UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA AFRO-BRASILEIRA – UNILAB

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA – ICEN

FLORENÇA ETOSSI BENOLIEL ALMEIDA

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS ENZIMAS ENCONTRADAS NOS VEGETAIS DA FLORA PRESENTE NO MACIÇO DE BATURITÉ-CE

ACARAPE-CE

2015

FLORENÇA ETOSSI BENOLIEL ALMEIDA

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS ENZIMAS ENCONTRADAS NOS VEGETAIS DA FLORA PRESENTE NO MACIÇO DE BATURITÉ-CE

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura em Ciências da Natureza e Matemática com habilitação em Química, do Instituto de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira como requisito parcial para obtenção do Título de Licenciada em Química.

Orientador: Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca.

ACARAPE-CE

2015

FLORENÇA ETOSSI BENOLIEL ALMEIDA

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS ENZIMAS ENCONTRADAS NOS VEGETAIS DA FLORA PRESENTE NO MACIÇO DE BATURITÉ-CE

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura em Ciências da Natureza e Matemática com habilitação em Química, do Instituto de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira como requisito parcial para obtenção do Título de Licenciada em Química.

Orientador: Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca.

Aprovado em:___/____/____

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca (Orientador)
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB

_____

Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos (Examinador)
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB

_____

Prof^{a}. Dr^{a}. Maria Cristiane Martins de Souza (Examinadora)
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB

Á Deus.

A minha mãe, Belmira da Silva Benoliel (*in memorian*), aos meus tios, Henrique Essuvi Fernando Benoliel e Ermelinda Pezo Lufupa Benoliel, aos meus irmãos, Almerindo, Maria, Anastácio, Silva e Domingas, ao meu amor, Daniel Wassolua.

AGRADECIMENTOS

Á Deus pela vida sem a qual não estaria aqui, e pelas bênçãos que tem me dado. Á minha mãe e aos meus tios pela educação e incentivo em continuar os estudos. Aos meus irmãos pelo apoio e incentivo. Ao meu amor Daniel, pela ajuda e suporte nos momentos de fraqueza, a minha prima Abigail pelo companheirismo durante os anos de formação, a minha irmã em Cristo Zelma pelo incentivo e ajuda na conquista da bolsa de estudos que me trouxe aqui. Ao Instituto Nacional de Gestão de Bolsas de Estudo-(*INAGBE*), por conceder a bolsa e financiar os meus estudos. Ao meu orientador Aluísio Marques da Fonseca pela oportunidade de participar da bolsa de pesquisa, pelos artigos publicados, pelos eventos de pesquisa que participei graças a sua insistência, por ter me dado à chance de aprender com ele mesmo em silêncio, observando apenas sua conduta e empenho em cada pesquisa realizada e também por me orientar nesse trabalho.

Aos professores participantes da banca examinadora.

Aos professores do curso de Ciências da Natureza e Matemática: José Berto Neto, Victor Emanuel Pessoa, Lívia Paulia Dias Ribeiro e Sinara Mota, pelo incentivo durante o curso, e pela amizade.

Aos meus companheiros e irmãos angolanos (Leila, Cristina, João, Júlio, Pereira, Ferreira e Jacinto) da primeira entrada do curso de Ciências da Natureza e Matemática, pela amizade e companheirismo.

Aos colegas da turma de Química 2011.1 pela amizade.

"Na natureza nada se cria nada se perde tudo se transforma." (Antoine Lavoisier).

RESUMO

A presente pesquisa objetivou-se em Verificar o potencial biotecnológico dos vegetais nativos da flora do Maciço de Baturité-Ce, particularmente em amostras de frutos como morango e coco, e também talos do mamoeiro como fontes de enzimas oxirredutases e hidrolases. Os termos biocatálise ou biotransformação, de maneira geral, abrangem o processo em que um catalisador biológico é utilizado para a conversão de um substrato em um número limitado de etapas enzimáticas. O emprego de biocatalisadores em processos reacionais diminui alguns impactos ambientais como, por exemplo, a poluição das águas, do solo e do ar causados pelos processos convencionais, dessa forma, constitui-se em uma poderosa ferramenta para a chamada química ecologicamente correta, a química verde. Sendo assim, torna-se necessário um estudo aprofundado sobre o potencial biocatalítico das espécies existentes na flora do Maciço de Baturité-Ce. Para isso, foram estudadas as seguintes espécies botânicas como fontes de biocatalisadores: O mamoeiro (*Carica papaya*) da família Caricaceae, o morangueiro (*Fragaria Vesca* L.) pertencente à família Rosaceae e o coqueiro *(Cocos nucifera L)* da família Arecaceae. Para a realização das reações de redução dos substratos (200 mg de acetofenona e 200 mg de benzaldeído) foram utilizados como biocatalisadores as amostras dos frutos do morango e talos do mamoeiro *in natura* (na forma de células íntegras, isto é, o extrato líquido obtido a partir desses vegetais). Para as reações de acetilação do linalol, as células dos referidos vegetais foram utilizadas na forma imobilizada com a finalidade de testar a atividade catalítica das mesmas. Os suportes utilizados para imobilização das células foram às esferas de poliacrilamida obtidas comercialmente. Os rendimentos de imobilização obtidos foram 95% de enzimas presentes nas células imobilizadas dos talos do mamoeiro e 92,9% de enzimas presentes nas células imobilizadas dos frutos do morango. Para as reações de redução e hidrolise do substrato 4-nitroacetanilida utilizou-se como biocatalisador a água de coco. Os resultados obtidos a partir das reações apresentadas foram: 1-feniletanol e álcool benzílico, resultantes da biorredução dos substratos acetofenona e benzaldeido. Obteve-se uma conversão em massa de 112mg (56%) do álcool formado a partir do benzaldeído e uma conversão de 90mg (45%) do álcool formado a partir da acetofenona e um excesso enantiomérico (e.e) de 97% usando os talos do mamoeiro como biocatalisador. Nas reações em que os frutos do morango foram utilizados como biocatalisador, obtiveram-se os produtos reduzidos com uma conversão em massa de 96mg (48%) do álcool formado a partir do benzaldeído e uma conversão de 62mg (31%) do álcool formado a partir da acetofenona e um e.e. de 97%. A síntese do 1-feniletanol e do álcool

benzílico é importante para muitos sectores industriais, e esses alcoóis podem ser aplicados nas mais diversas áreas como, por exemplo, na indústria farmacêutica, de cosméticos, perfumaria e agroquímica. E quando preparados por métodos biotecnológicos, como os propostos nesta pesquisa, podem ser aplicados também na indústria de alimentos e aromas naturais. A obtenção de excesso enantiomérico (ou de apenas um único enantiômero) é vantajosa quando o enantiômero em excesso é o que apresenta a atividade desejada. As reações enantiosseletivas são importantes em vários setores industriais, pois em muitos casos apenas um dos enantiômeros produzidos apresenta atividade desejada, sendo que o outro pode ser inativo ou até mesmo apresentar um efeito indesejado. Para as células imobilizadas foi possível obter produtos a partir da bioconversão de 200 mg de linalol. Obteve-se 35% de acetato de linalila utilizando as células imobilizadas dos talos do mamoeiro como biocatalisadores e 30% de acetato de linalila empregando as células imobilizadas dos frutos do morango. A síntese do acetato de linalila é importante principalmente para as indústrias de cosméticos e perfumaria, onde se destaca sua ação como fixador de aromas em perfumes. Os rendimentos obtidos das reações de redução e hidrolise da 4-nitroacetanilida mostraram-se majoritários para a síntese da 4-aminoacetanilida (52,2%) obtida a partir da redução do substrato 4-nitroacetanilida. Obteve-se também outro produto a 4-nitroanilina com rendimento de 40,30% resultante da hidrolise deste substrato. A biotransformação da 4-nitroacetanilida constitui-se numa rota essencial de obtenção de precursores que podem ser utilizados na preparação de compostos ativos, como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's). Apesar da maioria dos rendimentos obtidos serem inferiores a 50%, os biocatalisadores empregados, por exemplo, na conversão dos compostos quirais (como no caso da acetofenona) mostraram-se bastantes seletivos, chegando atingir excessos enantioméricos de 97%, desta forma, esses biocatalisadores podem ser empregados na obtenção de substâncias enantiomericamente puras, ou quase puras. Quanto à água de coco, verificou-se que a mesma possui potencial enzimático que possibilita seu emprego na indústria farmacêutica como, por exemplo, na preparação de compostos ativos.

Palavras-chave: vegetais. Biotecnologia-Biocatálise. Maciço de Baturité-Ce.

