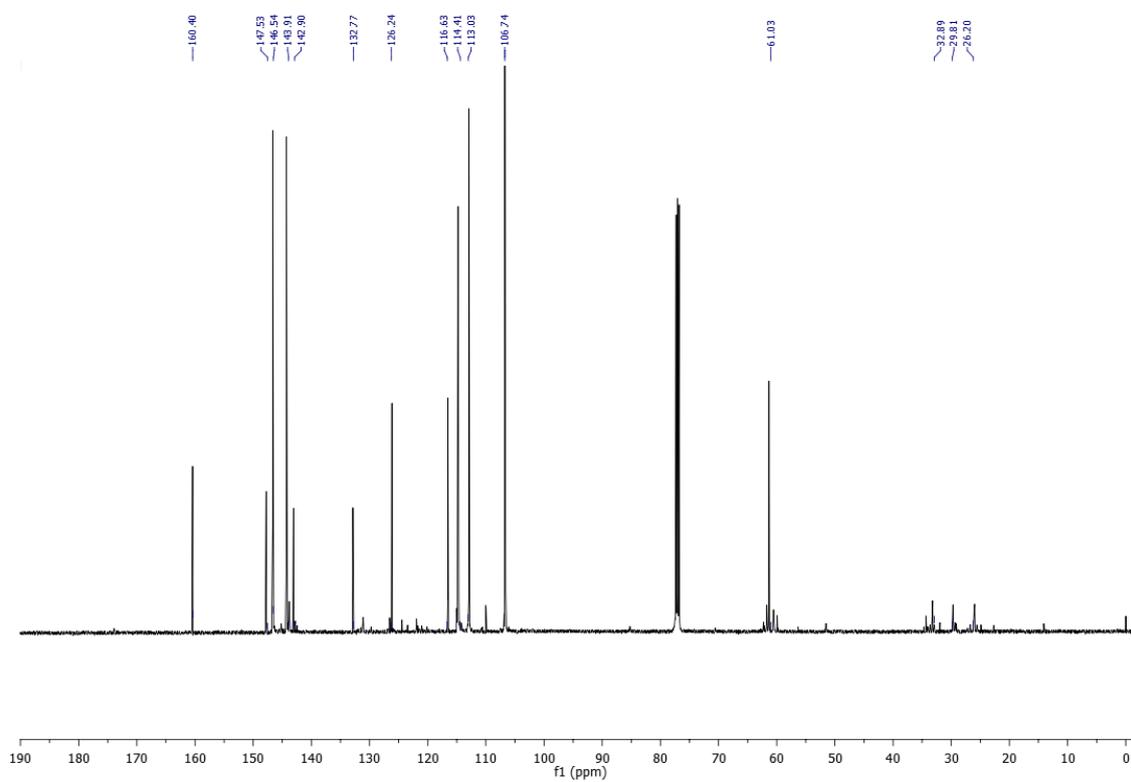


Figura 17: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do produto da reação com NaBH_4 da xantotoxina

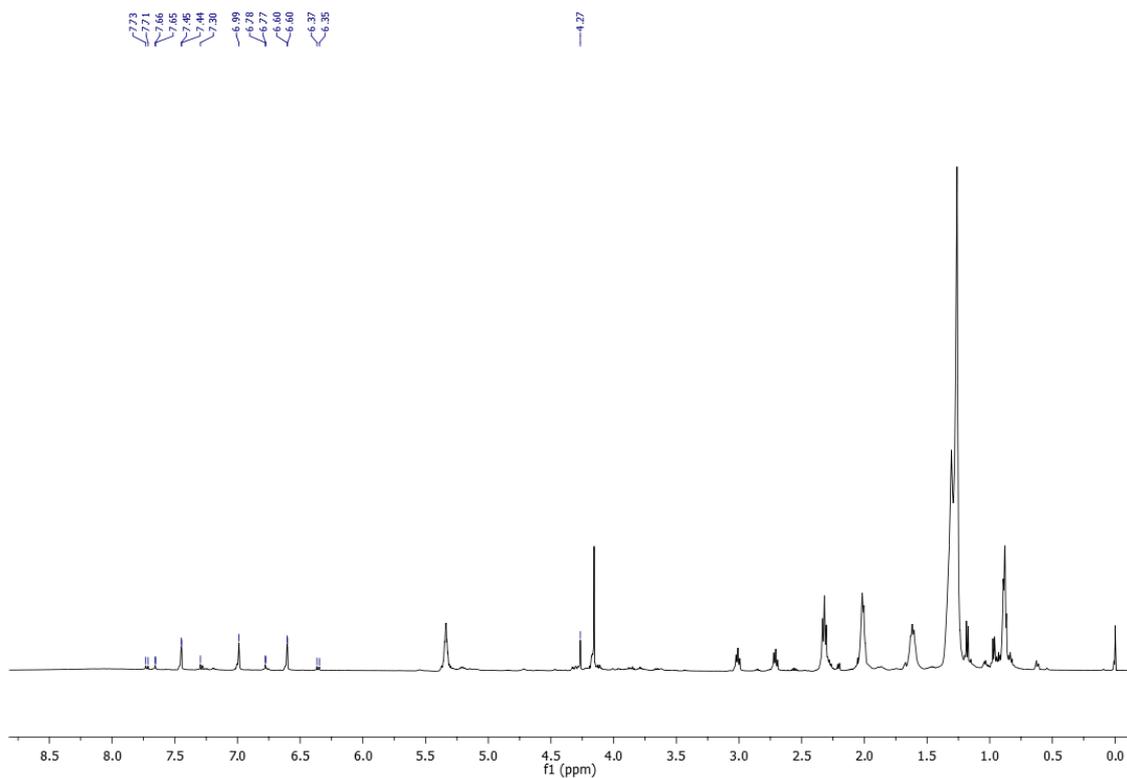


Figura 18: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do produto da reação com FP da xantotoxina

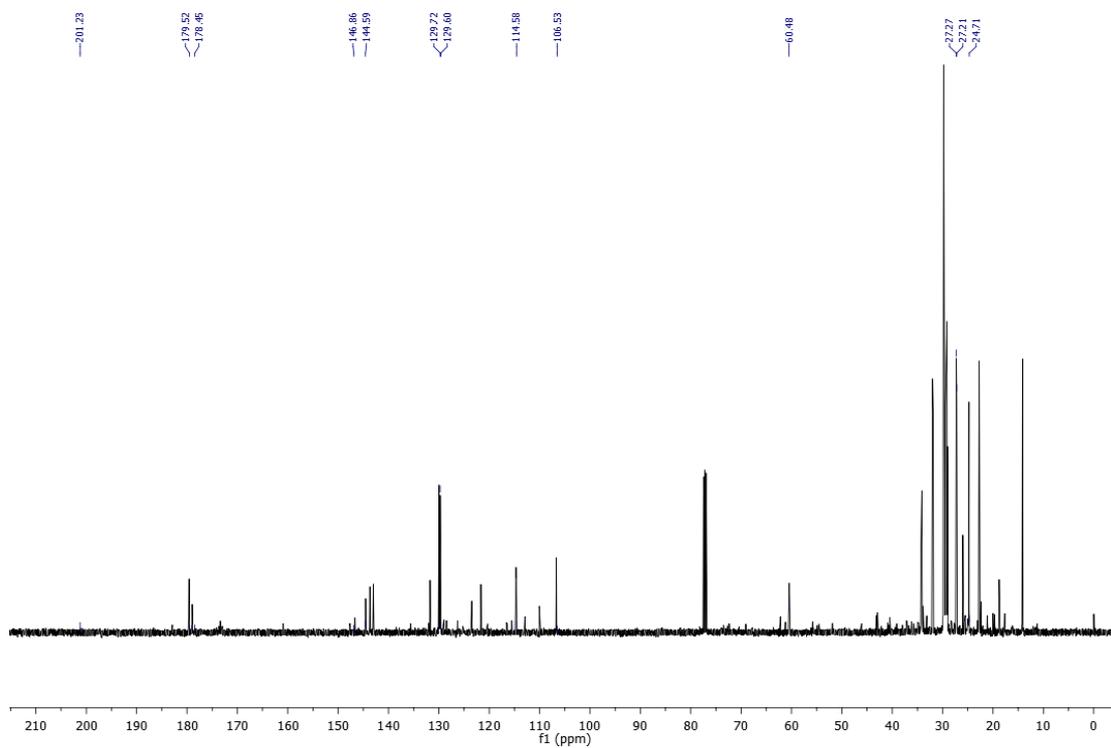


Figura 19: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do produto da reação com FP da xantotoxina

4.2.1.4 Análises dos cromatogramas dos íons totais dos produtos da redução xantotoxina

O cromatograma de íons totais (Figura 20) do produto da redução por via química apresenta 5 picos. Em 24,68 minutos observa-se um pico com m/z 222, compatível com a fórmula molecular $C_{12}H_{14}O_4$ (Figura 21). Esta substância possui 6 hidrogênios a mais que a xantotoxina. Seu espectro de massa apresenta fragmentação com perda de água típica de álcoois como também perda de metila e de monóxido de carbono (CO). Esses fragmentos são compatíveis com o lactol (9-metoxi-3,5,6,7-tetrahydro-2H-furo[3,2-g]cromen-7-ol), produto da redução completa das ligações duplas da furanocumarina (Figura 22). No TR de 25,40 minutos apresenta um pico com m/z 220 com fórmula molecular $C_{12}H_{12}O_4$ e pico base com m/z 202 indicando novamente perda, que pode ser atribuído a água e metila (m/z 187) e perda de CO (m/z 174), sendo este o produto da redução parcial. Em 26,99 minutos ocorre um pico m/z 216 compatível com a fórmula molecular $C_{12}H_8O_4$ (Figura 23) indicando a substância xantotoxina, conforme relatado em Santana e colaboradores (2011). Estes dados corroboram com os resultados obtidos através dos espectros RMN 1H e ^{13}C .

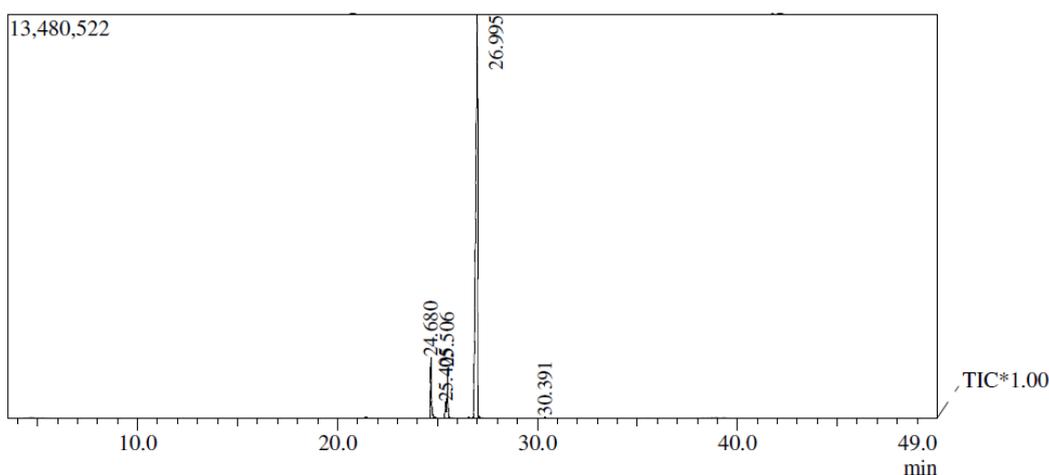


Figura 20: Cromatograma do produto da redução com $NaBH_4$ da xantotoxina

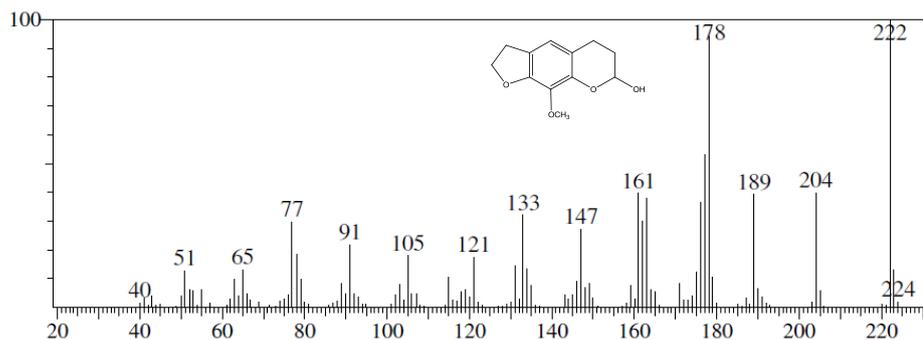


Figura 21: Espectro de massa do produto NaBH₄ no TR 24,68 minutos

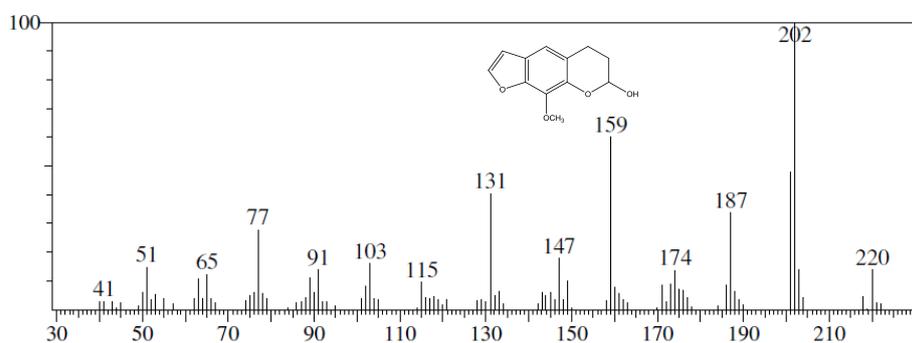


Figura 22: Espectro de massa do produto NaBH₄ no TR 25,40 minutos

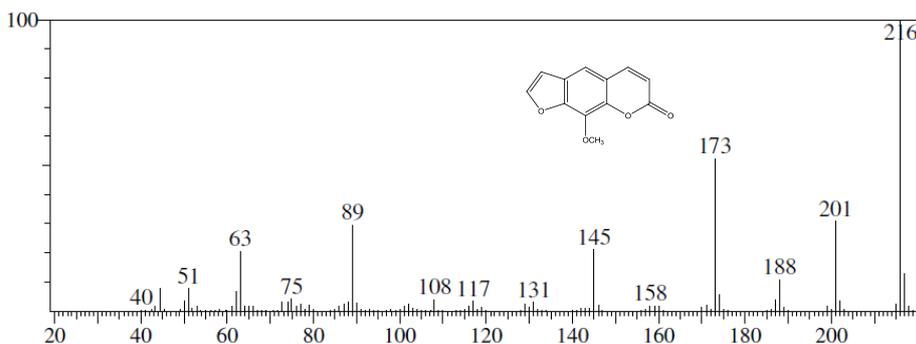


Figura 23: Espectro de massa do produto NaBH₄ no TR 26,99 minutos

No cromatograma de íons totais (Figura 24) do produto da redução por via biológica se pode observar no TR 26,86 minutos o íon molecular m/z 216 compatível com a fórmula molecular C₁₂H₈O₄ atribuída a xantotoxina (Figura 25), cuja fragmentação está apresentada no esquema 3.