ABSTRACT

The present research aimed to verify in the biotechnological potential of native vegetables from maciço do Baturité's (CE), particularly in samples of fruits like Strawberry, coconut, and papaya stalks as well as sources of oxiredutases enzymes and Hydrolase. The terms or biotransformation, Biocatalysis in General, covering the process in which a biological catalyst is used for the conversion of a substrate in a limited number of enzymatic steps. The use of biocatalysts in reactional processes decreases some environmental impacts, such as pollution of water, soil and air caused by conventional processes thus constitutes a powerful tool for the so-called eco-friendly chemistry, green chemistry. Therefore, it is necessary an in-depth study on the potential biocatalytic of existing species in the flora of maciço do Baturité-Ce. For this, the following botanical species were studied as sources of biocatalysts: the papaya (*Carica papaya*) in the family Caricaceae, the strawberry (*Fragaria Vesca* l.) belongs to the family Rosaceae and the coconut palm (*Cocos nucifera* l.) of the Arecaceae family. To carry out the reduction reactions of substrates (200 mg of benzaldehyde and/or acetophenone) were used as biocatalysts samples of the fruits of strawberry and stems of papaya *in natura* (in the form of healthy cells, i.e. liquid extract obtained from these vegetables). For acetylation reactions of linalool, the cells of these plants were used in way immobilized for the purpose of testing the catalytic activity. The brackets used for immobilization of cells were at polyacrylamide beads obtained commercially. The yields obtained were 95% of enzymes present in the immobilized cells of stems of papaya and 92.9% of enzymes present in the cells immobilized the fruits of the strawberry. For the reactions of reduction and hydrolysis of 4-nitroacetanilida used as biocatalyst coconut water. The results obtained from the reactions shown were: 1-feniletanol and benzyl alcohol, resulting from the biorreduction of acetophenone and benzaldeido substrates. It was obtained a mass conversion to 112mg (56%) of the alcohol formed from benzaldehyde and a cast of 90 mg (45%) of the alcohol formed from acetophenone and enantiomeric excess (e.e.) of 97% using the papaya stalks as biocatalyst. The reactions in which the fruits of strawberry were used as biocatalyst, reduced products were obtained with a mass conversion of 96mg (48%) of the alcohol formed from benzaldehyde and a conversion of 62 mg (31%) of the alcohol formed from acetophenone and a e.e. of 97%. The synthesis of 1-feniletanol and benzyl alcohol is important to many industrial sectors, and these alcohols can be applied in various areas such as, for example, in the pharmaceutical industry, cosmetics, perfumery and agrochemical. When prepared by biotechnological methods such as those proposed in this

research, can be applied also in the food industry and natural flavours. Obtaining of enantiomeric excess is advantageous when the enantiomer in excess is what presents the desired activity. For the immobilized cells was possible to obtain products from the bioconversion of 200 mg of linalool. Obtained 35% of linalyl acetate using immobilized cells of papaya stalks as biocatalysts and 30% of linalyl acetate using immobilized cells of the fruit of the strawberry. Synthesis of linalyl acetate is very important, primarily for cosmetic and perfumery industries, where its action as aroma fixative in perfumes. The yield obtained from the reactions of reduction and hydrolysis of the 4-nitroacetanilide were for the synthesis of majority 4-aminoacetanilide (52.2%) obtained from the reduction of 4-nitroacetanilide. Also obtained another product to 4-nitroaniline with 40.3% yield resulting from the hydrolysis of this substrate. The biotransformation of 4-nitroacetanilide is a alternative pathway for the production of precursors that could be used in the preparation of active compounds, such as non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID's). Although the majority of the revenue obtained be below 50, the biocatalysts employees, for example, the conversion of Chiral compounds were selective enough, getting hit e. e. of 97%, and can thus be employed in obtaining enantiomericamente pure substances or almost pure. Regarding coconut water, it was found that the same enzyme that enables potential has your job in the pharmaceutical industry as, for example, in the preparation of active compounds.

Keywords: vegetables. Biotechnology-Biocatalysis. Maciço do Baturité.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 10
1.1.OBJETIVOS 11
1.2.Organização do trabalho 11
2. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO 13
2.1.SUSTENTABILIDADE E QUÍMICA VERDE 13
2.2.Sustentabilidade 13
2.3.Química Verde 13
3. BIOTECNOLOGIA E BIOCATÁLISE 14
3.1.Biotecnologia 14
3.2.Biocatálise 15
4. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS 17
4.1.*Carica Papaya* (mamão) 17
4.2.Morango (*Fragaria Vesca L.*) 18
4.3.*Cocos nucifera L.* (coco) 18
5. MATERIAIS E MÉTODOS 19
5.1.Obtenção dos Vegetais 19
5.1.1. Células íntegras dos talos do mamoeiro e dos morangos 20
5.1.2. Reações com células íntegras dos talos do mamoeiro e dos morangos 21
5.1.3. Extração e Isolamento 21
5.1.4. Imobilização das células presentes nos frutos do morango e nos talos do mamoeiro 21
5.1.5. Reações com células imobilizadas dos frutos do morango e dos talos do mamoeiro 23
5.1.6. Dados Espectroscópicos 24
5.2.Reações com células íntegras da água de coco 24
5.3.MÉTODOS DE ANÁLISE EMPREGADOS 25
5.3.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) 25
5.3.2. Cromatografia Gasosa Acoplada aos Espectros de Massas (CG-EM) 25
5.3.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) 26
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES 27
6.1. Reações com células íntegras dos talos do mamoeiro e frutos do morango 27
6.1.1. Reações com células imobilizadas dos talos do mamoeiro e dos frutos do morango 29
6.1.2. Reações com células íntegras da água de coco 30
7. CONCLUSÃO 32
8. REFERÊNCIAS 33
ANEXOS

1. INTRODUÇÃO

A presente pesquisa retrata a questão do uso de vegetais em biotecnologia, mais precisamente em processos biocatalíticos. Á necessidade do uso de vegetais em biocatálise surge da carência de biocatalisadores em alguns países que não têm como utilizar esses reagentes catalíticos devido ao seu custo elevado, e na maioria das vezes precisam ser importados de outros países (CORDELL, et al., 2007). Deste modo, estudos são realisados nessa área tendo em vista o potencial catalítico das enzimas presentes nos vegetais (BARON, 2008; BISATTO, 2012; FERREIRA, 2008; LOPES, 2013), uma vez que o emprego desses biocatalisadores em processos reacionais diminui alguns impactos ambientais como, por exemplo, a poluição (das águas, do solo e do ar) causada pelos processos convencionais. Além disso, realizar reações com compostos orgânicos utilizando apenas enzimas encontradas em vegetais é de grande relevância para a química orgânica e para o desenvolvimento em novas tecnologias, contribuindo para o conhecimento em Biotecnologia (CORDELL 2007; JESUS et al., 2013). Por outro lado, a utilização de reações biocatalíticas em processos industriais poderá constituir-se em uma poderosa ferramenta para a chamada “química ecologicamente correta”, a química verde (CORDELL et al., 2007). Essas reações são de extrema importância no desenvolvimento de feromônios, nas indústrias alimentícias e de biocombustíveis, e no caso particular das reações propostas nesta pesquisa, podem ser aplicadas na produção de medicamentos e cosméticos, e desta forma, poderão contribuir para as áreas ambientais, farmacêuticas e industriais (ASSUNÇÃO et al., 2008).

1.1.OBJETIVOS

Geral

Verificar o potencial biotecnológico dos vegetais nativos da flora do Maciço de Baturité-Ce, particularmente em amostras de frutos, morango e coco, e também talos do mamoeiro como fontes de enzimas oxirredutases e hidrolases.

Específicos

- Selecionar os vegetais;
- Investigar as atividades biocatalíticas desses vegetais;
- Imobilizar as células, presentes nos vegetais através de suporte polimérico, as esferas de poliacrilamida;
- Analisar os produtos obtidos (alcoóis, acetato de linaloila e aminas) por métodos espectroscópicos.

1.2.Organização do trabalho:

Este trabalho está dividido em oito seções:

Além desta que introduz ao mesmo, a segunda seção apresenta um panorama acerca da sustentabilidade, química verde e suas implicações na área da química e química orgânica. Tendo em vista o crítico cenário ambiental, esta seção expõe os benefícios que a aplicação da química verde nos vários processos de produção química causa ao meio ambiente.

Na terceira seção é feita uma abordagem sobre biotecnologia e biocatálise. São apresentados também nesta seção os tipos de catalisadores biológicos e sua revolução nos processos químicos. É mostrado ainda nesta seção, uma tabela comparativa entre os dois tipos de biocatalisadores mais empregados nas reações químicas.

Na quarta seção são feitas as considerações botânicas. São apresentados neste item os vegetais que foram utilizados na pesquisa, *Carica papaya* (mamão), *Fragaria vesca* (morango) e *Cocos nucifera L*. (coco). São mostradas ainda nesta seção algumas aplicações biocatalíticas dessas espécies.

A quinta seção mostra as metodologias empregadas na realização dos experimentos.

Na sexta seção são apresentados os resultados obtidos de cada experimento realizado, fez-se uma breve discussão entres esses resultados e os encontrados na literatura. Mostrou-se também algumas áreas de aplicação dos compostos que foram sintetizados nessa pesquisa.

Na sétima seção são feitas as considerações finais da pesquisa, e na oitava e última seção são apresentadas as referências utilizadas para desenvolver este trabalho.

2. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

2.1.SUSTENTABILIDADE E QUÍMICA VERDE

2.2.Sustentabilidade

A maioria das sociedades á nível mundial ainda adotam modelos de desenvolvimento que se caracterizam por tecnologias obsoletas, poluentes e intensivas em energia elétrica. Um desses modelos pode ser facilmente visualizado nos processos de produção química que geram inúmeros inconvenientes, como por exemplo, a formação de subprodutos tóxicos que contaminam não apenas o ambiente como o próprio homem (POLIAKOFF et al., 2002). Consequentemente, questões relacionadas à preservação do meio ambiente e sustentabilidade ganharam força e vêm sendo debatidas cada vez mais á nível mundial com a finalidade de alertar, impor medidas corretivas aos responsáveis pelo desequilíbrio ambiental e propor novos meios de produção, principalmente de produção química. Um desses novos meios de produção que a visão sustentável propõe, é que seria desejável que os materiais fossem produzidos a partir de recursos renováveis e que, ao final de sua utilização, fossem passíveis de reciclagem ou facilmente biodegradáveis em substâncias inofensivas ao ambiente (FERREIRA et al., 2013).

2.3.Química Verde

Atualmente a Química vem trabalhando com a concepção de uma ciência ambientalmente mais recomendável. Este fato requer uma nova conduta química para o aprimoramento dos processos reacionais, com o objetivo fundamental da geração cada vez menor de resíduos e efluentes tóxicos, bem como da menor produção de gases indesejáveis ao ambiente (CLARK, 1999; TUNDO et al., 2000). Este novo caminho delineado pela química é denominado química sustentável ou química verde, que incentiva uma produção mais limpa e com menos poluentes industriais, garantindo que os fabricantes assumam uma maior responsabilidade para os produtos que produzem (FERREIRA et al., 2013). Além disso, a "Química Verde" tornou-se uma área da química aliada à saúde humana, por isso sua prática vem sendo incentivada pela academia de pesquisa, indústria e governo (NAVARRO et al., 2005).

A necessidade de reações ambientalmente amigáveis é tão importante que a atitude *ecofriendly* consciente fez com que os químicos Paul Anastas e John C. Warner postulassem os 12 (doze) princípios da Química Verde (ANASTAS; WARNER, 1998) sendo alguns deles empregados nesta pesquisa, como por exemplo, o primeiro princípio referente à prevenção, o terceiro síntese de produtos menos perigosos, o quarto modelo de produtos seguros, o oitavo minimização da formação de subprodutos e o nono princípio referente à catálise.

3. BIOTECNOLOGIA E BIOCATÁLISE

3.1.Biotecnologia

A biotecnologia pode oferecer benefícios econômicos e ambientais para a indústria química e tem um grande potencial para alcançar a produção sustentável de produtos existentes e novos a partir de matérias-primas renováveis (CONTIERO et al., 2012). As limitações existentes na obtenção de produtos e intermediários de interesse industrial estão associadas aos tipos de catalisadores químicos empregados, que são pouco versáteis e exigem altas temperaturas para atingir razoável velocidade de reação (MENDES et al., 2011). Além disso, estes catalisadores possuem baixa especificidade, geralmente fornecem produtos de composição química mista ou produtos contaminados e requerem uma etapa posterior de purificação (HASAN et al., 2006). Os biocatalisadores (enzimas ou células) por sua vez, atuam em condições suaves de temperatura, pH e pressão, atingindo velocidades de reação bastante superiores àquelas obtidas em presença de catalisadores químicos convencionais (KRAJEWSKA, 2004). Este comportamento permite uma redução no custo final do processo e evita a formação de subprodutos indesejáveis (MENDES, 2011). Além disso, devido à sua elevada especificidade, maior rendimento do processo pode ser atingido, pode-se obter produtos biodegradáveis e reduzir a quantidade de resíduos gerados (CASTRO et al., 2004). Outro aspecto importante é que muitas enzimas conseguem promover a transformação de vários substratos em produtos dificilmente obtidos por rotas químicas ou ainda atuar em reações nas quais não existem alternativas químicas viáveis (OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009). A produção biotecnológica de substâncias químicas é também menos agressiva ao meio ambiente (CONTIERO et al., 2012). Nesse contexto, o enfoque biotecnológico vem se apresentando como uma opção promissora para sua exploração em diversos tipos de reações (HASAN et al., 2006).

3.2.Biocatálise

As reações biocatalíticas são realizadas empregando-se enzimas isoladas ou células íntegras de organismos vivos (como plantas) ou micro-organismos (leveduras, bactérias e fungos) (DE CONTI et al., 2001; ZANOTTO, 2003; OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009). Esses biocatalisadores apresentam características que os diferenciam dos catalisadores químicos, e estão intrinsecamente ligados aos princípios da Química Verde (LENARDÃO et al., 2003). Uma dessas características é a eficiência catalítica que possuem que em geral, é muito maior do que a dos catalisadores sintéticos, devido ao seu alto grau de especificidade tanto para o substrato quanto para as reações que catalisam (FABER, 1997).

Olhando para o biocatalisador é importante avaliar se o conjunto enzimático a ser explorado constitui uma célula íntegra ou um extrato enzimático puro ou parcialmente purificado. Entre as vantagens em utilizar enzimas isoladas puras ou parcialmente purificadas estão à alta especificidade, maior produtividade e facilidade de isolamento dos produtos. Por outro lado, os processos que utilizam células íntegras em geral são de baixo custo e especialmente interessantes para aplicação em sistemas dependentes de cofator, pois a própria célula possui a maquinaria para promover a regeneração (FABER, 1997).

Atualmente, a biocatálise é um dos processos mais promissores para a síntese de compostos de alto valor agregado e as enzimas e células são os biocatalisadores mais frequentemente utilizados (DIAS et al., 2012) . Esses biocatalisadores apresentam vantagens e desvantagens (Tabela 1).

Tabela 1. Vantagens e Desvantagens no uso de Células ou Enzimas Isoladas.

Biocatalisador	Forma	Vantagens	Desvantagens
Enzimas	Qualquer	Alta especificidade; melhor produtividade devido a maior tolerância de concentrações;	Custo Elevado; Necessidade de cofatores (algumas); Disponibilidade em alguns casos;
	Dissolvida em água	Alta atividade enzimática	Necessidade de extração; Possíveis reações laterais.
	Suspensa em solventes orgânicos	Fácil manipulação; Fácil recuperação da enzima	Atividade reduzida
	Imobilizada	Facilidade de Isolamento dos produtos; Fácil recuperação da enzima	Perda de atividade durante a imobilização.
Células	Qualquer	Baixo Custo; Não há necessidade de recuperação de cofatores.	Baixa Tolerância a substratos e solventes Orgânicos; Reações paralelas devido ao metabolismo celular; Baixa produtividade.
	Células em crescimento	Alta atividade	Formação de subprodutos
	Células imobilizadas	Reutilização de células	Baixa atividade

Fonte: RISCH (2007); FABER (2000).

Uma das grandes vantagens em se utilizar células íntegras de organismos vivos em processos reacionais é o fato de não necessitar do uso de cofator, já que as mesmas são fontes de cofator, que é um produto muito caro, e o processo de reciclagem do mesmo é realizado automaticamente pela célula, para obtenção do produto final (YAN et al.,2011; BARBIERI et al., 2001).

Os biocatalisadores utilizados nesta pesquisa foram às células dos vegetais propostos, uma vez que não dispúnhamos de maquinaria necessária para isolar e/ou purificar as enzimas presentes nestes vegetais. As células foram utilizadas na forma íntegra e na forma imobilizada.

4. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

O local escolhido para a coleta dos vegetais foi o Maciço de Baturité-Ce (especificamente os municípios de Acarape e Redenção) localizado no sertão central cearense.

O Nordeste brasileiro apresenta condições climáticas favoráveis ao cultivo de diversas espécies frutíferas de origem tropical. Por esta razão, espécies como a *Carica papaya* (mamão), *Fragaria vesca* (morango) e *Cocos nucifera L*. (coco) são cultivadas nessa região.

A seguir, estão apresentadas as espécies vegetais e seus respectivos frutos e estruturas (talos do mamoeiro) utilizados na pesquisa:

4.1.*Carica Papaya* (mamão)

O mamoeiro (*Carica papaya*) é uma planta muito comum em regiões de clima tropical e subtropical. Foi descoberto na região entre o sul do México e o norte da Nicarágua e introduzido no Brasil, em 1587, devido ao clima favorável. Esta espécie pertencente à classe *Dicotyledoneae*, subclasse *Archichlamydeae*, ordem *Violales*, subordem *Caricineae*, família *Caricácea* e gênero *Carica* (VENTURINI et al., 2012).

Quanto a sua composição química, o mamão é uma importante fonte nutritiva, riquíssima em vitamina A, C, potássio, ácido fólico, niacina, tiamina, riboflavina, ferro, cálcio e fibra (PEÇANHA, 2010).

A planta do mamoeiro é cultivada também para produzir papaína, uma importante enzima proteolítica, conhecida como lipase do látex de *Carica Papaya* (PAQUES e MACEDO, 2006) encontrada no látex dos frutos verdes. Acredita-se que os talos do mamoeiro contêm também quantidades significantes desta enzima, uma vez que os mesmos foram empregados na ração de transesterificação proposta por Jesus et al. (2012) que utilizaram as enzimas imobilizadas das células íntegras dos talos do mamoeiro na produção do biodiesel obtendo rendimento de 34,7%.

Além da papaína, os talos do mamoeiro possuem também enzimas oxirredutases. Este fato pode ser comprovado por meio das pesquisas que têm sido realizadas empregando-se essas estruturas nas reações de redução de compostos carbonílicos (FONSECA et al., 2012; JESUS et al., 2012).

Na presente pesquisa, foram utilizadas as enzimas oxirredutases (especificamente as desidrogenases) presentes nas células dos talos para catalisarem as reações de redução dos substratos propostos (benzaldeído e acetofenona).

4.2.Morango (*Fragaria Vesca L.*)

O morangueiro é uma planta cultivada em todos os continentes, especialmente nos Estados Unidos, Espanha, Japão, Itália, Coréia do Sul e Polônia (CASTRO, 2003).

A planta do morango pertence à família *Rosaceae*, subfamília *Rosoideae*, tribo *Potentilleae*, gênero e espécie *Fragaria* (RESENDE et al., 1999).

Quanto a sua composição química, o morango é um fruto rico em vitamina C, flavonoides, vitamina B5 (Niacina) e Ferro (SANTI; COUTO, 2011). Também é rico em frutose e sacarose e pobre em carboidratos. É boa fonte de folato e potássio. Possui poucas calorias.

Assim como nos talos do mamoeiro, uma das classes enzimáticas presentes no fruto do morango é a classe das oxirredutases (desidrogenases). Fonseca et al., (2013) verificaram a atividade desta enzima na reação de biorredução da acetofenona, obtendo um rendimento de 70, 2% de 1-feniletanol.

Provavelmente, devido ao fato do morango fazer parte da cadeia alimentar tem sido pouco empregado em processos biocatalíticos, pois é mais viável utilizar estruturas que não façam parte da cadeia alimentar.

4.3.*Cocos nucifera L.* (coco)

O coqueiro pertence à classe *Monocotyledoneae*, ordem *Palmales*, família *Arecaceae*, subfamília *Cocoideae* e gênero *Cocos*. Este gênero apresenta apenas a espécie *Cocos nucífera L.*, constituída por dois grupos, o Nana (coqueiro anão) e o Typica (coqueiro gigante) (AZEVEDO, 2014).

Em relação a sua composição química, o coco é um fruto rico em fósforo, ferro, sódio, cálcio, potássio e vários outros minerais. Também contém proteínas, gorduras, e é muito rico em carboidratos (CHUMBIMUNI-TORRES; KUBOTA, 2006).