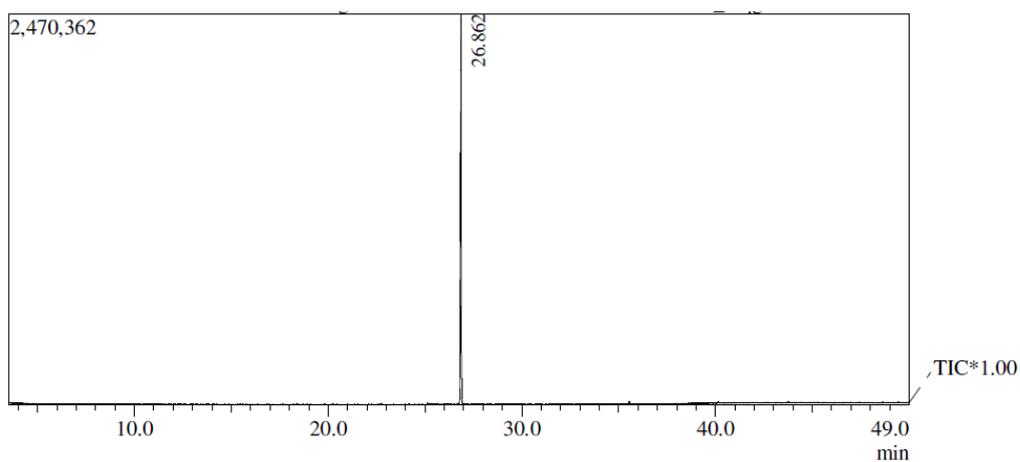


Figura 24: Cromatograma do produto da redução com FP da xantotoxina

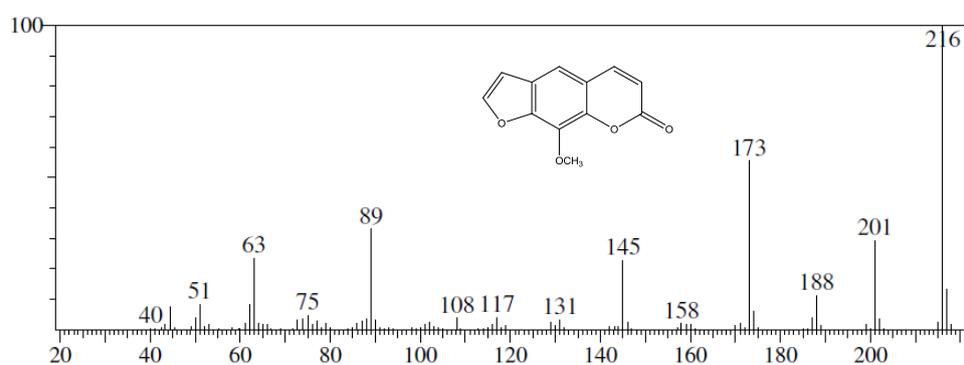
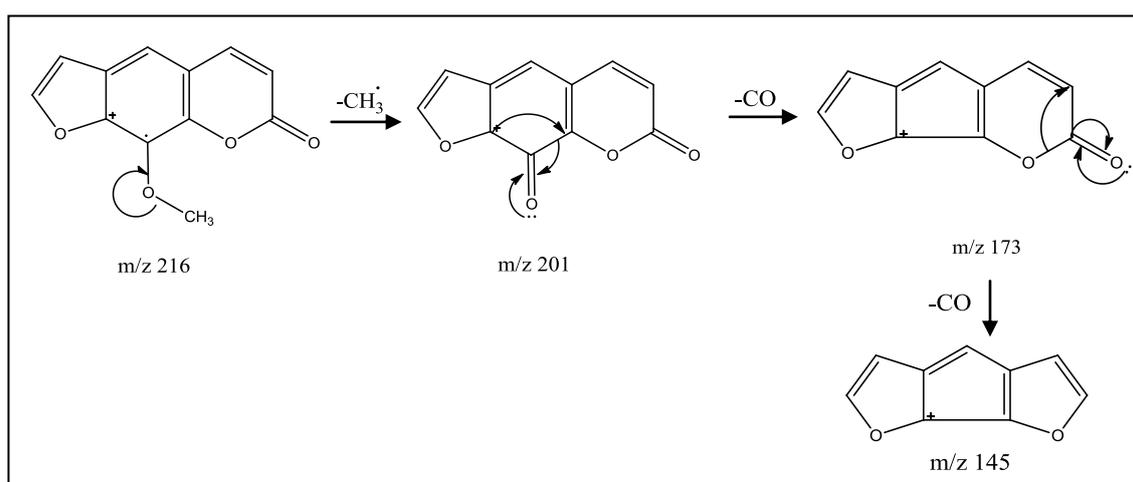


Figura 25: Espectro de massa do produto FP no TR 26,86 minutos



Esquema 3: Fragmentação da xantotoxina

4.2.2 Furanocumarinas do decocto de *Z. tingoassuiba*

A fração orgânica do decocto das folhas de *Z. tingoassuiba*, após extração com acetato de etila, forneceu uma mistura de 3 substâncias. Estas foram purificadas e identificadas como cumarinas e um derivado do ácido antranílico. A análise dos dados espectroscópicos e comparação com a literatura permitiram a identificação de duas furanocumarinas, além do metil antranilato de N-metila (Figura 26). Esta mistura foi usada como substrato na redução com FP e como material de partida nas reações de redução com NaBH_4 .



Figura 26: Constituintes químicos isolados de *Z. tingoassuiba*

4.2.2.1 Análise por CCD

Para acompanhamento das reações de reduções foram realizadas CCD no sistema hexano:acetato (4:1). No qual pode ser observado tanto na faixa de 365nm do UV e exposto ao iodo, o material de partida (furanocumarinas) (1); produto da reação FP (2) e o produto da reação NaBH_4 (3). O produto pela via biológica indica uma redução nas furanocumarinas, assim, como na via química, Figura 27.

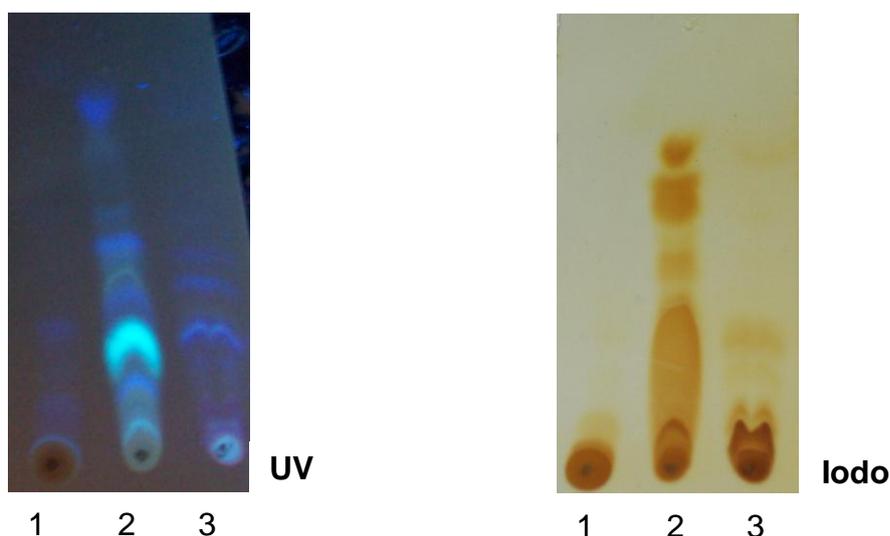


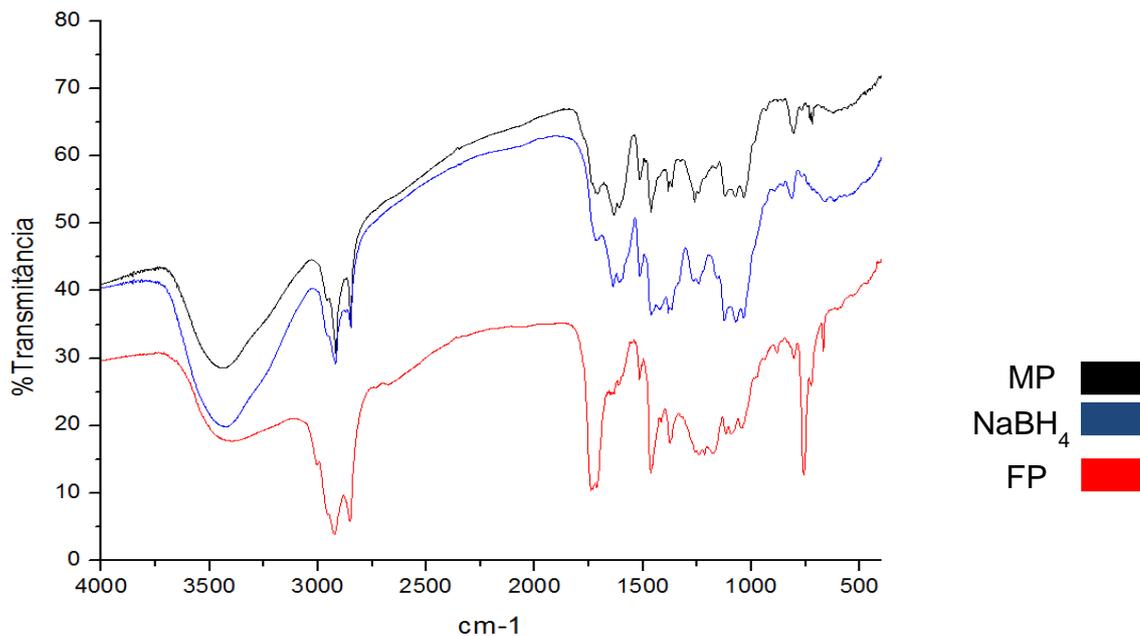
Figura 27: CCD dos produtos das reações com FP e NaBH_4 das furanocumarinas

4.2.2.2 Análise do espectro no IV

Os produtos formados na biotransformação da mistura das furanocumarinas, mediadas por FP no sistema bifásico e NaBH_4 foram comparados e analisados por IV, conforme a figura 28.

Em torno de 3400 cm^{-1} aparece uma banda característica do estiramento de hidroxila (Figura 28) que pode ser atribuída ao álcool formado na reação com NaBH_4 .

O estiramento da ligação carbono-oxigênio da carbonila ($\text{C}=\text{O}$) α,β -insaturada, presente no substrato usado para a reação com FP, pode ser observada na região de 1686 cm^{-1} . Na região de aproximadamente 1735 cm^{-1} podem ser observadas bandas relativas ao estiramento das ligações de carbonilas que podem ser associadas a ésteres e ácidos.



MP- material de partida

Figura 28: Espectro no infravermelho do material de partida e do produto da reação com FP e NaBH₄ das furanocumarinas

4.2.2.3 Análises dos cromatogramas por CLAE

Os cromatogramas avaliados qualitativamente auxiliaram para observar dos produtos da reação com FP e NaBH₄ no comprimento de onda em 254 nm das misturas de furanocumarinas (Figuras 29, 30 e 31). Pode se inferir que os cromatogramas apresentam picos diferentes do material de partida indicando a redução por FP e NaBH₄.

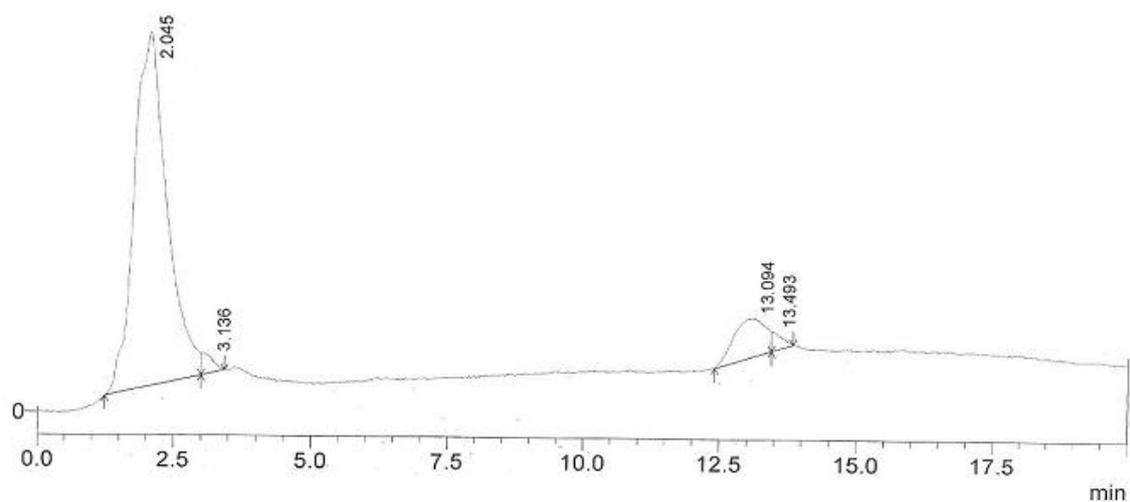


Figura 29: Cromatograma observado em 254 nm das furanocumarinas

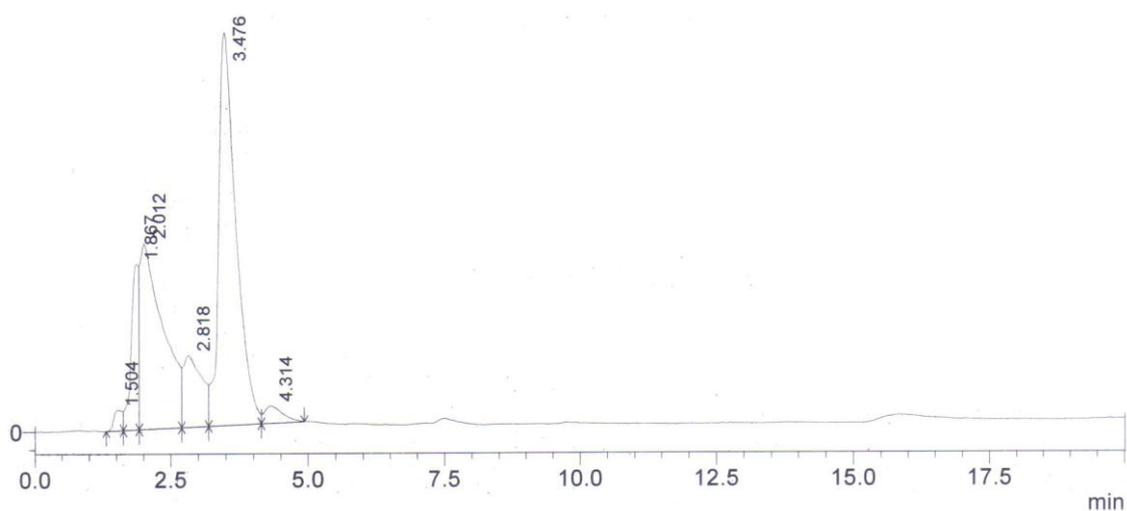


Figura 30: Cromatograma observado em 254 nm do produto da reação com FP das furanocumarinas

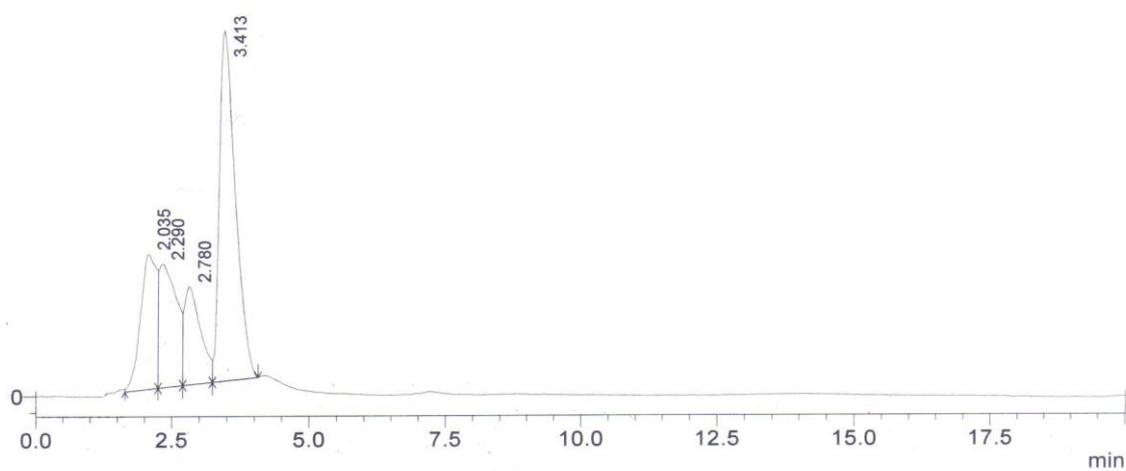


Figura 31: Cromatograma observado em 254 nm do produto da reação com NaBH_4 das furanocumarinas

4.2.2.4 Análises dos espectros de RMN

Da água da hidrodestilação, após extração com acetato de etila, foram isoladas as furanocumarinas. Os dados das misturas de furanocumarinas foram comparados com a literatura segundo Elgamal et al (1979) e Liu et al (2004) e estes dados auxiliaram na análise dos resultados obtidos dos produtos das reações por via química e biológica.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C (Figuras 32 e 33), da reação por via química desta mistura, mostraram que o NaBH_4 é capaz de reduzir tanto as ligações duplas carbono-carbono como a carbonila. Embora, no solvente e as condições utilizadas esta reação não ocorra com rendimento de 100%. Através do espectro de RMN ^{13}C observa-se sinal em δ 101,3 característico do carbono anomérico do lactol.

O processo de extração dos produtos da redução por via biológica extraiu também componentes da membrana celular como ácidos graxos e seus ésteres. Isto pode ser observado através dos sinais, no espectro de RMN ^{13}C (Figura 34) em δ 173,5. Enquanto que os produtos da redução formados devem apresentar sinais em δ 28,9 e δ 24,5 encobertos pelos deslocamentos dos carbonos metilênicos dos ácidos graxos e seus ésteres.

Analisando os dados de RMN ^1H (Figura 35) do produto da redução com FP é possível observar ainda os sinais remanescentes característicos dos substratos xantotoxina e isopimpinellina (Figura 36).

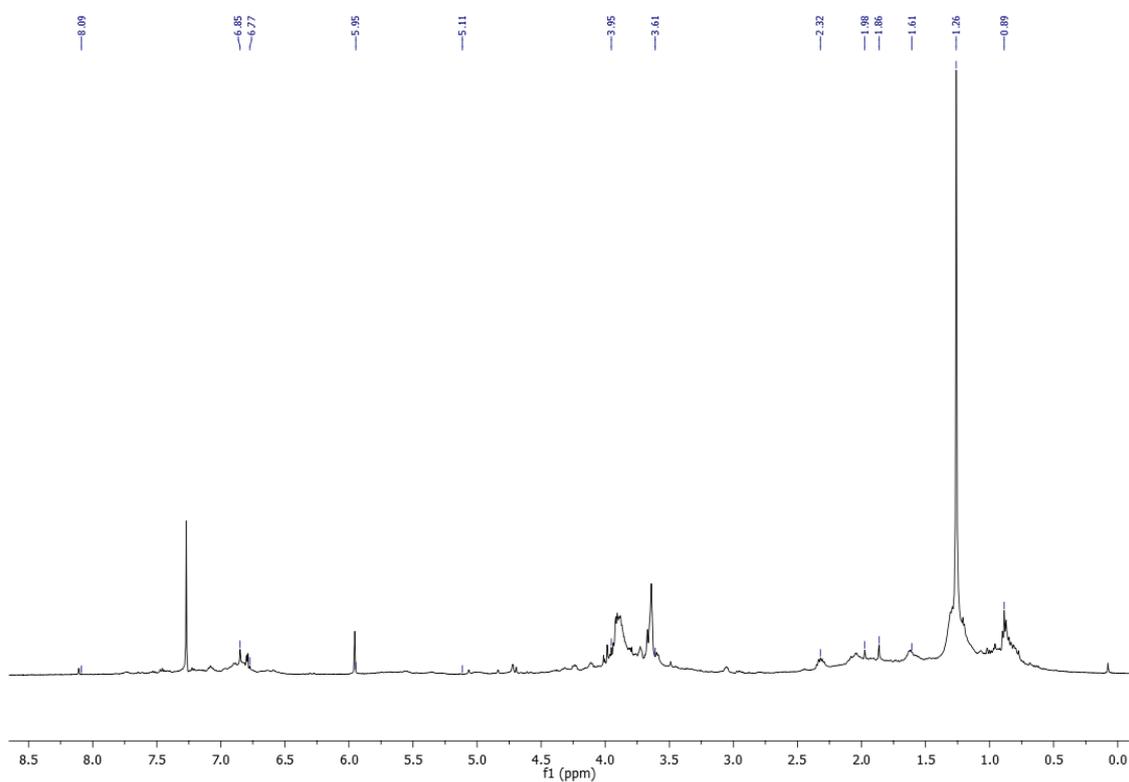


Figura 32: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do produto da reação com NaBH_4 das furanocumarinas

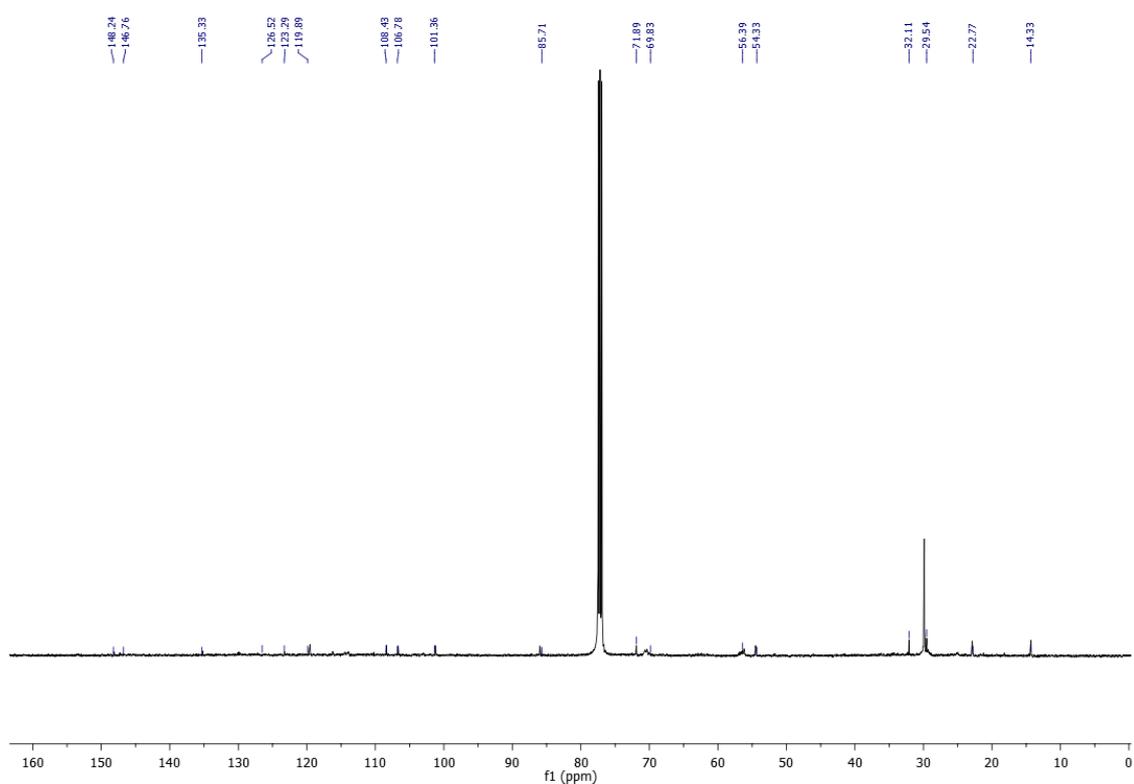


Figura 33: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do produto da reação com NaBH_4 das furanocumarinas

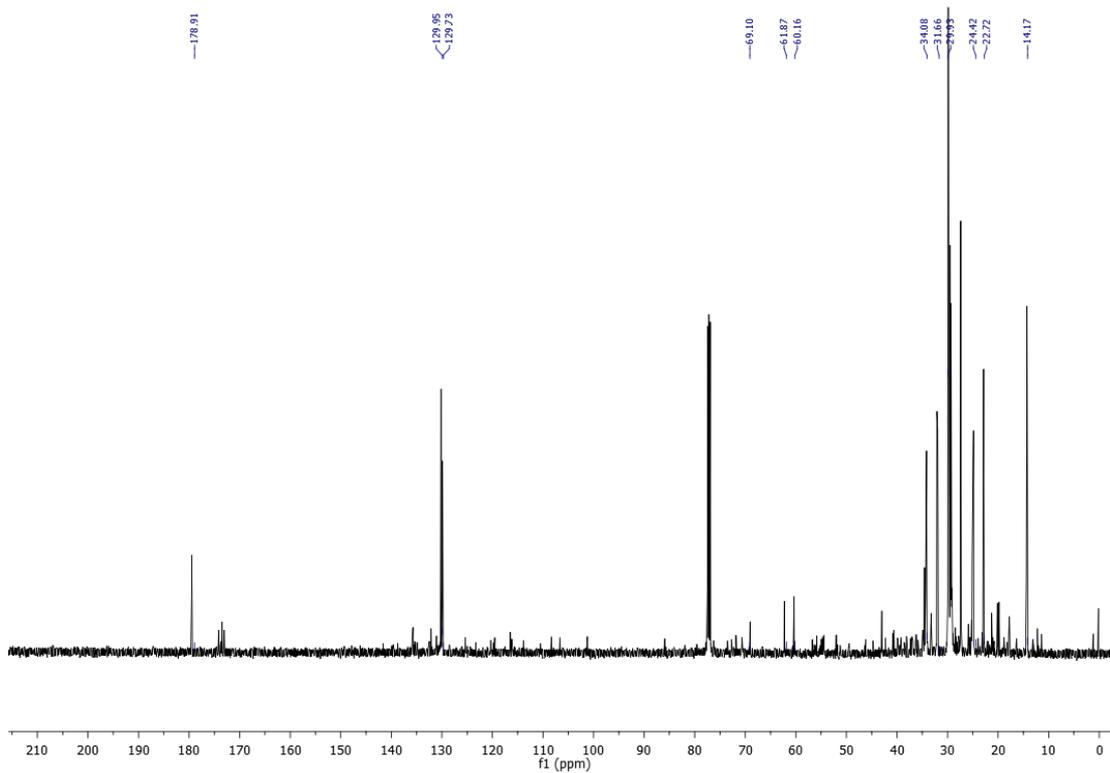


Figura 34: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do produto da reação com FP das furanocumarinas

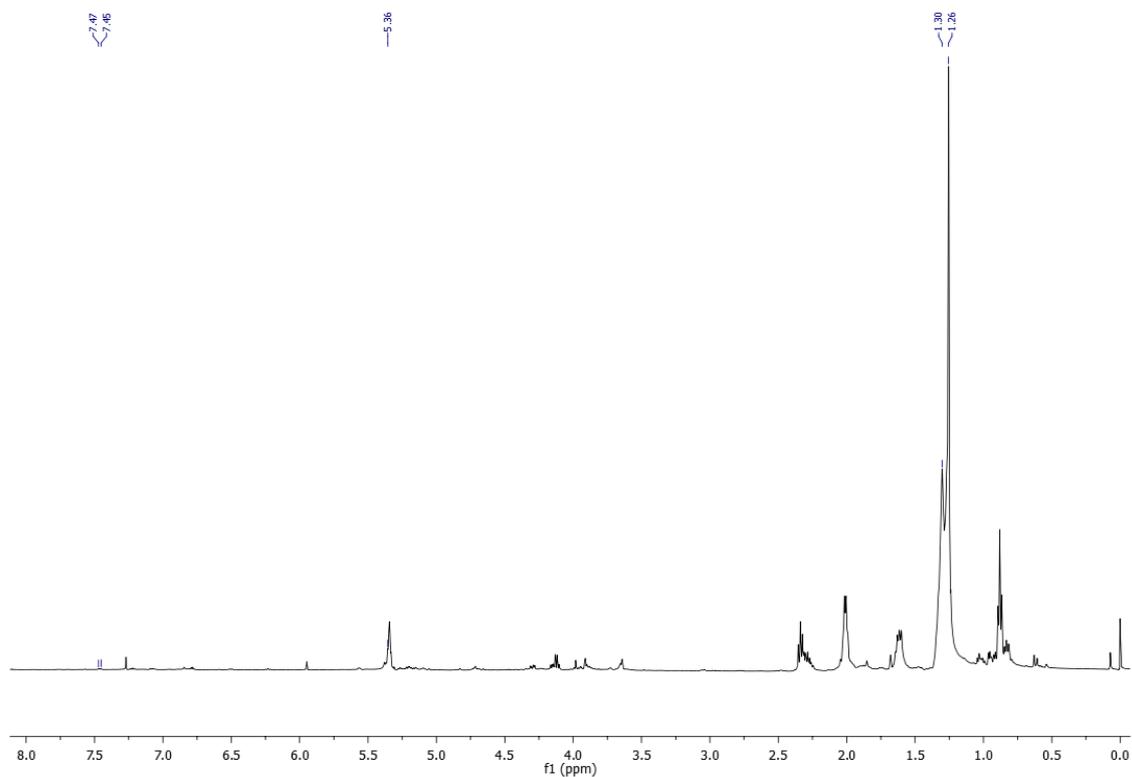


Figura 35: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do produto da reação com FP das furanocumarinas

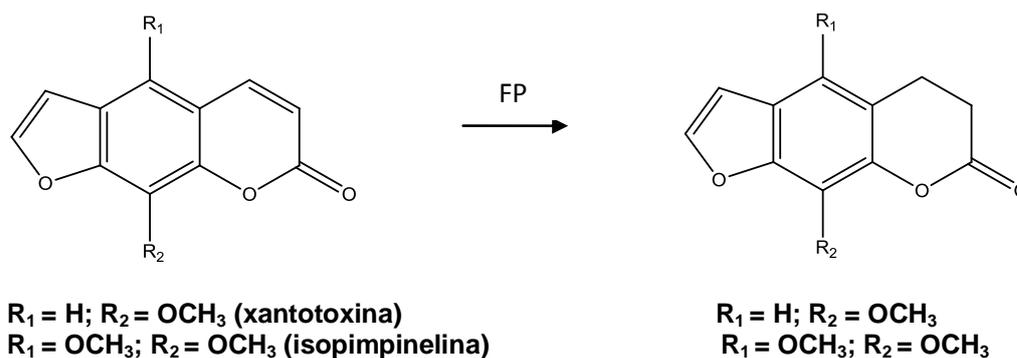


Figura 36: Estruturas obtidas da reação de biotransformação com o FP

4.2.2.5 Análises dos cromatogramas de íons totais dos produtos da redução das furanocumarinas

No cromatograma de íons totais (Figura 37) do produto da redução por via química podem ser observados os picos com m/z 216 e m/z 246 (Figuras 38 e 39) compatíveis com as estruturas da xantoxina e da isopimpinellina. Não sendo possível observar os sinais relativos aos produtos da redução.