As enzimas peroxidase (POD) e Polifenol oxidase (PPO) estão presentes na água de coco, assim como em vários outros vegetais (DUARTE et al., 2002). Estudos vêm mostrando que estão presentes também na água de coco as enzimas hidrolases (esterases e amidases) e

desidrogenases cujos potenciais de hidrolise e redução foram testados e verificados em algumas pesquisas como, por exemplo, na pesquisa desenvolvida por Fonseca et al., (2007) verificaram o potencial da água de coco como agente biocatalisador em reações orgânicas, obtendo resultados satisfatórios: 61% de citronelol (resultante da biorredução do citral), 66% de ácido butanóico (resultante da hidrólise do butanoato de etila) e 99% de p-aminofenol (produzido a partir da hidrólise da hidroxiacetanilida).

Na presente pesquisa foram empregadas as enzimas desidrogenases e amidases (presentes nas células da água de coco) para a reação de bioconversão do substrato proposto (4-nitroacetanilida).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.Obtenção dos Vegetais

As amostras dos frutos das espécies *Cocos nucifera L*. (coco) **figura 1**, e *Fragaria vesca* (morango) **figura 2**, foram coletadas em um sítio localizado no município de Acarape. Este município está localizado a uma altitude de 80m, longitude 38° 42′ 30″ W, latitude 04° 13′ 27″S e possui uma área compreendida a 136,5 Km^2. Os talos do mamoeiro (*Carica papaya)* **figura 3** por sua vez foram coletados no município de Redenção, na fazenda da universidade. O município de Redenção possui uma superfície de 240,7 Km^2, latitude 04° 13′ 33″S, longitude 38° 43′ 50″W e altitude de 88m á nível do mar.

Figura 1: Coco

Figura 2: Morangos

Figura 3: Talos do Mamoeiro

5.1.1. Células íntegras dos talos do mamoeiro e dos morangos

Usando metodologia adaptada de literatura (MACHADO et al., 2006; FONSECA et al., 2009; BERTINE et al., 2012) inicialmente para a eliminação de interferentes como, por exemplo, enzimas microbianas, as amostras vegetais (talos do mamoeiro e morango) foram submetidas a uma solução de hipoclorito de sódio 4% por vinte (20) minutos e em seguida colocadas em repouso por dez (10) minutos em água destilada. Feito isto, cortou-se amostras em pequenos pedaços (cerca de 1 centímetro de comprimento) e preparou-se os seus extratos celulares utilizando para este fim 140 mL de solvente orgânico (acetato de etila para extração dos materiais enzimáticos) para 20 g de cada amostra vegetal.

Posteriormente fez-se a determinação proteica dos extratos (dos talos de mamoeiro e dos morangos) pelo método de Bradford, resultando em aproximadamente 0,18 mg de proteína presente nos frutos do morango e 0,2 mg de proteína presente nos talos do mamoeiro.

5.1.2. Reações com células íntegras dos talos do mamoeiro e dos morangos

- **Biorredução da acetofenona e do benzaldeído**

A metodologia utilizada foi adaptada de literatura (FONSECA et al., 2009; JESUS et al., 2013). Preparou-se as misturas reacionais utilizando 200 mg de cada substrato (benzaldeído e acetofenona) para cada extrato celular obtido anteriormente. Adicionou-se ás misturas resultantes 140 mL de água destilada.

As condições reacionais foram em pH 7,6, com temperatura de 27ºC, agitação de 150 r.p.m. em agitador orbital e tempo de reação 72 horas.

5.1.3. Extração e Isolamento

Terminado o tempo reacional, as misturas foram coletadas, extraídas com solvente orgânico (20 mL de acetato) e desidratadas com sulfato de sódio anidro. As fases orgânicas desidratadas foram colocadas cada uma em um balão e concentradas sob pressão reduzida. Os resíduos obtidos foram separados por filtração numa coluna curta de sílica gel, utilizando-se como eluentes o acetato de etila e o hexano numa proporção de 2:8, porque com base nas literaturas consultadas (FONSECA et al., 2009; JESUS et al., 2013) essa mistura de eluentes foi a que melhor separou os componentes das misturas em questão.

5.1.4. Imobilização das células presentes nos frutos do morango e nos talos do mamoeiro

O tipo de suporte de imobilização utilizado nesta pesquisa foi o gel de poliacrilamida, que tem sido empregado com sucesso em algumas pesquisas (ELLAIAH et al., 2001, JESUS et al., 2013).

Utilizou-se este suporte da forma como foi adquirido no mercado, ou seja, já pronto (em forma de microesferas) por isso não houve necessidade de prepara-lo. A utilização dessas esferas nos processos de imobilização é vantajosa, porque são de fácil aquisição e baixo custo.

Preparou-se novos extratos celulares dos vegetais (frutos do morango e talos do mamoeiro) para o processo de imobilização usando a mesma metodologia acima apresentada.

A metodologia empregada no processo de imobilização foi adaptada de literatura (SILVA et al., 2008; MENDES, 2011; JESUS et al., 2013). Sendo assim, para imobilização das células utilizou-se o processo de Kalogeris (KALOGERIS et al., 2006). Primeiramente, uma leitura no espectrofotômetro de UV foi efetuada a partir dos extratos celulares (de morangos e talos do mamoeiro) para determinar o teor (L0 = 0,9%) total de proteínas dos talos do mamoeiro e teor (L0 = 0,7%) total de proteínas dos morangos através de uma curva de calibração obtida utilizando soluções padrões de albumina bovina. Aos extratos celulares, foram adicionadas as microesferas de poliacrilamida para imobilização das células (**Figura 4a**). Este processo durou 24 horas (tempo necessário para absorção dos extratos pelas microesferas de poliacrilamida) e ocorreu a temperatura de 27°C e pH 7,6.

Terminado o tempo de imobilização, as esferas foram separadas por filtração e a partir dos filtrados (de talos do mamoeiro e morangos) efetuou-se leituras no espectrômetro. Os valores dessas leituras L1= 0,045% (para o filtrado dos talos do mamoeiro) e L1= 0,05% (para o filtrado dos morangos) foram divididos pelos valores das primeiras leituras (L0) e multiplicados por 100, obtendo-se assim, a percentagem de proteínas não imobilizadas (Lni = 5% para os talos do mamoeiro e Lni = 7,1% para os morangos), como mostra a fórmula abaixo. As percentagens obtidas foram subtraídas de 100 fornecendo a percentagem (95,0%) de enzimas presentes nas células imobilizadas dos talos do mamoeiro e 92,9% de enzimas presentes nas células imobilizadas dos morangos.

$$\mathrm{Lni} = \frac{\mathrm{L1}}{\mathrm{L0}} \text{ x } 100$$

Terminado este processo, as esferas foram colocadas em placas de petri e postas em estufa biológica com temperatura controlada de 40º C, para serem desidratadas sem risco de desnaturação (**Figura 4b**).

Figura 4a: Esferas das poliacrilamidas incorporadas

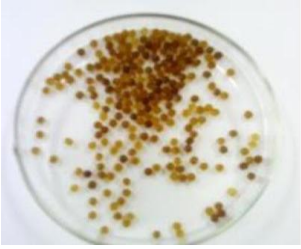


Figura 4b: Esferas incorporadas e secas.

5.1.5. Reações com células imobilizadas dos frutos do morango e dos talos do mamoeiro

- **Reação de acetilação do linalol**

As células imobilizadas, foram empregadas nas reações de acetilação do linalol, utilizando para este propósito 200 mg de linalol, 148 mg de anidrido acético, 20 mL de hexano e 100 mg de esferas imobilizadas e desidratadas. Posteriormente as misturas reacionais resultantes foram postas sob agitação a 150 rpm, à temperatura de 30°C durante 72 horas de reação.

Terminado o tempo reacional, as misturas foram extraídas com acetato de etila e secas com sulfato de sódio anidrido. As fases orgânicas devidamente secas, foram colocadas (cada uma) em um balão e concentradas sob pressão reduzida em rota-evaporador rotativo.

Infelizmente nesta pesquisa as células imobilizadas empregadas nos processos reacionais não foram reutilizadas, desta forma, não se pôde testar a capacidade de reutilização das mesmas. E também utilizou-se apenas as células que foram imobilizadas e desidratadas, o que impossibilitou comparar a eficiência catalítica destas frente as não desidratadas. Sendo assim, espera-se que novas pesquisas sejam desenvolvidas com a finalidade de obter esses resultados.

5.1.6. Dados Espectroscópicos

As análises dos produtos formados foram feitas empregando-se as técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD); a quantificação dos mesmos foi feita com base nas técnicas de cromatografia gasosa acoplada aos espectros de massas (CG-EM), e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{1}H e ^{13}C unidimensionais.

5.2. Reações com células íntegras da água de coco

- **Reação de redução e hidrólise do 4-nitroacetanilida**

Utilizando metodologia adaptada de literatura (MACHADO et al., 2006; FONSECA et al., 2009) fez-se a determinação proteica da água de coco pelo método de Bradford, resultando em aproximadamente 2,4 mg de proteína presente na água de coco.

A mistura reacional foi preparada utilizando-se 100 mg do substrato 4-nitroacetanilida e 200 mL de água de coco. A mistura reacional resultante foi posta sob agitação durante 120 horas, em agitador magnético na velocidade de 150 r.p.m e temperatura ambiente. Terminado o tempo reacional, a mistura foi coletada, filtrada, extraída com solvente orgânico (20 mL de acetato de etila), desidratada com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida.

Para identificação e quantificação dos produtos formados, foram empregadas as técnicas já referidas.

5.3.MÉTODOS DE ANÁLISE EMPREGADOS

5.3.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

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

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

5.3.2. Cromatografia Gasosa Acoplada aos Espectros de Massas (CG-EM)

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

5.3.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

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

Os solventes deuterados utilizados na dissolução das amostras e obtenção dos espectros foram: clorofórmio ($CDCl_3$), acetona [$(CD_3)_2CO$], metanol (CD_3OD), e piridina (C_5D_5N). As multiplicidades das absorções foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), d (dubleto), dd (duplo dubleto), t (tripleto), ddd (duplo dubleto dubleto) hep (hepteto) e m (multipleto).

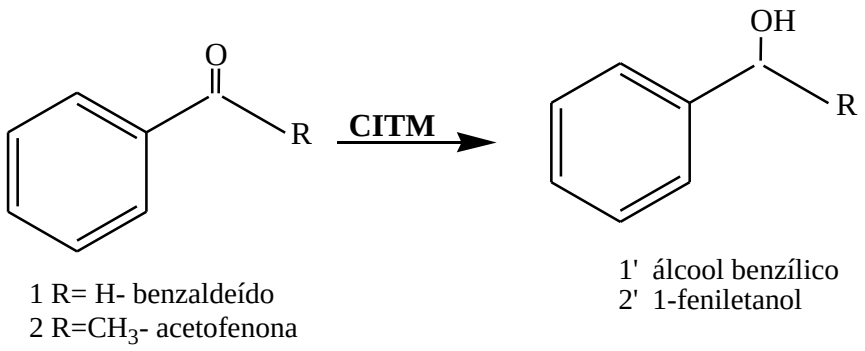
O padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN ^{13}C foi determinado através da utilização da técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), com ângulo de nutação de 135º, CH e CH_3 com amplitude em oposição ao CH_2. Os carbonos não-hidrogenados foram caracterizados pela subtração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

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

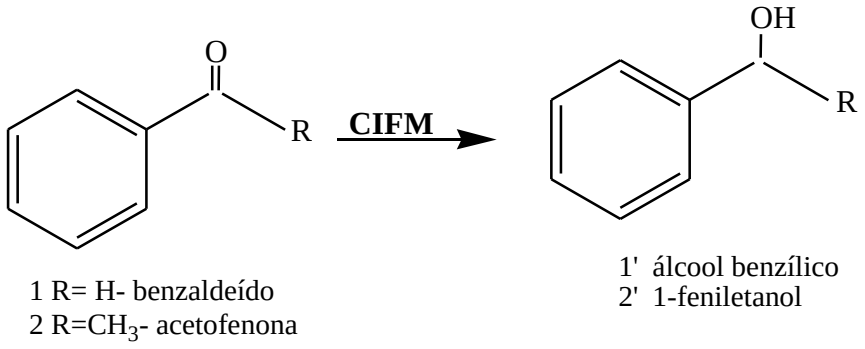
6.1.Reações com células íntegras dos talos do mamoeiro e frutos do morango

Nestes testes obtiveram-se os produtos reduzidos das células íntegras presentes nos talos do mamoeiro, com uma conversão em massa de 112mg (56%) do álcool formado a partir do benzaldeído e uma conversão de 90mg (45%) do álcool formado e um e.e. de 97%, através da reação com o uso da acetofenona (**Esquema 1**).

Para as células integras presentes nos frutos do morango, obtiveram-se os produtos reduzidos com uma conversão em massa de 96mg (48%) do álcool formado a partir do benzaldeído e uma conversão de 62mg (31%) do álcool formado e um e.e. de 97%, através da reação com o uso da acetofenona (**Esquema 2**).



Esquema 1: Biorredução dos compostos carbonílicos a partir das células íntegras dos talos do mamoeiro (CITM).



Esquema 2: Biorredução dos compostos carbonílicos a partir das células íntegras dos frutos do morango (CIFM).

Os resultados acima apresentados permitem-nos refletir acerca das aplicações industriais que os respectivos vegetais podem ter, pois por meio da atividade catalítica das enzimas presentes em suas estruturas é possível obter uma classe especial de alcoóis, os alcoóis quirais (como no caso do 1-feniletanol) que servem como precursores e auxiliares quirais. São uma importante classe de compostos orgânicos que devido às suas propriedades bioativas servem de materiais de partida para a síntese de várias moléculas complexas, biologicamente ativas (CAPOZZIELLO; LATTANZI, 2003). No caso dos alcoóis obtidos nesta pesquisa podem ser aplicados nas mais diversas áreas industriais como, por exemplo, na indústria farmacêutica, fragrância e agroquímica. E quando preparados por métodos biotecnológicos, podem ser aplicados na indústria de alimentos e aromas naturais (VIEIRA et al., 2010).

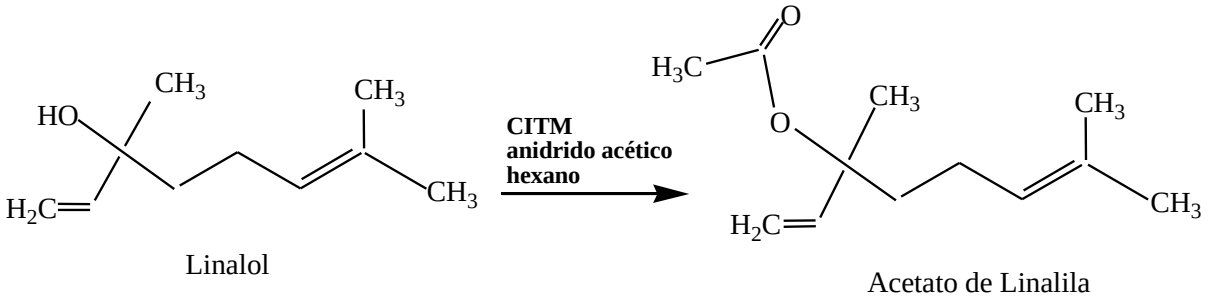
Silva et al., (2012) e Omori et al., (2012) relatam em suas pesquisas que é possível obter bons rendimentos na conversão da acetofenona e benzaldeído utilizando também os catalisadores químicos, como no caso do borohidreto de sódio ($NaBH_4$), porém esses catalisadores são pouco seletivos. O $NaBH_4$, por exemplo, por ser um agente redutor aquiral quando reage com substratos pró-quirais (como no caso da acetofenona), leva à formação de alcoóis racêmicos (ZUIN et al., 2009).

Silva et al., (2012) obtiveram rendimento químico de 82% de 1-feniletanol racêmico usando $NaBH_4$ como catalisador. Na mesma reação usando enzimas presentes nas células íntegras da cenoura obtiveram uma conversão (80,55%) comparável a processos químicos convencionais, porém, com excesso enantiomérico maior que 99%. A obtenção de produtos que contêm excesso enantiomerico (ou que contêm apenas um único enantiômero) em vez de racematos é importante em vários setores industriais, pois em muitos casos apenas um dos enantiômeros apresenta atividade desejada, sendo que o outro pode ser inativo ou até mesmo apresentar um efeito indesejado, necessitando nesse caso de uma reciclagem envolvendo uma etapa adicional de racemização (SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

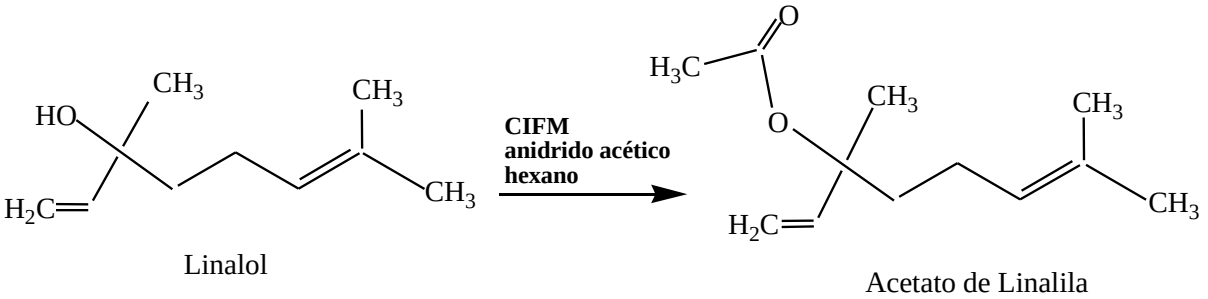
Apesar da maioria dos rendimentos obtidos se mostrarem inferiores a 50%, os biocatalisadores empregados nas reações de redução de compostos quirais (como no caso da acetofenona) mostraram-se bastantes seletivos, chegando atingir excessos enantioméricos de 97%, podendo desta forma, ser empregados na obtenção de substâncias enantiomericamente puras.

6.1.1. Reações com células imobilizadas dos talos do mamoeiro e dos frutos do morango

Com relação às células imobilizadas foi possível obter resultado com a reação de acetilação do linalol, apresentando um rendimento de acetato de linalila de 35% para a reação com as células imobilizadas dos talos de mamoeiro (**Esquema 3) e** 30% para a reação com as células imobilizadas dos frutos do morango (**Esquema 4**).



Esquema 3: Acetilação do Linalol utilizando células imobilizadas dos talos do mamoeiro (CITM).



Esquema 4: Acetilação do Linalol utilizando células imobilizadas dos frutos do morango (CIFM).

Chaar (2000) propõe em sua pesquisa a realização desta reação sem uso de biocatalisador, porém mediante o acetato de sódio e na temperatura de 120 °C e obteve um rendimento de 49% de acetato de linalila, que se comparado com os rendimentos obtidos nesta pesquisa é maior. Mas analisando as condições reacionais em que a referida reação ocorre, é viável o uso de biocatalisadores, pois permitem condições reacionais mais brandas, como as apresentadas nesta pesquisa.

A obtenção do acetato de linalila é importante principalmente para a indústria de cosméticos que emprega esse produto como fixador de aromas em perfumes (WEI et al., 1997).