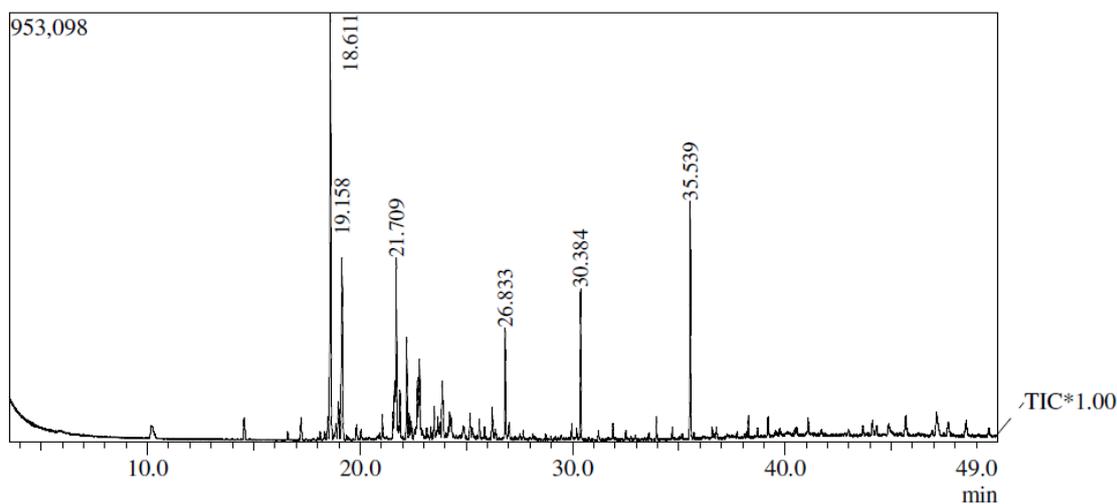


Figura 37: Cromatograma do produto da redução por $NaBH_4$ das furanocumarinas

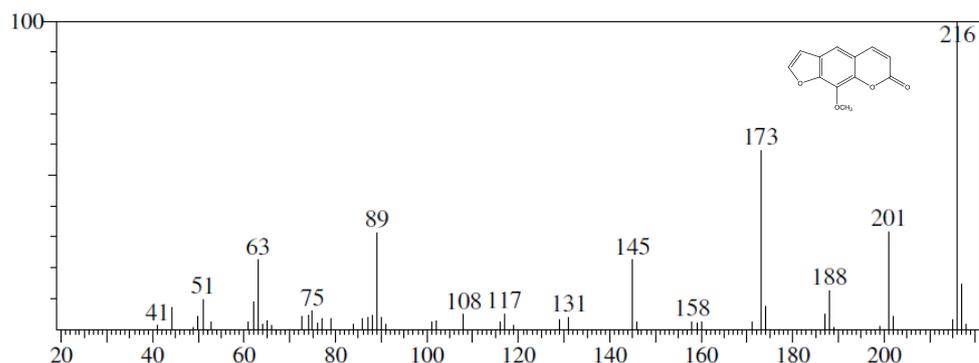


Figura 38: Espectro de massa do produto da reação NaBH_4 no TR 26,83 minutos

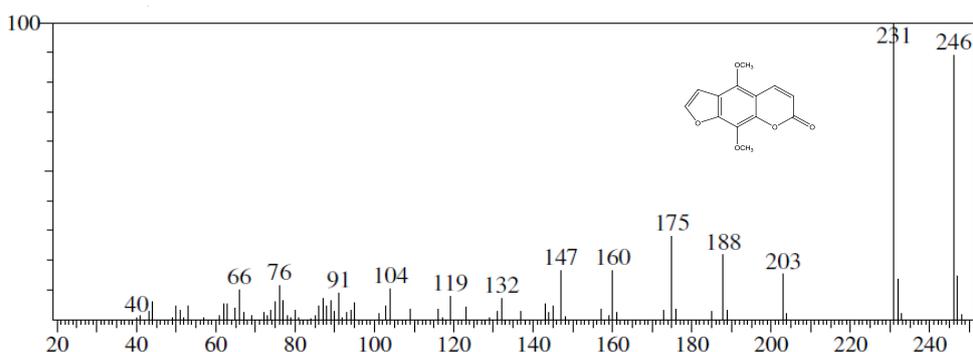


Figura 39: Espectro de massa do produto da reação NaBH_4 no TR 30,38 minutos

O cromatograma de íons totais (Figura 40) do produto da redução por via biológica revela que foram extraídos, ácidos graxos e seus ésteres oriundos, provavelmente, da membrana da levedura. Observa-se picos com m/z 256, m/z 282, m/z 284, m/z 310 e m/z 312, (Figuras 41,42, 43, 44 e 45), compatíveis com as fórmulas moleculares $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$ (ácido palmítico), $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$ (éster etílico do ácido palmítico), $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_2$ (éster etílico do ácido oleico) e $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}_2$ (ácido esteárico). No TR 36,55 minutos pode ser observado a presença do produto reduzido com FP. O material de partida não é observado, possivelmente por efeito da matriz podendo estar na região entre 27-29 minutos. Estes espectros corroboram com os dados de RMN ^1H e ^{13}C .

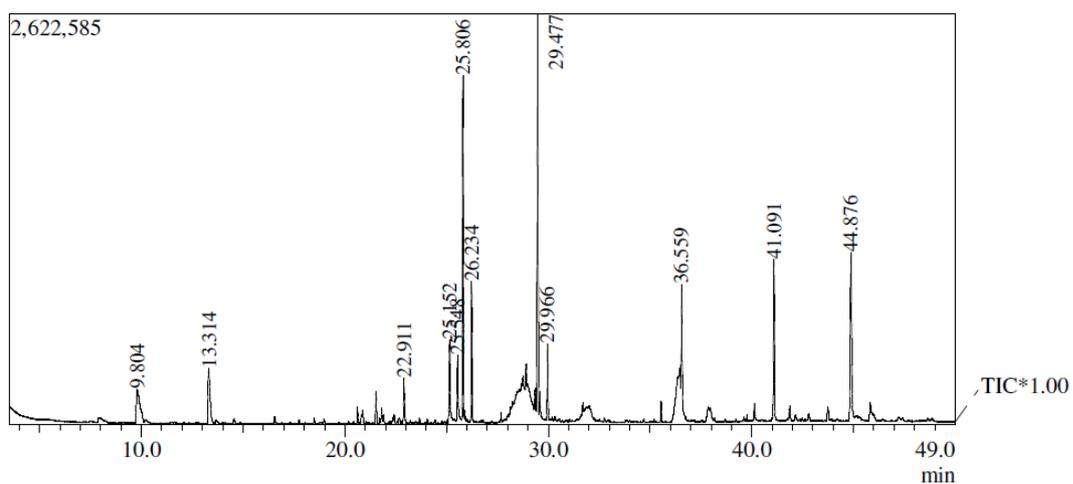


Figura 40: Cromatograma do produto da reação por FP das furanocumarinas

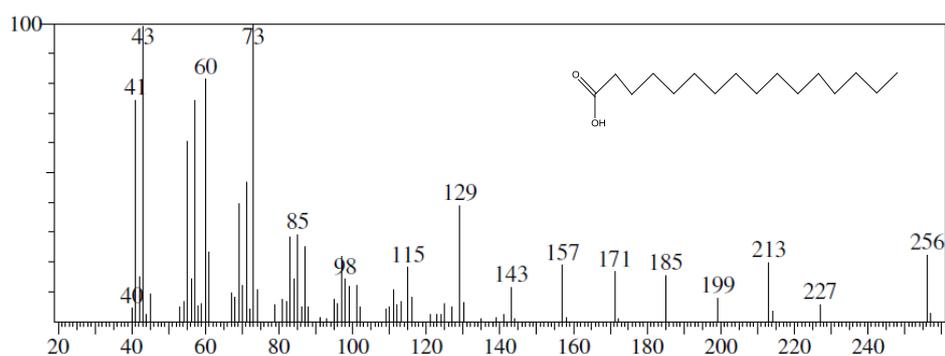


Figura 41: Espectro de massa do produto FP no TR 25,55 minutos

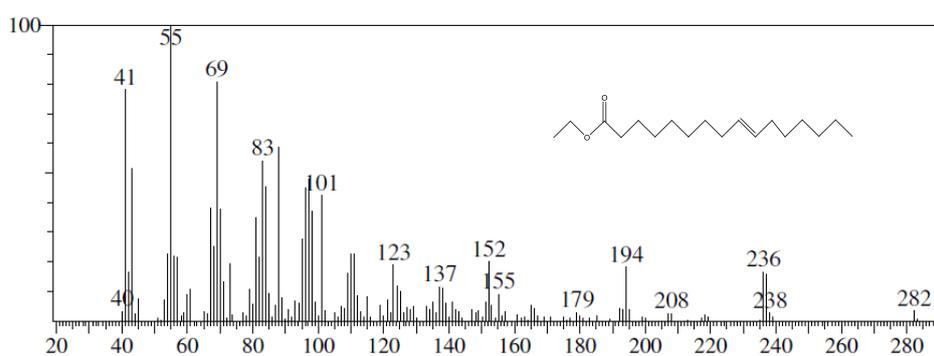


Figura 42: Espectro de massa do produto FP no TR 25,81 minutos

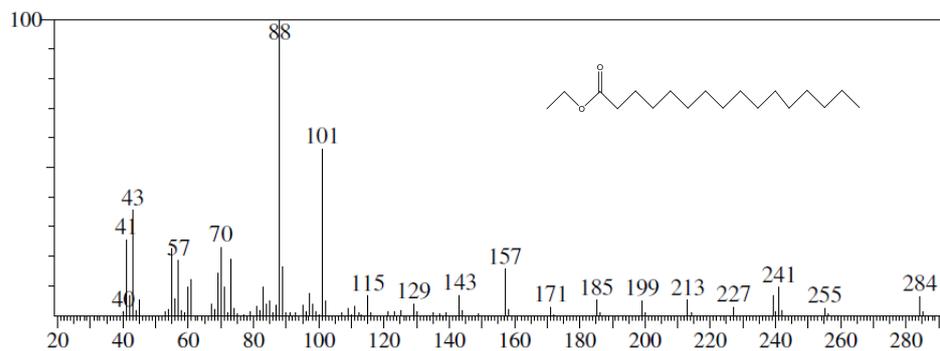


Figura 43: Espectro de massa do produto FP no TR 26,24 minutos

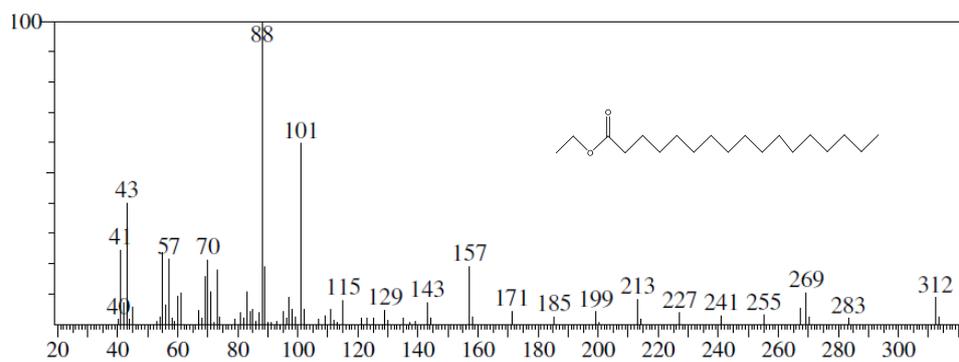


Figura 44: Espectro de massa do produto FP no TR 29,97 minutos

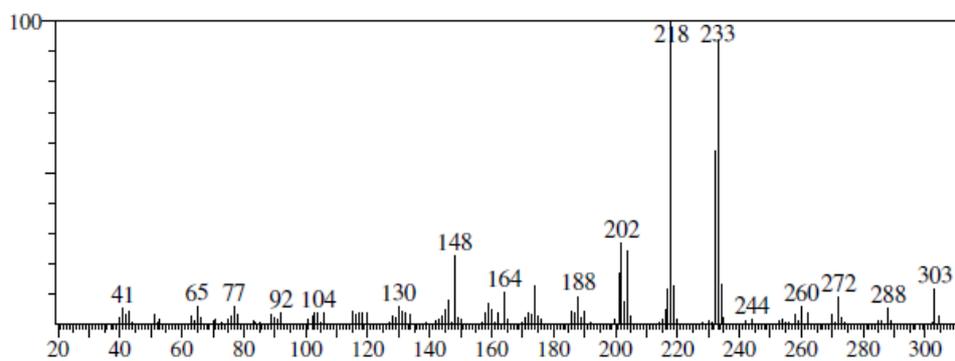


Figura 45: Espectro de massa do produto FP no TR 36,55 minutos

4.2.3 Piranocumarina

4.2.3.1 Análise por CCD

Para acompanhamento das reações de redução foram realizadas CCD tendo como eluente a mistura hexano:acetato (4:1). A CCD foi observada no UV e exposta ao iodo, o material de partida (piranocumarina) (1); produto da reação FP (2) e o produto da reação NaBH_4 (3). O produto pela via biológica ocorreu uma alteração ao se comparar com o material de partida indicando uma redução da piranocumarina, Figura 46.