6.1.2. Reações com células íntegras da água de coco

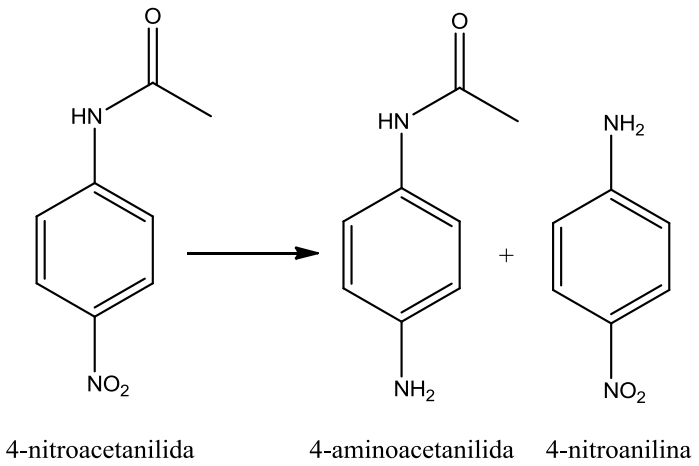
Neste teste verificou-se a formação de dois produtos, a 4-aminoacetanilida resultante da biorredução do substrato proposto (4-nitroacetanilida) e a 4-nitroanilina obtida a partir da hidrólise desse mesmo substrato. Os rendimentos obtidos tiveram uma variação de 52,20% para o produto resultante da biorredução e 40,30% para o produto resultante da hidrólise, conforme apresentado na tabela 2.

Analisando as estruturas dos produtos obtidos, verificou-se que as mesmas são favoráveis à síntese do paracetamol, principalmente a 4-aminoacetanilida, que sofrendo uma substituição do grupo amino pela hidroxila transforma-se no paracetamol. Desta forma, estes produtos podem servir de precursores para síntese desse fármaco.

Tabela 2. Biorredução de compostos usando CIAC.

Reagente	Produtos	Produtos (%)	Identificação dos produtos
1(4-nitroacetanilida)	1’	52,20	4-aminoacetaniliada
	1’’	40,30	4-nitroanilina

A seguir está apresentado o esquema reacional que ilustra a bioconversão do substrato 4-nitroacetanilida:



Esquema 5 – Esquema reacional da 4-nitroacetanilida.

O mecanismo da síntese da 4-nitroacetanilida descrito na literatura envolve diversas etapas que são sensíveis e podem influenciar no resultado empírico do experimento (SOLOMONS; FRYHLE, 2012). Ferreira et al., 2013 desenvolveram a reação de hidrolise deste substrato utilizando ácido sulfúrico a 70% como catalisador na presença do hidróxido de sódio e obtiveram rendimento de 68,5%.

Apesar de se obter bons rendimentos via catálise química, o emprego de biocatalisadores torna-se importante porque limita as etapas do processo reacional, alem de contribuir para o desenvolvimento de uma síntese menos agressiva ao meio ambiente.

A biotransformação da 4-nitroacetanilida constitui-se também numa rota essencial de obtenção de precursores que podem ser utilizados na preparação de compostos ativos, como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE’s).

7. CONCLUSÃO

Os vegetais estudados apresentaram-se como potenciais agentes biocatalisadores, pois a partir de suas células íntegras e imobilizadas foi possível obter resultados que comprovaram sua eficácia, na obtenção de produtos com rendimentos positivos como, por exemplo, 56% de álcool benzílico, 45% de 1-feniletanol, 35% de acetato de linalila, 52,20% de 4-aminoacetanilida e 40,30% de 4-nitroanilina.

Os resultados obtidos permitem-nos refletir acerca das aplicações industriais que as espécies estudadas podem ter, uma vez que podem ser empregadas nas reações de biorredução e acetilação tanto na forma *in natura* (células íntegras) como imobilizada. Quanto à água de coco, verificou-se que a mesma possui potencial enzimático que possibilita seu emprego, na preparação de compostos ativos, como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's).

Apesar da maioria dos rendimentos obtidos se mostrarem inferiores a 50%, os biocatalisadores empregados nas reações de redução de compostos quirais (como no caso da acetofenona) mostraram-se bastantes seletivos, chegando atingir excessos enantioméricos de 97%, podendo desta forma, ser empregados na obtenção de substâncias enantiomericamente puras.

8. REFERÊNCIAS

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. **Green Chemistry**: Theory and Practice, Oxford University Press: Oxford, 1998.

ASSUNÇÃO, J. C. C.; MACHADO, L. L.; LEMOS, T. L. G.; CORDELL, G. A.; MONTE, F. J. Q. Sugar cane juice for the bioreduction of carbonyl compounds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Fortaleza-Ce, v. 52–53 p. 194-198. Jan. 2008.

AZEVEDO, C. D. O. Diversidade genética de populações de coqueiro (*cocos nucifera L.)* via marcadores SSR, Rio de Janeiro, p. 1-46, 2014. Disponível em: <http://uenf.br/pos-graduacao/gmp/files/2014/05/Tese-MS-Carlos-Diego-O-Azevedo.pdf>. Acesso em 05 mai. 2015.

BARBIERI, C.; BOSSI, L.; D'ARRIGO, P.; PEDROCCHI, F.G.; SERVI, S. Bioreduction of aromatic ketones preparation of chiral benzyl alcohol in both enantiomeric forms. *Journal of Molecular Catalysis B*: *enzymatic* , v. 11, p. 415-421, 2001.

BARON, A.M.; Preparação e Caracterização de Lipases Imobilizadas para Utilização em Biocatálise. 2008. 138f. Tese (Doutorado em Química)- Setor de ciências exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BERTINE, L. M.; LEMOS, T. L.G; ALVES, L. A .; MONTE F. J. Q.; MATTOS, M. C.; OLIVEIRA M. C. F. Soybean (Glycine max) as a versatile biocatalyst for organic synthesis. *African Journal of Biotechnology*, Fortaleza-Ce, v. 11(30), p. 7766-7770, abr. 2012. Disponível em: <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/102861/93110>. Acesso em: 05 dez. 2015.

BISATTO, Rubens. Poliésteres via Catálise Enzimática Heterogênea. Porto Alegre, 2012. Dissertação (mestrado em Química)- Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

CAPOZZIELLO, S.; LATTANZI, A. Geometrical approach to central molecular chirality: a chirality selection rule. *Chirality*, Italy, v. 15, p. 227-230, fev.2003.

CASTRO, Ricardo Lima de et al., . Produtividade de cultivares de morangueiro em sistema de cultivo orgânico. *Hortic. Bras.*, Brasília , v. 21, n. 2, p. 227-230, Jun. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362003000200021&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 07 Dez. 2015.

CONTIERO, J.; LOVAGLIO, R. B.; DE PAULA, F. C.; NETO, P. A.; CORTEZI, M.; PALMUTTI, M. H.; COELHO, L. F.; BLANCO, K. C. Biorrefinarias, alcoolquímica e oleoquímica. In: LEMOS, E. G. M.; STRADIOTTO, N. R. **Bioenergia**: Desenvolvimento,

Pesquisa e Inovação. 1ª ed. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2012. Vol. 1, capítulo. 13, p. 409-446. Disponível em: <http://www.culturaacademica.com.br/_img/arquivos/bioenergia-digital.pdf>. Acesso em: 25 abr. 2015.

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

CHAAR, J. S. Estudos Analiticos e Modificação Química por Acetilação do Linalol Contido no Óleo Essencial da Espécie *Aniba Duckei Kostermans.* São Carlos, 2000. Tese (doutorado em Química Analítica)- Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

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

CLARK, J. H. **Green chemistry:** challenges and opportunities**,** United Kingdom, v. 1, p. 1-8, fev. 1999. Disponível em: <http://www.newreka.co.in/pdf/Green%20Chemistry%20-%20Challenges%20%20Opportunities.pdf>. Acesso em: 2 set. 2015.

DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS J. C. Modificação de Óleos e Gorduras por Biotransformação, *Quim. Nova*, Campinas- SP, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v27n1/18823.pdf>. Acesso em: 10 set. 2015.

DE CONTI, R.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. **Biocatálise:** avanços recentes. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 24, n.5, p. 672-674, Out. 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422001000500014&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 27 Jun. 2015.

DIAS, F. R. F.; FERREIRA, V. F.; CUNHA, A. C. Uma Visão Geral dos Diferentes Tipos de Catálise em Síntese Orgânica. *Rev. Virtual Química*, Niterói- RJ, v. 4, n. 6, p. 840-871, dez. 2012. Disponível em: <https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CB4QFjAAahUKEwjVoPDU3s7HAhXJhJAKHSmyCWM&url=http%3A%2F%2Fwww.uff.br%2FRVQ%2Findex.php%2Frvq%2Farticle%2FviewFile%2F371%2F291&ei=d-HhVZWJKMmJwgSp5KaYBg&usg=AFQjCNFrl75neMFr3o4SQNI1ReHzH6h5Sg&sig2=_da51Ig5iiMY5FRtU5twYw>. Acesso em: 20 Jul. 2015.

DUARTE, A. C. P.; COELHO, M. A. Z. Identification of peroxidase and tyrosinase in green coconut water. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Rio de Janeiro, v. 3, 5, p. 266, set. 2002. Disponível em: <http://www.redalyc.org/pdf/724/72430501.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2015.

ELLAIAH, P. et al. Production of lipase by immobilized cells of Aspergillus niger. *Process Biochemistry*, India, v. 39, p.525-528, nov. 2001.

FABER, Kurt. Biotransformations in Organic Chemistry, 3 ed. Berlin: Springer, 1997.

FABER, Kurt. Biotransformations in Organic Chemistry, 5. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2004.

FERREIRA, Hercules, Vicente. Resolução Enzimática de Alcoóis racêmicos com Lípase de *Cândida Antarctica* e Redução de Cetonas com Fungos de Origem Marinha. São Carlos, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências: Físico- Química)- Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

FERREIRA, V. F.; DA ROCHA, D. R.; DA SILVA, F. C. Química Verde, Economia Sustentável e Qualidade de Vida. *Revista. Virtual Química*, v. 6, n. 1, p. 85-111. Disponível em: <http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewFile/435/381>. Acesso em: 15 Jul. 2015.

FONSECA, A. M.; MONTE, F. J. Q.; OLIVEIRA, M. C. F.; MATTOSA, M. C.; CORDELL, G. A.; BRAZ-FILHO, R.; LEMOS, T. L. G. **Coconut water (Cocos nucifera L.)**- A new biocatalyst system for organic synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Fortaleza-ce, v. 57, p. 78, 2009.

FONSECA, A. M. Contribuição ao conhecimento fitoquímico e biotecnológico da água de coco (*cocos nucifera L.)*. 2009. 220f. Tese (Doutorado em Química Orgânica)-Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

FONSECA, A. M.; SOUSA, L. M.; CAVALCANTE, A. A. S.; LIMA, V. M. F.; SILVA, F. A. L.; LEMOS, T. L. G. Breve introdução ao estudo biocatalítico das células íntegras do morango (*Fragaria vesca*). In: Sociedade Brasileira de Química- 36ª Reunião Anual, 2013. Águas de Lindóia- SP. Anais eletrônicos. Disponível em: <http://www.eventoexpress.com.br/cd-36rasbq/resumos/T0627-1.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2015.

FONSECA, A. M.; DE MATTOS, M. C.; MONTE, F. J. Q.; CORDELL, G. A.; BRAZFILHO, R.; LEMOS, T. L. G., Água de coco como agente biocatalisador em reações orgânicas. In: Sociedade Brasileira de Química- 30ª Reunião Anual, 2007. Águas de Lindóia-SP. Anais eletrônicos. Disponível em: <http://sec.sbq.org.br/cdrom/30ra/resumos/T0821-1.pdf>. Acesso em: 11 Out. 2015.

FONSENCA, A. M.; JESUS, I. S.; NOGUEIRA, F. B.; SILVA, J. G. S.; COLARES, R. P.; LEMOS, T. L. G.; DE FÁTIMA, A. Reações de biocatálise através de sistema de células íntegras e de enzimas imobilizadas dos talos do mamoeiro (*Carica papaya*). In: VI Workshop

de Biocatálise e Biotransformação, 2012. Fortaleza- Ce. Anais eletrônicos. Disponível em: <http://www.quimica.ufc.br/resumosbiocatbiotrans2012/resumo007.pdf>. Acesso em: 30 nov, 2015.

FONSENCA, A. M.; JESUS, I. S.; NOGUEIRA, F. B.; SILVA, J. G. S.; COLARES, R. P.;LEMOS, T. L. G. O uso de enzimas imobilizadas da água de coco (*Cocos nucifera*) em reações de acetilação. In: VI Workshop de Biocatálise e Biotransformação, 2012. Fortaleza-Ce. Anais eletrônicos. Disponível em: <http://www.quimica.ufc.br/resumosbiocatbiotrans2012/resumo009.pdf>. Acesso em: 28 nov. 2015.

JESUS, I. S.; NOGUEIRA, F. B.; SILVA, J. G.; FONSECA, A. M.; COLARES, R. P.; LEMOS, T. L. G., O Uso de Enzimas Imobilizadas de Talos do Mamoeiro na Produção de Biodiesel. In: Sociedade Brasileira de Química- 35ª Reunião Anual, 2012. Águas de Lindóia-SP. Anais eletrônicos. Disponível em: <http://sec.sbq.org.br/cdrom/35ra/resumos/T1420-1.pdf>. Acesso em: 28 ago. 2015.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial Applications of Microbial Lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. Pakistan, v. 39, n. 2, P. 235–251, jun. 2006.

KALOGERIS, E.; SANAKIS, Y.; MAMMA, D.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; STAMATIS, H. Properties of catechol 1,2-dioxygenase from Pseudomonas putida immobilized in calcium alginate hidrogels. *Enzyme and Microbial Technology*, Greece, v. 39, n.5, p. 1113-1121, set. 2006.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and microbial technology*, Poland, v. 35, n. 2-3 p. 126–139, ago. 2004.

LOPES, D. B. Comparação do Perfil das Lactonas Produzidas por Biotransformação Microbiana e Biocatálise Enzimática a Partir dos Óleos de Mamona e Linhaça. Campinas, 2013. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos)- Setor de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C. C. **"Green chemistry" -** Os 12 Princípios da Química Verde e sua Inserção nas Atividades de Ensino e Pesquisa. *Quím. Nova*, São Paulo, v.26, n.1, p.123-129, fev. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000100020&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 20 Mai. 2015.

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

MURRAY, R. K. Bioquímica. Cap.7, 6 ed. São Paulo: ATHENEUS, 1990.

MENDES, A. A.; CASTRO, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Química Nova*, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422011000500019&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 27 Aug. 2015.

NAVARRO, M.; SENA, V. L. M.; SRIVASTAVA, R. M.; NAVARRO, D. M. Atualizando a química orgânica experimental da licenciatura. *Química. Nova***,** São Paulo, v. 28, n. 6, p.1111-1115, dez. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000600028&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 15 Jul. 2015.

OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M.. **Biological transformations**: contributions and perspectives. *Quíica Nova*, São Paulo, v. 32, n. 3, p.742-756, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000300018&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 09 Ago. 2015.

OMORI, A. T.; PORTAS, V. B.; OLIVEIRA, C. S. Redução enzimática do 4-(dimetilamino) benzaldeído com pedaços de cenoura (*Daucus carota*): um experimento simples na compreensão da biocatálise. *Química Nova*, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 435-437, set. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000200036&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 23 Jun. 2015.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. **Lipases de Látex Vegetais**: Propriedades e Aplicações Industriais. *Química. Nova*, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 93-99, fev. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000100018&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 12 Jul. 2015.

PEÇANHA, Anderson, Lopes. Metabolismo Fotossintético, Crescimento e Estado Nutricional do Mamoeiro (*Carica papaya L.*) em Resposta á Condutividade Elétrica da Solução de Cultivo. 2010. Tese (Doutorado em Produção Vegetal)- Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro.

POLIAKOFF, M.; FITZPATRICK, J. M.; FARREN, T. R.; ANASTAS, P. T. Green Chemistry: *Science* and Politics of Change. *Science*, Japão, v. 297, n. 5582, p. 807-810, ago.

2002. Disponível em: <http://precaution.org/lib/green_chemistry.020802.pdf>. Acesso em: 29 ago. 2015.

PRADO, A.G.S. Green chemistry, the chemical challenges of the new millenium. *Química Nova*, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 738-744, Out. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000500018>. Acesso em: 20 nov. 2015.

RESENDE, L.M.A.; MASCARENHAS, M.H.T.; PAIVA, B.M. Panorama da produção e comercialização do morango. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 20, n. 198, p. 5-19, 1999.

RISCH, D. H. Aplicação da Biocatálise na Indústria, Blumenau, p.1-34. 2007. Disponível em: <https://www.furb.br/especiais/download/584611-305524/Biocatalise%20na%20industria.pdf>. Acesso em 07 Ago. 2015.

SANTI, F. C.; COUTO, W. R. Morango em cultivo orgânico, p.1-10, 2011. Disponível em: <http://fait.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/aWkP2AvdKosYXMl_2014-4-16-14-43-52.pdf>. Acesso em 02 Jun. 2015.

SILVA, P. J.; PAULUZI, E. R. VILVERT, M.; PORTO, A. L. M; JÚNIOR, A. L. Biorredução de acetofenona utilizando enzimas vegetais. In: Sociedade Brasileira de Química- 35ª Reunião Anual, 2012. Águas de Lindóia-SP. Anais eletrônicos.Disponivel em: <<http://sec.sbq.org.br/cdrom/35ra/resumos/T0065-1.pdf>>. Acesso em: 27 ago. 2015.

SILVA, R. L. F. O. B.; SOUZA, R. R..; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURG, E. B. Imobilização de enzimas de milho maltado em gel. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 28, n. 3, p. 642-648, set. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612008000300021&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 05 Dez. 2015.

SOLOMONS, T. W. G. FRYHLE, C. B. Química orgânica, 10ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. Vol 1.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, A. L. Microbiologia**.** 8ª ed. 1ª reimpressão, Porto Alegre: Artmed, 2006.

TUNDO, P.; ANASTAS, P.; BLACK, D. S.; BREEN, J.; COLLINS, T.; MEMOLI, S.; MYIAMOTO, J.; POLYAKOFF, M.; TUMAS, W. Synthetic pathways and processes in green chemistry. Introductory overview**.** *Pure Appl. Chem*, v. *72*, p. 1207-1228, 2000. Disponível em: <https://arca.unive.it/retrieve/handle/10278/31443/25843/PAC2000n72-7.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2015.

VENTURINI, T.; BENCHIMOL, L. R.; BERTUOL, D. A.; DA ROSA, M. B.; MEILI, L. Estudo da Secagem e Extração de Sementes de Mamão (*Carica Papaya L.*). *Rev. Eletrônic em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, v. 5, n.5, p. 950 – 959. 2012. Disponível em: <http://cascavel.ufsm.br/revistas/ojs-2.2.2/index.php/reget/article/view/4640/3223>. Acesso em: 24 Jun. 2015.

VIEIRA, G. A. B.; ARAUJO, D. M. F.; LEMOS, T. L. G.; MATTOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; MELO, V. M. M.; GONZALO, G.; FERNÁNDEZ-GOTOR, V.; GOTOR, V. Candida tropicallis CE017: a new brazilian enzymatic Source for the bioreduction of aromatic prochiral ketones. *Journal Brazilian Chemystry Society*, Fortaleza-ce, v. 21, n. 8, p. 1509-1516, 2010. Disponível em: <http://jbcs.sbq.org.br/imagebank/pdf/v21n8a15_supl01.pdf >. Acesso em: 15 set. 2015.

WEI, R.B.; YUAN, Z.Y.; LI, H. X. Solid acid-catalysed synthesis of linalyl acetate in the presence of HMCM-4. *Gazzetta Chimica Italiana*, v. 127, n. 12, p. 811-814, 1998.

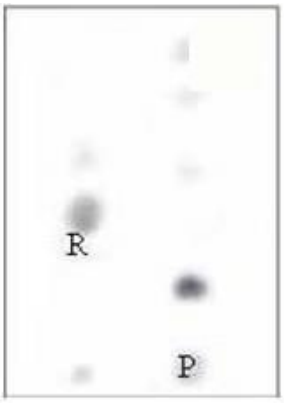
YAN, Z. et al., Biocatalytic reduction of prochiral aromatic ketones to optically pure alcohols by a compled enzyme sytem for cofactor regeneration. *Tetrahedron Letters*, v.52, p. 999-1002, 2011.