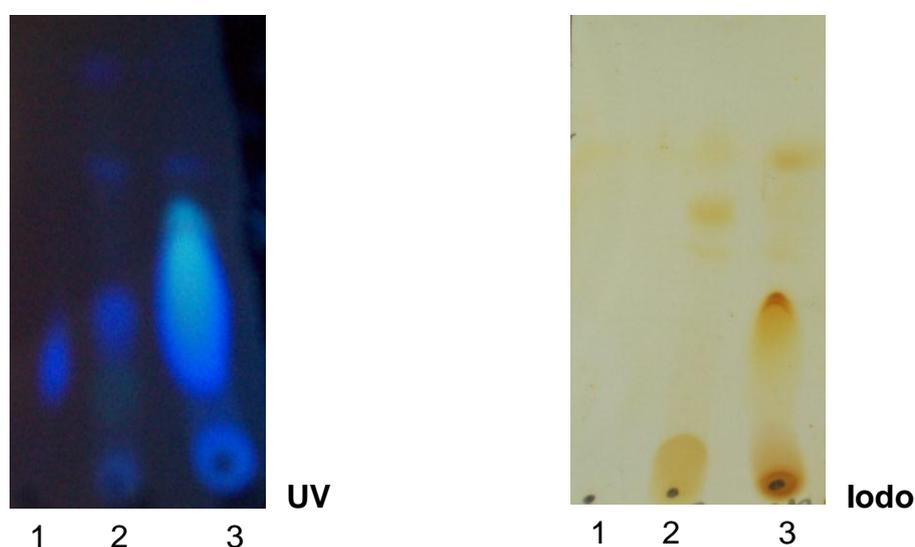


Figura 46: CCD dos produtos das reações com FP e NaBH_4 da piranocumarina

4.2.3.2 Análises dos cromatogramas por CLAE

Os cromatogramas por CLAE do material de partida e dos produtos da reação com FP e NaBH_4 podem ser observados no comprimento de onda 365 nm. Estes cromatogramas apresentam há não formação do produto através da redução por NaBH_4 e baixo rendimento na formação do produto na reação com FP (Figuras 47, 48 e 49). O produto da reação com FP pode ser observada através das análises dos espectros de CG/EM e RMN ^{13}C .

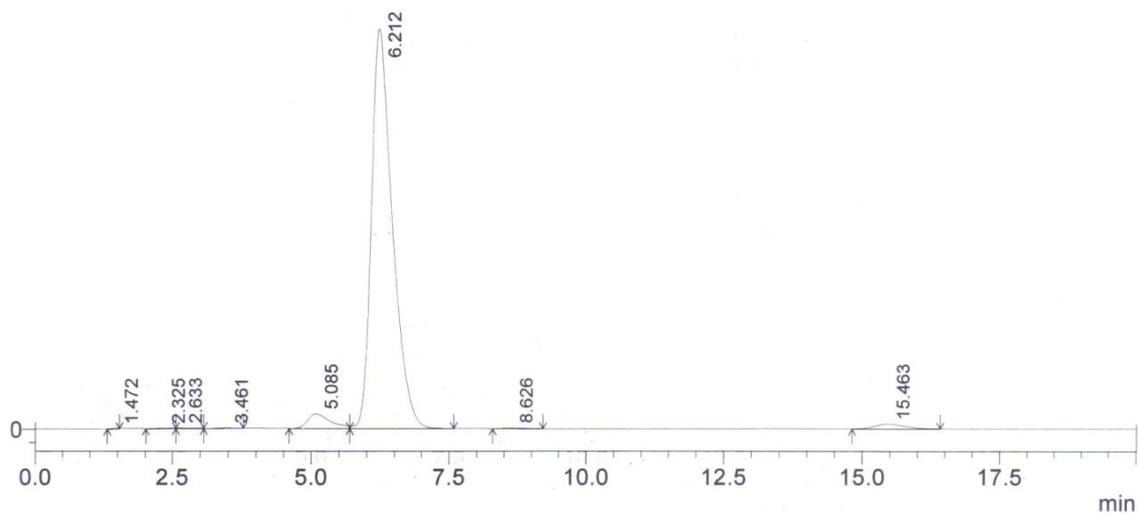


Figura 47: Cromatograma observado em 365 nm da piranocumarina

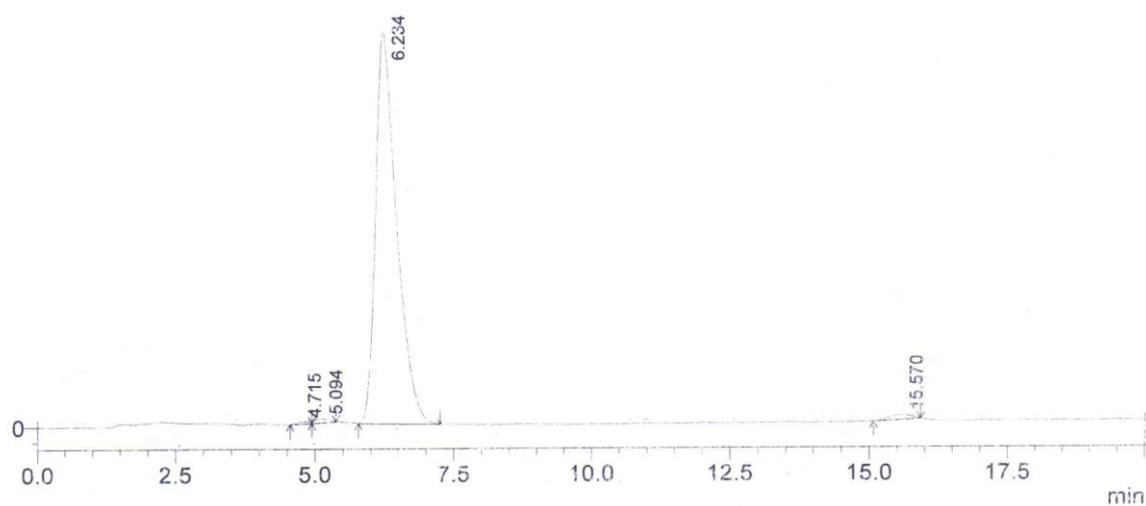


Figura 48: Cromatograma observado em 365 nm do produto da reação com FP da piranocumarina

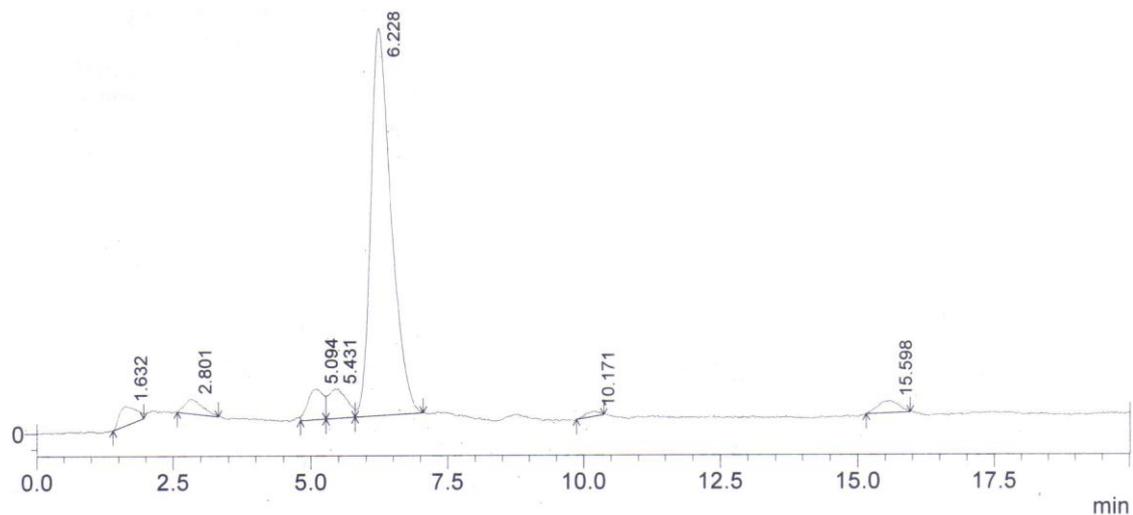


Figura 49: Cromatograma observado em 365 nm do produto da reação com NaBH_4 da piranocumarina

4.2.3.3 Análises dos espectros de RMN

Após fracionamento e purificação do extrato hexânico das raízes de *M. mollis* as frações obtidas foram realizadas análises a partir dos dados de RMN e comparados com a literatura.

O espectro de RMN ^1H (Figura 50) revelou a presença de dois dubletos em δ 7,53 ($J = 9,5$ Hz) e δ 6,16 ($J = 9,5$ Hz) referentes os hidrogênios da ligação dupla do anel benzopirona. Outros dois dubletos podem ser observados em δ 6,78 ($J = 10,0$ Hz) e δ 5,68 ($J = 10,0$ Hz) característicos do anel pirano um singlete em δ 6,73 referente ao hidrogênio H5 ligado no anel aromático e singlete em δ 3,82 atribuído aos hidrogênios de metoxila. O outro singlete em δ 1,45, integrando para 6 hidrogênios, atribuído as duas metilas ligadas ao anel pirano estes dados corroboram para identificação estrutural da brailina conforme comparação na literatura Randrianariveojosia e colaboradores (2005).

A partir do espectro do material de partida pode ser realizado uma comparação com os produtos das reações com FP e NaBH_4 . Inicialmente, analisando o espectro do produto da reação com NaBH_4 pode ser observado no espectro RMN ^1H (Figura 51) δ 7,58 e δ 6,26 ($J = 10,0$ Hz) referente ao hidrogênio pirano e um singlete δ 6,78 do hidrogênio do anel aromático, da região do pirano os sinais δ 6,90 e δ 5,74 ($J = 10,0$ Hz) e da metila em δ 3,90 e duas metilas em δ 1,56 do singlete. Com análises nestes resultados de próton e as informações no RMN ^{13}C (Figura 52 e tabela 4) pode-se afirmar que na reação com NaBH_4 não se obteve produto reduzido, isto se deve, provavelmente, baixa solubilidade ao metanol.

Os dados de RMN ^1H (figura 53), da via biológica mostraram sinais de dois dubletos referente à ligação dupla do anel benzopirona em δ 7,58 ($J = 10,0$ Hz) e δ 6,26 ($J = 10,0$ Hz) e os sinais “residuais” na região aromática dos hidrogênios do anel pirano δ 6,90 ($J = 10,0$ Hz) e δ 5,76 ($J = 10,0$ Hz), dos singletos em δ 6,78 integrando para um hidrogênio do anel aromático e em δ 3,90 atribuído aos hidrogênios da metoxila e além do singlete em δ 1,53 integrando para 6 hidrogênios atribuído as duas metilas do anel pirano. Este resultado não apresenta como indicativo de ocorrência de redução biológica, já

que se repetiu praticamente os mesmos sinais, no entanto ao se observar os sinais nas regiões de multipletos na região entre δ 2,00- δ 2,40, que pode ser dos hidrogênios do pirano ou da lactona. Então, propondo que tenha ocorrido redução, mas com baixo rendimento, o que pode ser observado no RMN ^{13}C (figura 54). Estes dados inferem na identificação da estrutura 3',4'-dihidrobrailina, quadro 3, conforme descrito em Um e colaboradores (2003).

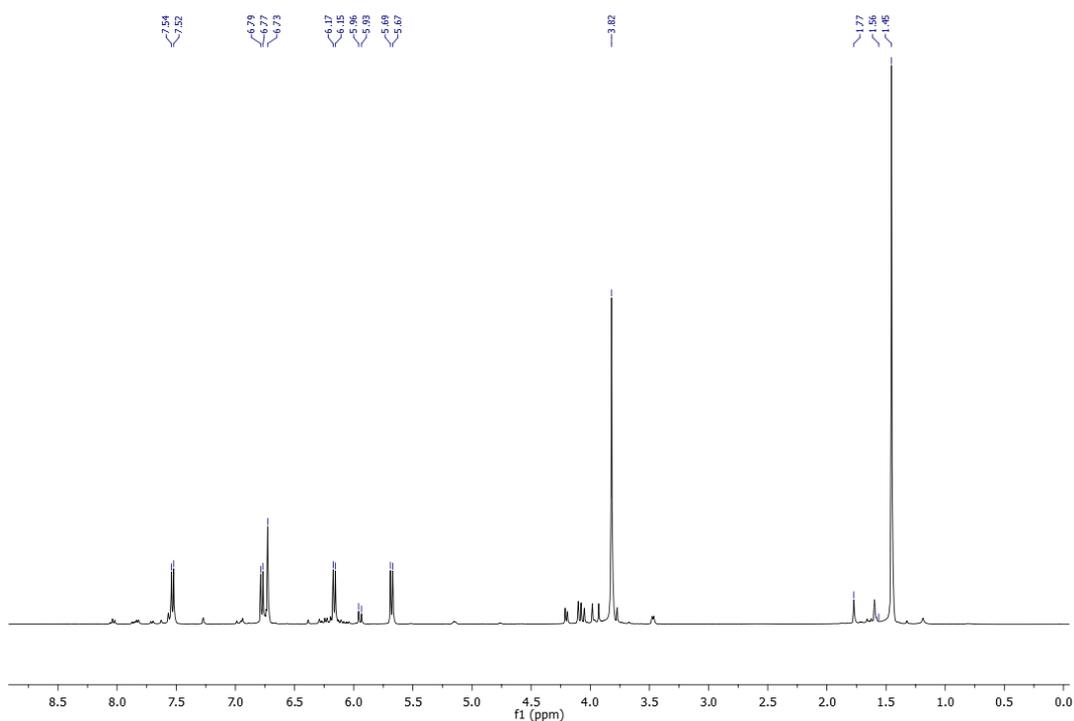


Figura 50: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da piranocumarina

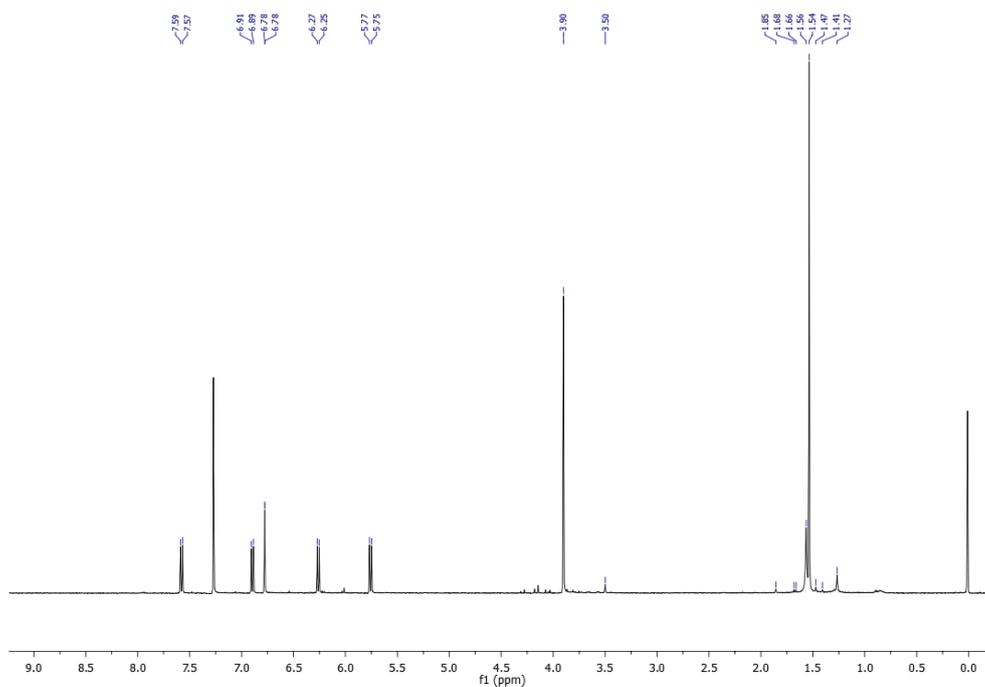


Figura 51: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do produto da reação com NaBH_4 da piranocumarina

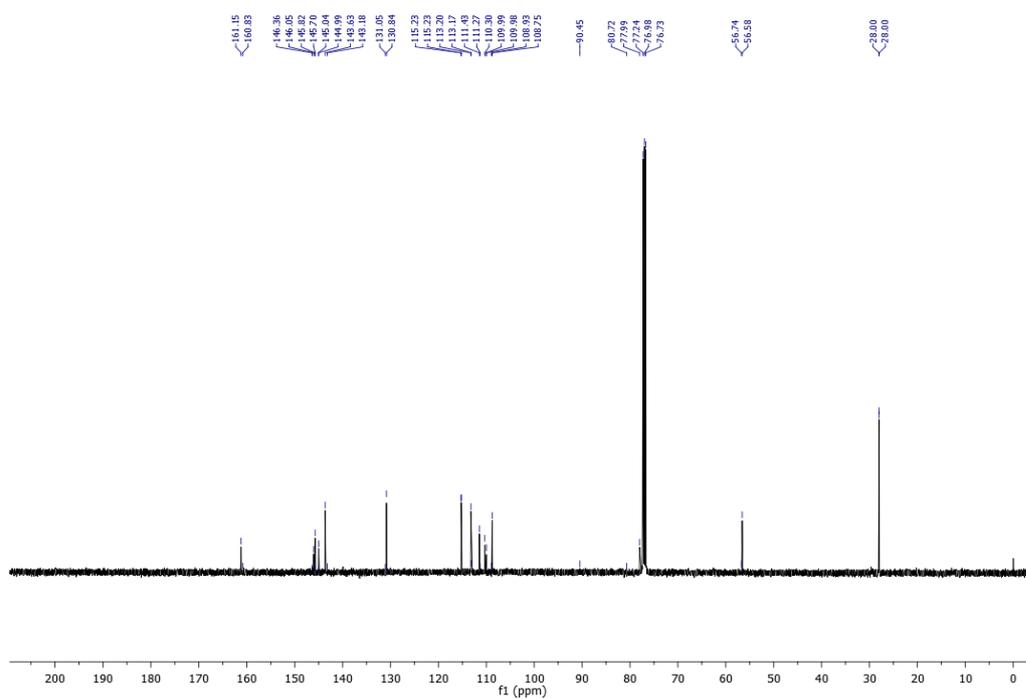


Figura 52: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do produto da reação com NaBH_4 da piranocumarina

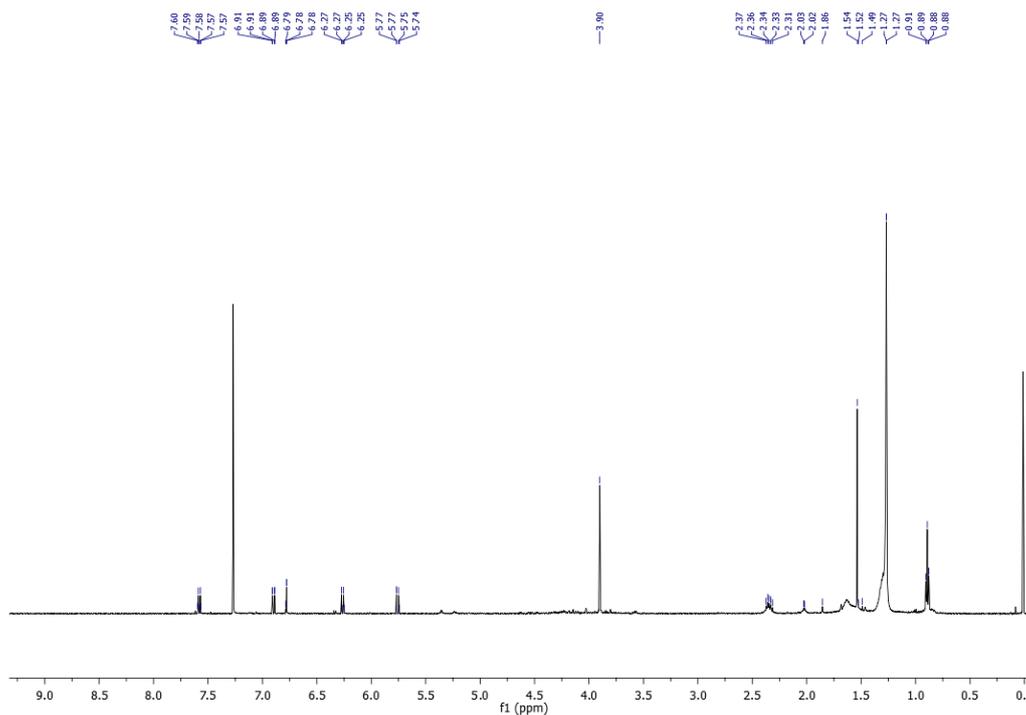


Figura 53: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do produto da reação com FP da piranocumarina

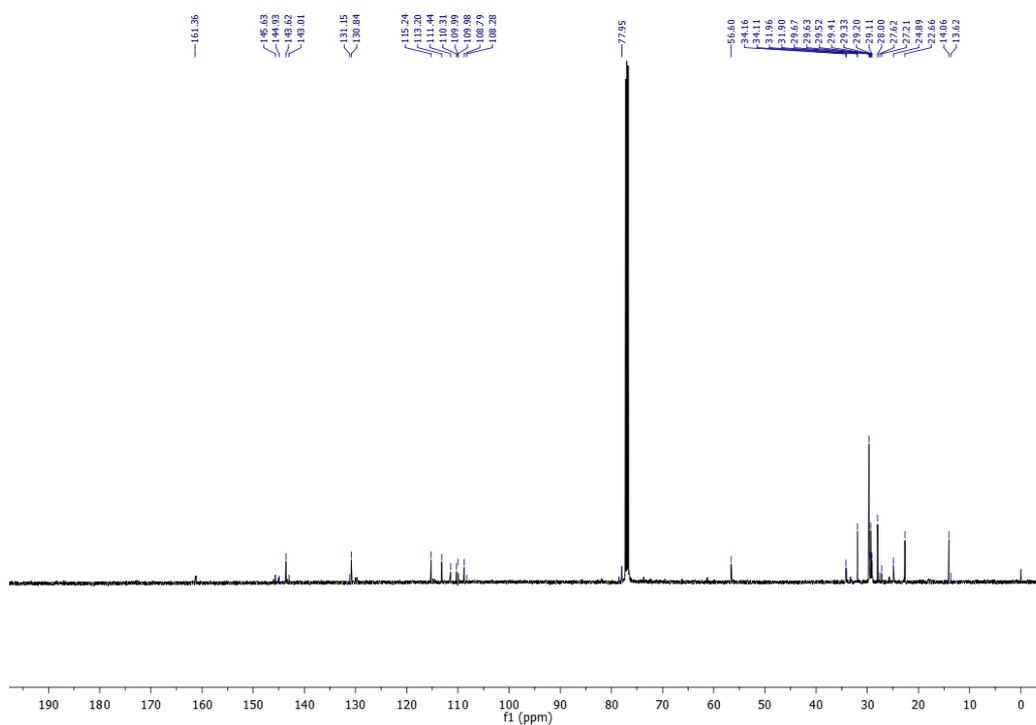


Figura 54: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do produto da reação com FP da piranocumarina

Tabela 4: Dados de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) da brailina e dos produtos das reações com FP e NaBH_4 (125 MHz, CDCl_3)

Posição	brailina	FP	NaBH_4
C2	163,4	161,4	161,2
C3	113,4	113,2	113,2
C4	146,3	143,6	145,0
C4a	113,2	115,2	113,2
C5	110,5	106,8	110,3
C6	146,6	144,9	145,7
C7	147,3	145,6	146,1
C8	111,1	130,8	111,3
C8a	146,7	131,4	143,2
C1'	115,7	22,7	115,2
C2'	132,5	31,9	130,1
C3'	79,1	78,0	80,7
C4'/5'- Me	28,1	29,7	28,0
OMe	56,9	56,6	56,5

4.2.3.4 Análises dos cromatogramas de íons totais dos produtos da redução da piranocumarina

Nos cromatogramas de íons totais das substâncias isoladas na fração MMH (Extrato hexânico *M. mollis*) (Figura 55) pode ser observado um pico majoritário do material de partida compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_4$ sendo compatível com a substância brailina. No TR 26,85 minutos em m/z 216 a partir da fragmentação pode-se inferir que esta substância é a xantotoxina. No TR 27,23 minutos em m/z 220 e o pico de 192 indicando a substância 6-metoxi-7,8-metilenodioxo-6-metoxicumarina. Em TR 30,49 minutos com m/z 252 e o pico base 250 indicando a substância 5,6-metilenodioxo-7,8-dimetoxicumarina e no TR 31,14 minutos em m/z 274, provavelmente, um éoxido, 4-metoxi-2,2-dimetil-1a,2-dihidrooxireno[2,3-c]pirano[2,3-f]cromen-8(9*cH*)-ona, provavelmente, um artefato proveniente do processo de purificação. Os espectros podem ser observados nas figuras 55, 56, 57, 58 e 59.

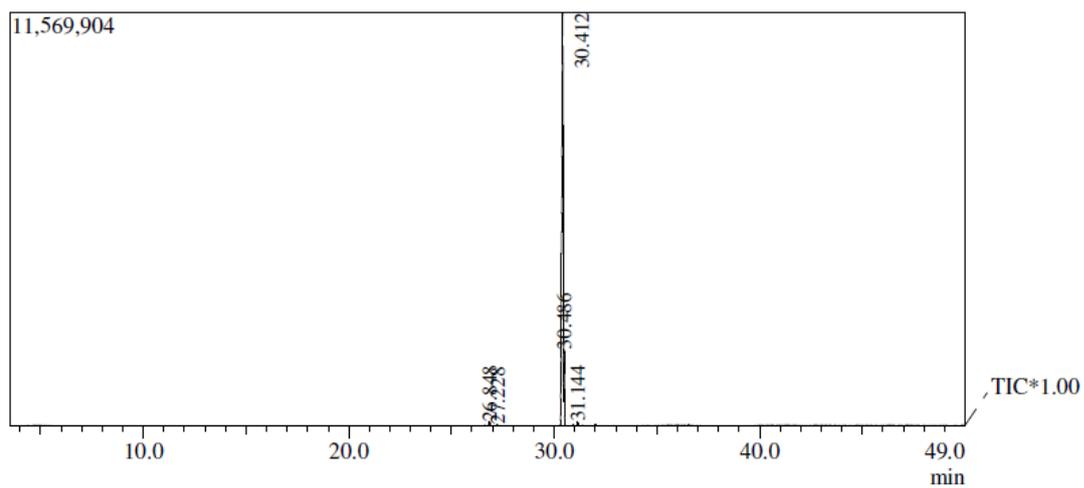


Figura 55: Cromatograma da fração de MMH

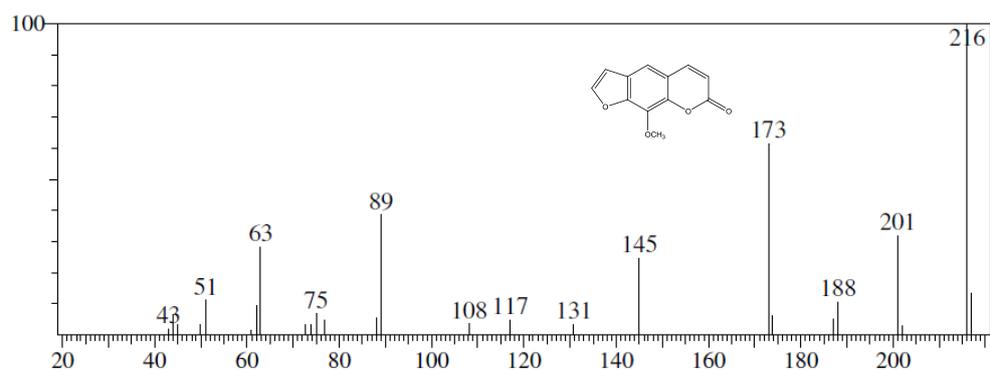


Figura 56: Espectro de massa da fração de MMH no TR 26,85 minutos

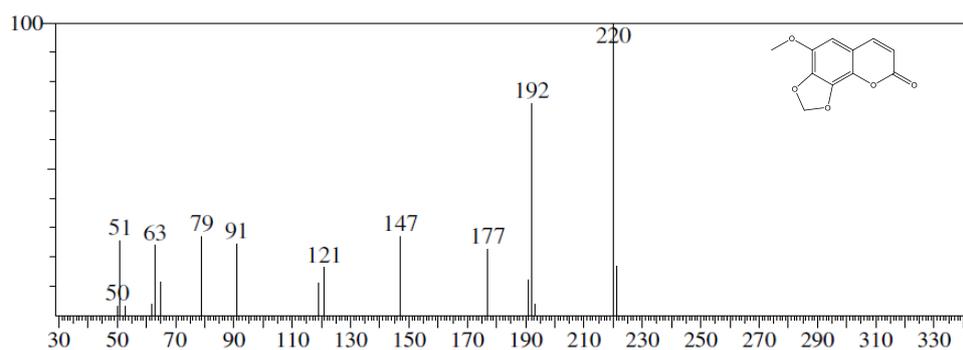


Figura 57: Espectro de massa da fração de MMH no TR 27,23 minutos

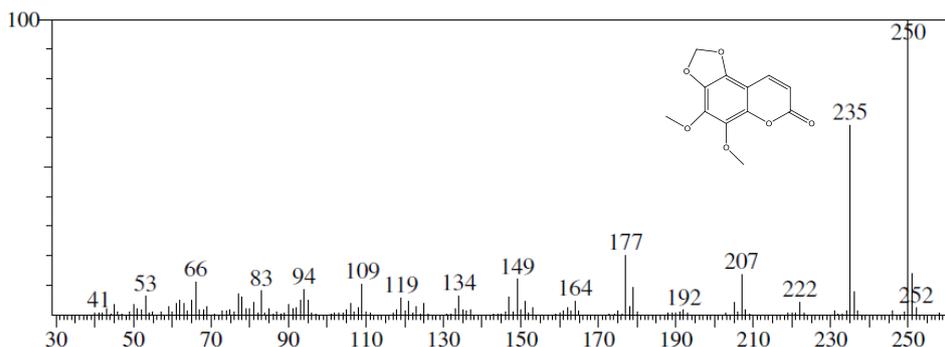


Figura 58: Espectro de massa da fração de MMH no TR 30,49 minutos

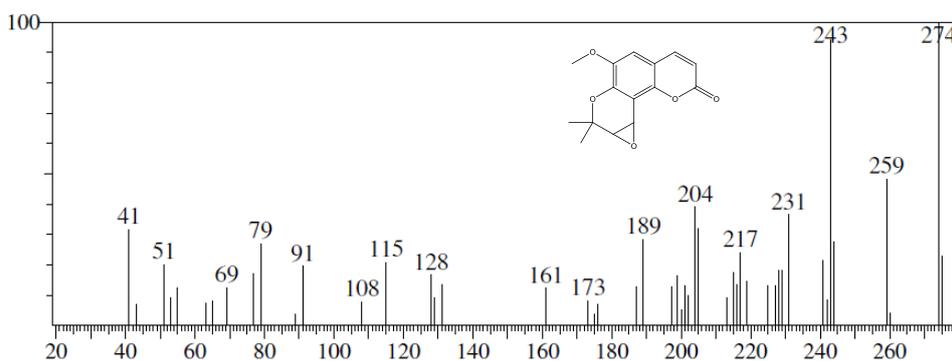


Figura 59: Espectro de massa da fração de MMH no TR 31,14 minutos

No espectro de massa do produto da redução por via química (Figura 60) pode ser observado a presença um pico com íon molecular m/z 258 e pico base em m/z 243 compatível com a fórmula molecular $C_{15}H_{14}O_4$. Seu espectro de massa apresenta fragmentação com perda de uma metila em 243 m/z e outra em 228 m/z e perda C_2H_3O em 215 m/z (Figura 61), sendo compatível com a estrutura da brailina e sendo condizente com descrito em Barnes e colaboradores (1964), cuja proposta de fragmentação está apresentada no esquema 4. No TR 30,51 minutos em m/z 253 e com pico base em m/z 250 identificada à substância 5,6-metilenodioxo-7,8-dimetoxicumarina, no qual seu espectro de fragmentação mostra perda de metila e CO (Figura 62) e corrobora com os dados de RMN¹³C.

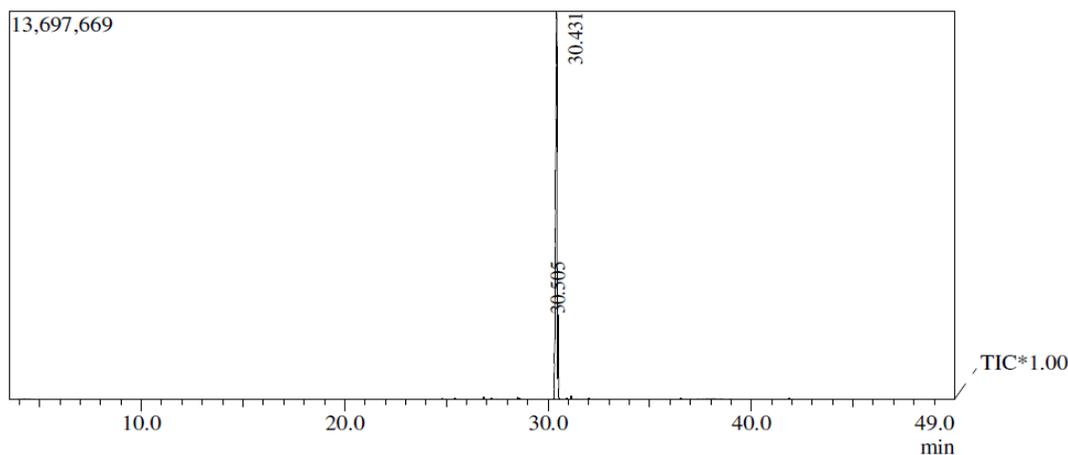


Figura 60: Cromatograma do produto da redução com NaBH_4 da piranocumarina

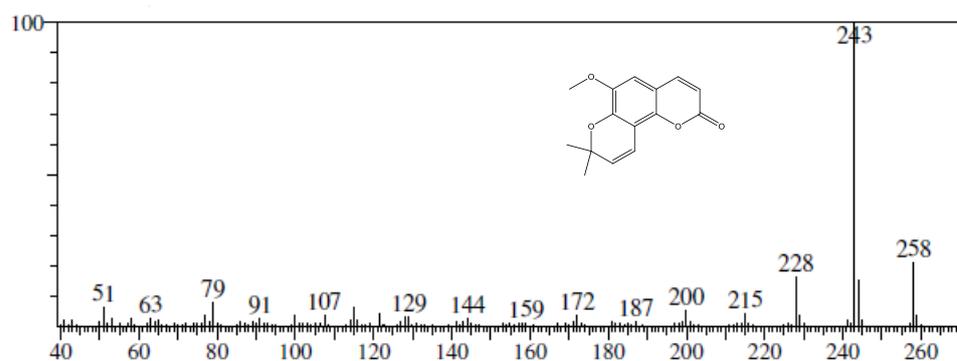


Figura 61: Espectro de massa do produto NaBH_4 no TR 30,43 minutos

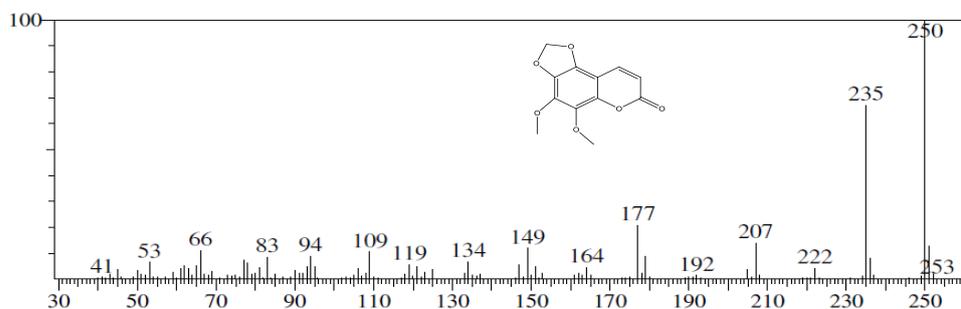


Figura 62: Espectro de massa do produto NaBH_4 no TR 30,51 minutos

Analisando o espectro de massa do produto da redução com FP (Figura 63) pode ser observado íon molecular m/z 260 e pico base m/z 245 compatível com fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_4$ a substância 3',4' - dihidrobrailina, quadro 3, com uma insaturação a menos da brailina (Figura 64). Seu espectro de massa apresenta fragmentação com perda de metila, CO e $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$. No pico base m/z 243 TR 30,33 minutos com o pico em m/z 258 identificada como a substância brailina (Figura 65). A substância 5,6-metilenodioxi-7,8-dimetoxicumarina foi

identificada no TR 30,43 minutos com íon molecular em m/z 250 e pico base m/z 245 (Figura 66). Estes espectros confirmam com os dados de RMN ^1H e ^{13}C do produto reduzido a partir do FP.

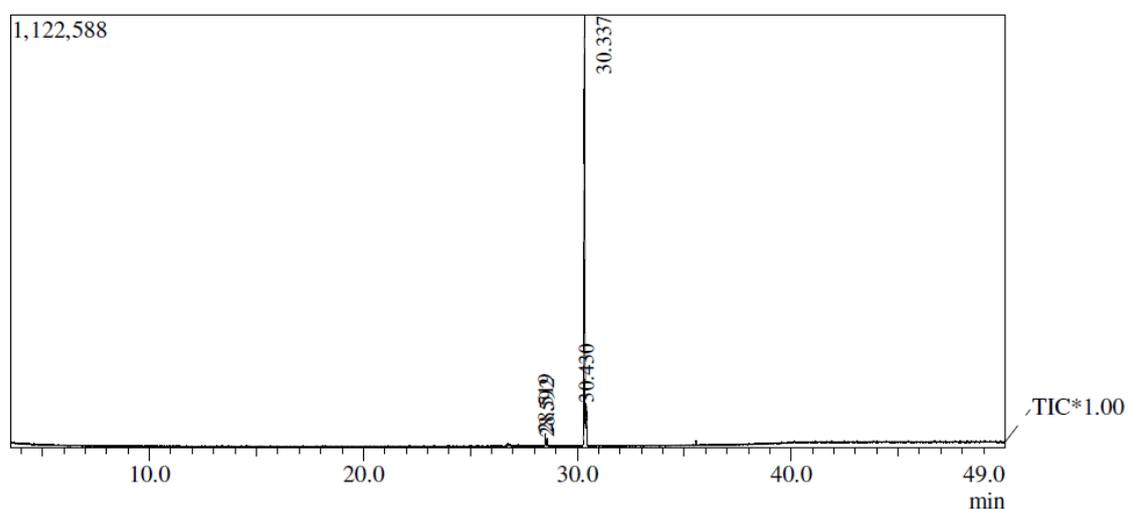


Figura 63: Cromatograma do produto da redução com FP da piranocumarina

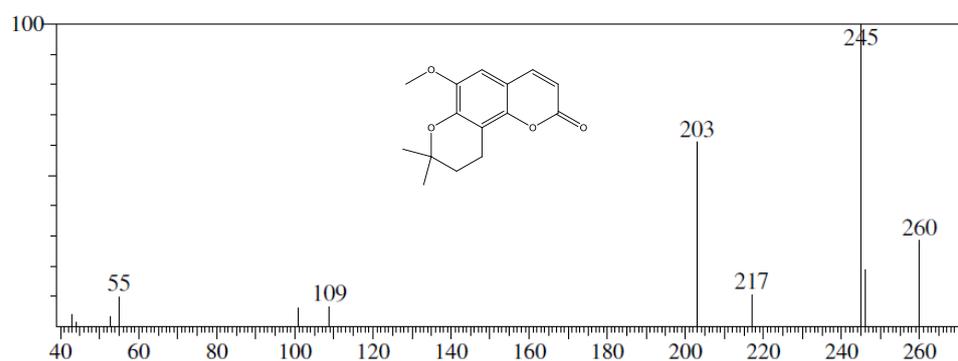


Figura 64 Espectro de massa do produto FP no TR 28,52 minutos

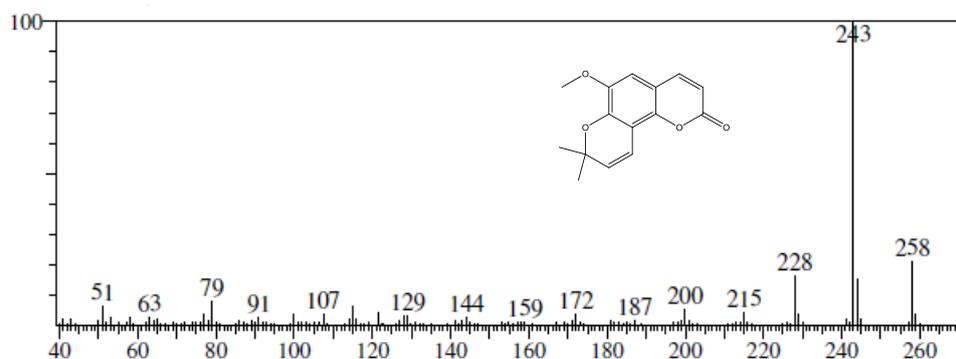


Figura 65: Espectro de massa do produto FP no TR 30,33 minutos

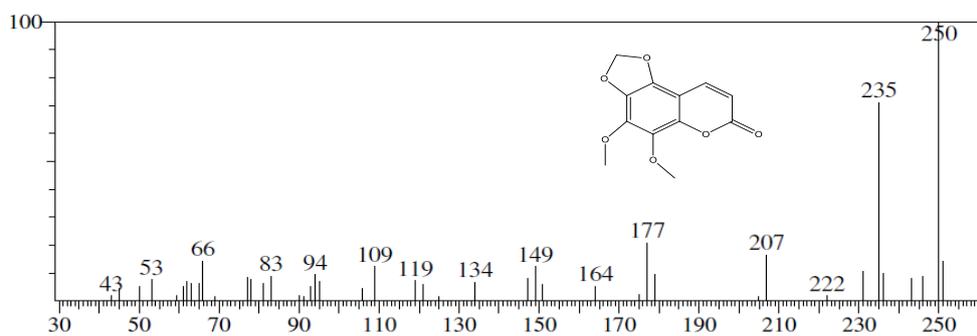
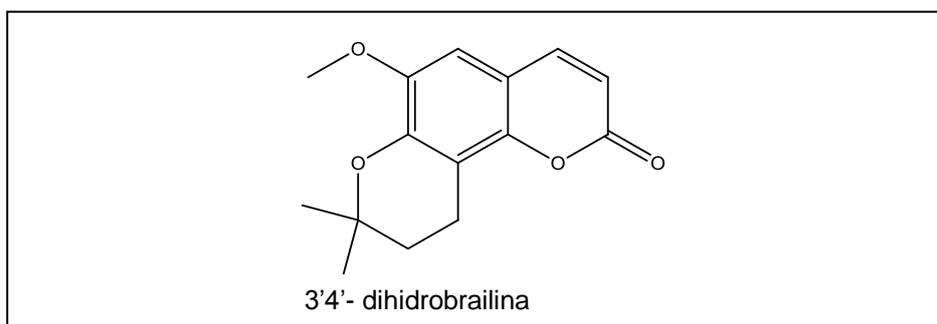
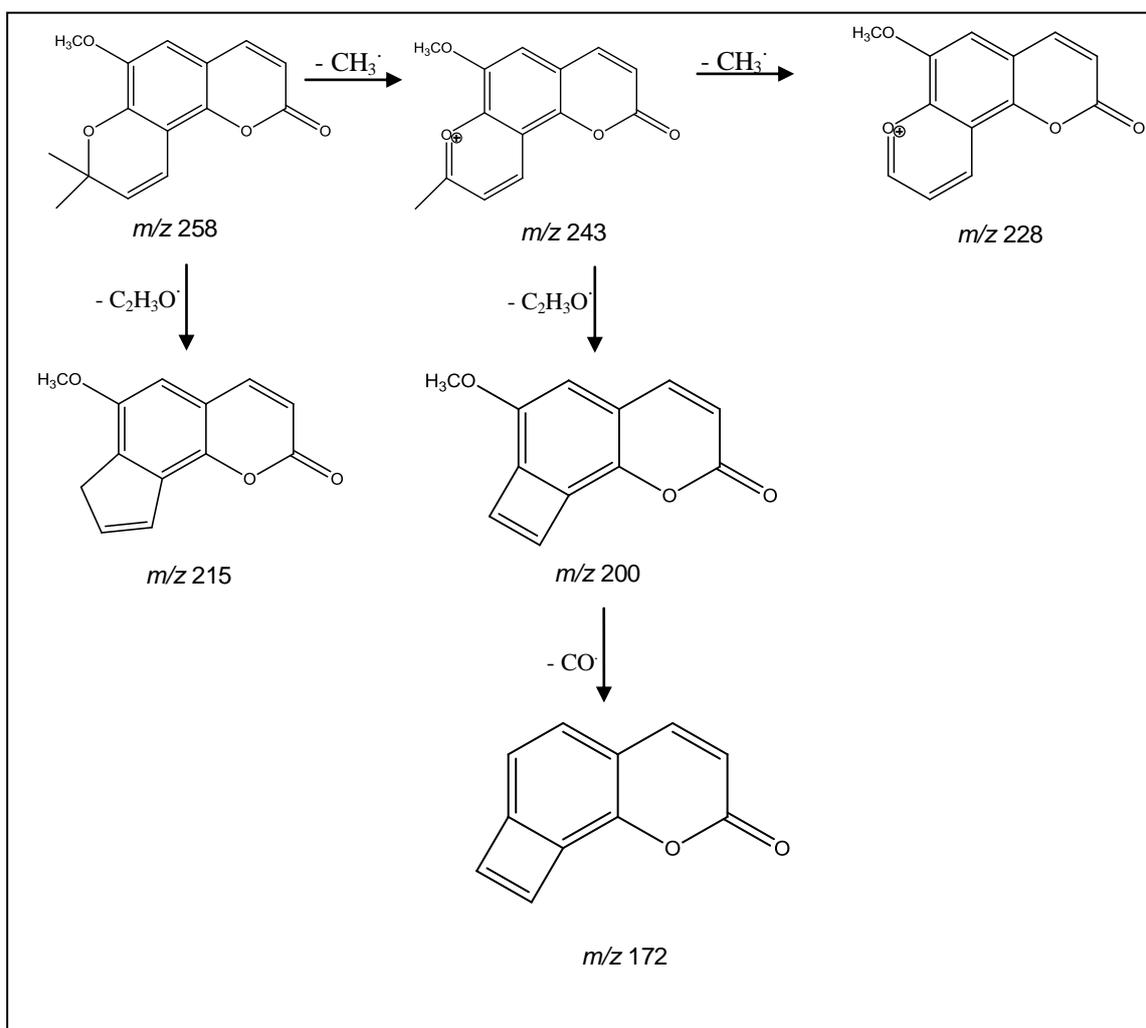


Figura 66: Espectro de massa do produto FP no TR 30,43 minutos

Quadro 3: Estrutura do produto obtido da reação com FP da brailina



Esquema 4: Proposta de fragmentação da brailina

5. Conclusões

O sistema bifásico utilizado para as biorreduções com *S. cerevisiae* se mostrou adequado para xantotoxina, isopimpinellina e brailina. Embora a baixa solubilidade desses substratos em água e no co-solvente utilizado tenha permitido apenas baixos rendimentos na redução pretendida.

As reações de redução com borohidreto de sódio das furanocumarinas se mostraram eficientes, apesar do baixo rendimento, também em função da solubilidade. Na piranocumarina não foi observada a redução devido a baixa solubilidade da brailina com o solvente usado para a reação.

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM) foi uma ferramenta importante para a caracterização dos produtos e contaminantes provenientes da reação com fermento de pão. Esta técnica permitiu a identificação do lactol formado a partir das furanocumarinas e dos ácidos palmítico, esteárico e de seus ésteres etílicos. Da fração rica em brailina utilizada para a biotransformação foi caracterizado a 3'4'-dihidrobrailina.

Através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi possível fazer uma análise qualitativa dos produtos obtidos das reações com fermento de pão nas cumarinas. A combinação da CLAE, CG/EM com ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13 (RMN ^1H e ^{13}C) possibilitou analisar os produtos formados pelas reações com fermento de pão e NaBH_4 mesmo com os baixos rendimentos obtidos.

Este trabalho descreve pela primeira vez a ocorrência da piranocumarina brailina e a 5-6-metilenodioxo-7,8-dimetoxicumarina na espécie *M. mollis* e o seu uso para a biotransformação.

Este método se constitui numa alternativa para a biorredução de carbonilas em sistemas α , β insaturados cíclicos, como furano e pirano cumarinas, embora os rendimentos ainda possam ser otimizados.

6. Perspectivas

Este trabalho é inovador na pesquisa desenvolvida no laboratório e pode contar com resultados promissores. Então, para a continuidade deste estudo sugerem-se as seguintes perspectivas:

1. Otimizar as condições para aumentar o rendimento dos produtos obtidos nas reações com fermento de pão.
2. Fazer um comparativo entre *S. cerevisiae* sólida e líquida para avaliar a ocorrência de redução e o rendimento desta produção.
3. Avaliar a atividade biológica dos produtos obtidos nas reações de biotransformação de cumarinas em células gliais realizando um comparativo dos substratos não reduzidos.
4. Continuar com isolamento de cumarinas de *M. mollis* para conhecer melhor a química desta espécie, que é desconhecida, e utilizar como substrato, para as biotransformações.

Referências

AGUIERRE-PRANZONI, CB; FURQUE, GII; ARDANAZ, CE; PACCIARONI, A; SOSA, V; TONN, CE; KURINA-SANZ, M. Biotransformation of dihydrocoumarin by *Aspergillus niger* TCC 11394. *Organic Chemistry in Argentina, ARKIVOC*, 2011, 7:170-181.

BAETAS, ACS; ARRUDA, MSP; MÜLLER, AH; ARRUDA, AC. Coumarins from *Metrodorea flavida*. *Phytochemistry*, 1996, 3:491- 493.

BAETAS, ACS; ARRUDA, MSP; MÜLLER, AH; ARRUDA, AC. Coumarins and alkaloids from the stems of *Metrodorea flavida*. *Journal Brazilian Chemistry Society*, 1999, 10:181-183.

BARNES, CS; OCCOLOWITZ, JL. The mass spectra of some naturally occurring oxygen heterocycles and related compounds. *Australian Journal Chemistry*, 1964, 17, 975-986.

BEATRIZ, A, LIMA, DP; MARQUES, MR. MARQUES, M.R. Biotransformações com Microrganismos em Mato Grosso do Sul: Histórico e Perspectivas. *Revista Ágora*, 2005, 1:1-12.

BORGES, KB; CORGES, WS; DÚRAN-PATRÓN, R; PUPO, MT; BONATO, PS; COLLADO, IG. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2009, 20:385-397.

CHIN-JOE, I; STRAATHOF, AJJ; PRONK, JT; JONGEJAN, JA; HEIJNEN, JJ. Influence of the ethanol and glucose supply rate on the rate and enantioselectivity of 3-oxo ester reduction by baker's yeast. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001,75:29-38.

DETONI, CB; CABRAL-ALBUQUERQUE, ECM; HOHLEMWEGER, SVA; SAMPAIO, C; BARROS, TF; VELOZO, ES. Essential oil from *Zanthoxylum*

tingoassuiba loaded into multilamellar liposomes useful as antimicrobial agents. *Journal of Microencapsulation*, 2009, 26:684-691.

EL-BACHA, RS; MADUREIRA, D; HOHLEMWERGER, SVA; VELOZO, ES. A cell-based assay for drug discovery by using glioma cells and astrocytes. *The 8th Annual Congress of 2010*. Beijing China, 2010.

ELGAMAL, MHA; ELEWA, NH; ELKHRISY, EAM; DUDDECK, H. ¹³C NMR chemical shifts and carbon-proton coupling constants of some furanocoumarins and furanochromones. *Phytochemistry*, 1979, 18:139-143.

FABER, K. Biotransformations in Organic Chemistry. *Springer-Verlag*, Berlim, 2011, 6^o ed., 1-423.

FUJIWARA, M; MARUMOTO, S; YAGI, N; MIYAZAWA, M. Biotransformation of Turmerones by *Aspergillus niger*. *Journal of Natural Products*, 2011, 74:86-89.

JULLIAN, V; BOURDY, G; GEORGES, S; MAUREL, S; SAUVAIN, M. Validation of use of a traditional antimalarial remedy from French Guiana, *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, 106:348–352.

HOHLEMWERGER, SVA. *Metabólitos e atividades biológicas de espécies de Zanthoxylum da Bahia*. Tese de Doutorado, Bahia: D.Q.– UFBA, 2010.

HUANG, B; GUO, J; YI, B; YU, X; SUN, L; CHEN, W. Heterologous production of secondary metabolites as pharmaceuticals in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 2008, 30:1121-1137.

HUANG, Y; ZHANG, F; GONG, Y. A convenient approach to (S)-2-ethylhexan-1-ol mediated by baker's yeast, *Tetrahedron Letters*, 2005, 46:7217-7219.

HUDLICKY, T; REED, JW. Applications of biotransformations and biocatalysis to complexity generation in organic synthesis. *Chemical Society Reviews*, 2009, 38:3117-3132.

KHOR, GK; UZIR, MH. *Saccharomyces cerevisiae*: a potent stereospecific reduction tool for biotransformation of mono and sesquiterpenoids. *Yeast*, 2011, 28:93-107.

LAANE, C; BOEREN, S; VOS, K; VEEGER, C. Rules for the optimization of biocatalysis inorganic solvents. *Biotechnology Bioengineering*, 1987, 30:81-87.

LÉON, R; FERNANDES, P; PINHEIRO, HM; CABRAL, JMS. Whole-cell biocatalysis in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998, 23:483-500.

LIU, R; FENG, L; SUN, A; KONG, L. Preparative isolation and purification of coumarins from *Cnidium monnieri*(L.) Cusson by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A.*, 2004,1055-71-76.

MACHADO, LL; SOUZA JSN; MATTOS, MC; SAKATA, SK; CORDELL, GA; LEMOS, TLG. Bioreduction of aldehydes and ketones using *Manihot* species. *Phytochemistry*, 2006, 67:1637–1643.

MARUMOTO, S; MIYAZAWA, M. Biotransformation of bergapten and xanthotoxin by *Glomerella cingulata*. *Journal of agricultural and food chemistry* 2010, 58:7777-7781.

MARUMOTO, S; MIYAZAWA, M. Microbial reduction of coumarin, psoralen, and xanthyletin by *Glomerella cingulata*. *Tetrahedron*, 2011,67:495-500.

MULLER, AH; VIEIRA, PC; SILVA, MFDGF; FERNANDES, JB. Dihydrochalcones, coumarins and alkaloids from *Metrodorea nigra*. *Phytochemistry*, 1995, 40:1797-1800.

NASCIMENTO, MG; ZANATTO, SP; MELEGARI SP. Estudos de proteção da célula de *Saccharomyces cerevisiae* para utilização em reações de redução em meio orgânico. *Química Nova*, 2002, 25:567-571.

NEGI, JS; BISHT, VK; BHANDARI, AK; SINGH, P; SUNDRIYAL, RC. Chemical constituents and biological activities of the genus *Zanthoxylum*: A review. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 2011, 5:412-416.

NESTL, BM; NEBEL, BA; HAUER, B. Recent progress in industrial biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2011, 15:187-193.

PANKE, S; WUBBOLTS, M. Advances in biocatalytic synthesis of pharmaceutical intermediates. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2005, 9:188-194.

PATEL, RN. Enzymatic synthesis of chiral intermediates for Omapatrilat, an antihypertensive drug. *Biomolecular Engineering*, 2001, 17:167-182.

PATEL, RN. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *Coordination Chemistry Review*, 2008, 252:659-701.

PARALES, RE; BRUCE, NC; SCHMID, A; WACKETT, LP. Biodegradation, biotransformation, and biocatalysis. *Applied and environmental microbiology*, 2002, 68:4699-4709.

PEREIRA, RS. Fermento biológico de padaria (*Saccharomyces cerevisiae*) e seu uso em sínteses assimétricas. *Química Nova*, 1995, 18:452-459.

PENELUC, T; DOMINGUE, LF; ALMEIDA, GN; AYRES, MCC; MOREIRA, ELT; CRUZ, ACF; BITTENCOURT, TCBS; ALMEIDA, MAO; BATATINHA, MJM. Atividade anti-helmíntica do extrato aquoso das folhas de *Zanthoxylum*

rhoifolium Lam. (Rutaceae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 2009,18:43-48.

PIRANI, JR. *Estudo Taxonômico de Rutaceae*. Tese (Livre Docência)- São Paulo: Departamento de Biociência da Universidade de São Paulo, 1999.

PSCHEIDT, B; GLIEDER, A. Yeast cell factories for fine chemical and API production. *Microbial Cell Factories*, 2008, 7:25-61.

RANDRIANARIVELOJOSIA, M; MULHOLLAND, DA; FARLAND, KM. Prenylated coumarins from *Cedrelopsis longibracteata* (Ptaeroxylaceae). *Biochemical Systematic and Ecology*, 2005, 33: 301-304.

RAO, V. *Phytochemicals - A global perspective of their role in nutrition and health*. InTech, Croácia, 2012, 1-548.

RIBEIRO, CVC; KAPLAN, MAC. Tendências evolutivas de famílias produtoras de cumarinas em Angiospermae. *Química Nova*, 2002, 25:533-538.

ROBERTS, IN; OLIVER, SG. The yin and yang of yeast: biodiversity research and systems biology as complementary forces driving innovation in biotechnology. *Biotechnology Letters*, 2011, 33:477-487.

SANTANA, LLB; SILVA, CV; ALMEIDA, LC; COSTA, TAC; VELOZO, ES. Extraction with supercritical of chemical composition from adults and Young leaves of *Zanthoxylum tingoassuiba*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2011, 21: 564-567.

SERRA, S; FUGANTI, C; BRENNAN, E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends in Biotechnology*, 2005, 23:193-198.

SILVA, MA; MORRISON, R; BOYD, R. *Química Orgânica*, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1996, 13ª edição.

SILVA, CV; DETONI, CB; GUEDES, MLS; VELOZO, ES. Alcalóides e outros metabólitos do caule e frutos de *Zanthoxylum tingoassuiba* A.ST.HIL. *Química Nova*, 2008, 31:2052-2055.

SILVA, CV; REIS, ALV; FERRER, SR; GUERREIRO, HNM; BARROS, TF; VELOZO, ES. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. *Revista Brasileira de Farmacognosia*.2010, 20:355-360.

SILVA, VD; STARMBUCK, BU; NASCIMENTO, MG. Efficient chemoselective biohydrogenation of 1,3-diaryl-2-propen-1-ones catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* yeasts in biphasic system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010, 63:157-163.

SIMEO, Y; SINISTERRA, JV. Biotransformation of terpenoids: a green alternative for producing molecules with pharmacology activity. *Mini-reviews in Organic Chemistry*, 2009, 6:128-134.

SIMÕES, CMO; SCHENKEL, EP; GOSMANN, G; MELLO, JCP; MENTZ, LA; PETROVICK, PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora UFRGS; Florianópolis: Editora UFSC, 2010, 6^o ed., 1^a reimp., 1-1102.

STECK, W.; MAZUREK, M. Identificação of natural coumarins by NRM spectroscopy. *Lloydia*, 1972, 35: 418-439.

STRAATHOF, AJJ; PANKE S; SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. *Current Opinion Biotechnology*, 2002,13:548-56.

STUERMER, R; HAUER, B; HALL, M; FABER, K. Asymmetric bioreduction of activated C=C bonds using enoate reductases from the old yellow enzyme family. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2007, 11:203-213.

THOMAS, SM; DICOSIMO, R; NAGARAJAN, V. Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry. *Trends in Biotechnology*, 2002, 20:238-242.

UM, BH; LOBSTEIN, A; WENIGER, B; SPIEGEL, C; YICE, F; RAKOTOARISON, O; ANDRIANTSITOHAINA, R; ANTON, R. New coumarins from *Cedrelopsis grevei*. *Fitoterapia*, 2003, 74: 638-642.

VELOZO, ES. Fitoquímica comparada dos gêneros *Angostura*, *Almeidea* e *Rauia* (Rutaceae), São Paulo: Tese de Doutorado, D.Q.-UFSCAR, 1995.

VOGEL, AI. Química Orgânica Análise Qualitativa, *Livro técnico S. A.*, Rio de Janeiro, 1971, 2.

WATERMAN, PG.; GRUNDON, MF. *Chemistry and chemical taxonomy of the Rutales*. Academic Press, London, 1983.

WIMMER, Z; MACEK, T; SVATŮS, A; SAMAN, D. Biorreductions by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 1992, 26:173-181.

ZAKS, A. Industrial biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2001, 5:130–136

ZEYNIZADEH, B; BEHYAR, T. Fast and efficient method for reduction of carbonyl compounds with $\text{NaBH}_4/\text{WetSiO}_2$ under solvent free condition. *Journal Brazilian Chemistry Society*, 2005, 16:1200-1209.