ZANOTTO, S. P. Utilização de Enzimas e Microrganismos para a Obtenção de Compostos Oticamente Ativos. 2003. 115f. Tese (Doutorado em Química)- Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ZUIN, V. G.; CORREA, A. G. **Química verde** – Fundamentos e Aplicações, 1 ed. São Carlos: Edufscar, 2009.

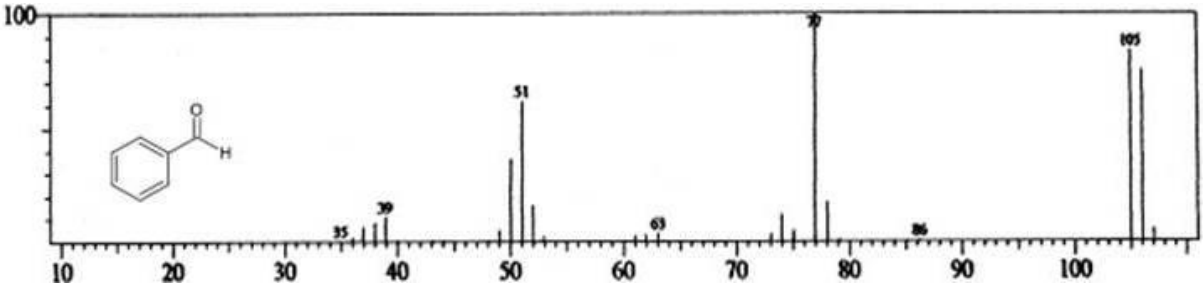
ANEXO A _ DADOS OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

*Cromatografia em camada delgada do benzaldeído e seu respectivo álcool. (**R**: reagentes e **P**: produtos)*

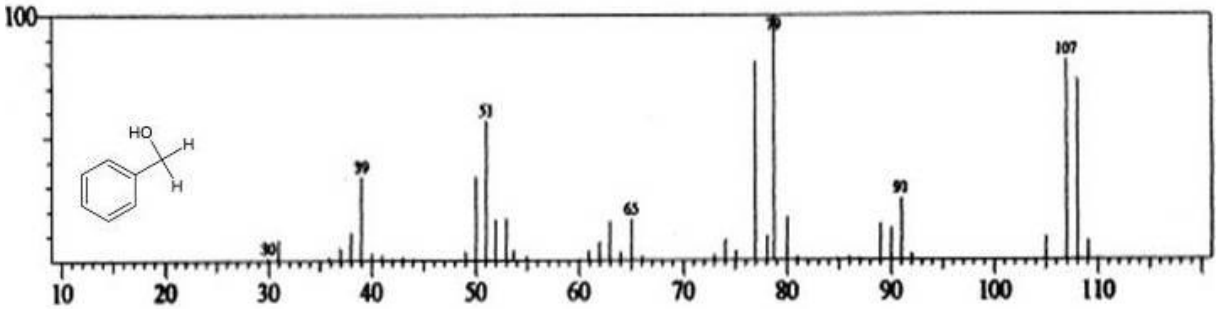


Cromatografia em camada delgada da acetofenona e seu respectivo álcool.

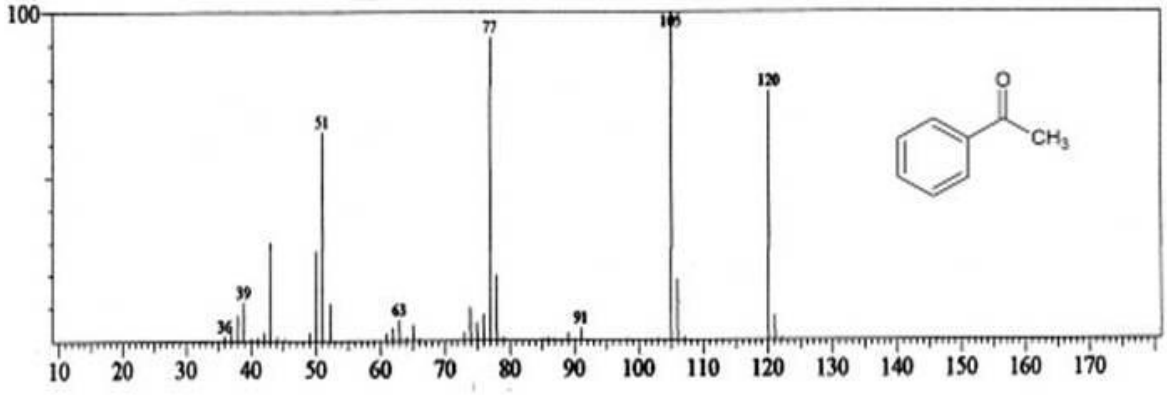
ANEXO B _ ESPETROS DE MASSAS



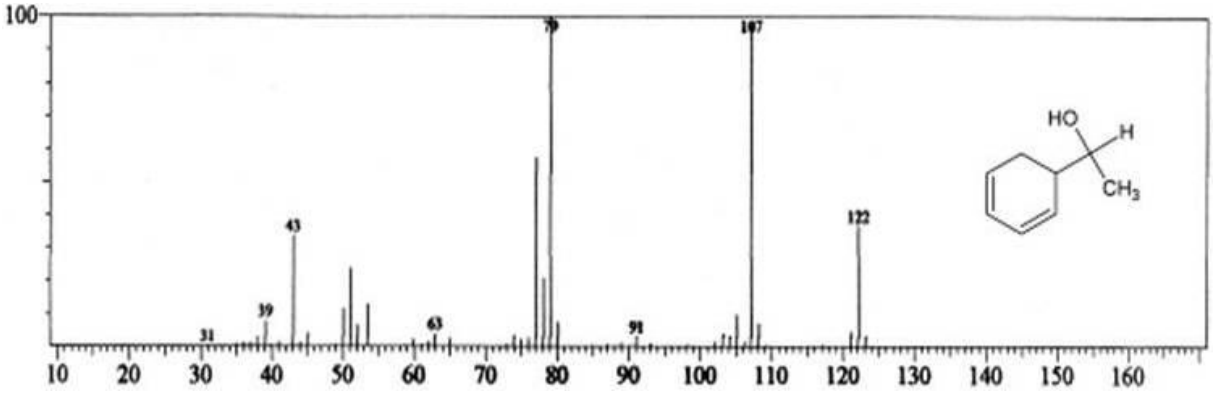
Espectro de massa do benzaldeído.



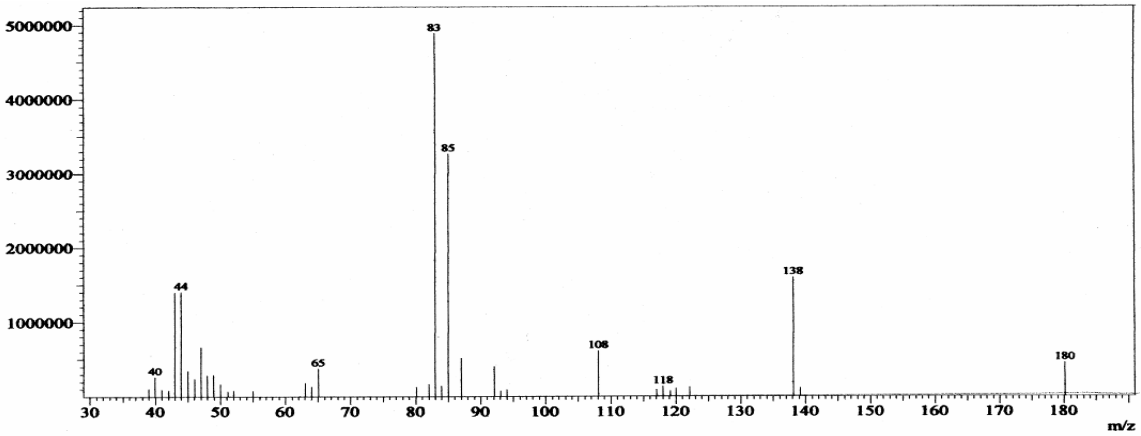
Espectro de massa do álcool benzílico.



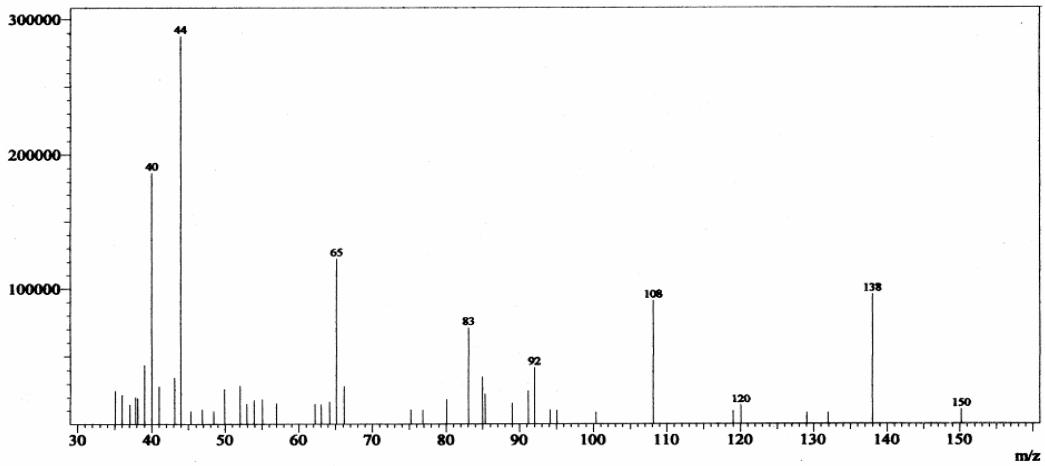
Espectro de massa da acetofenona.



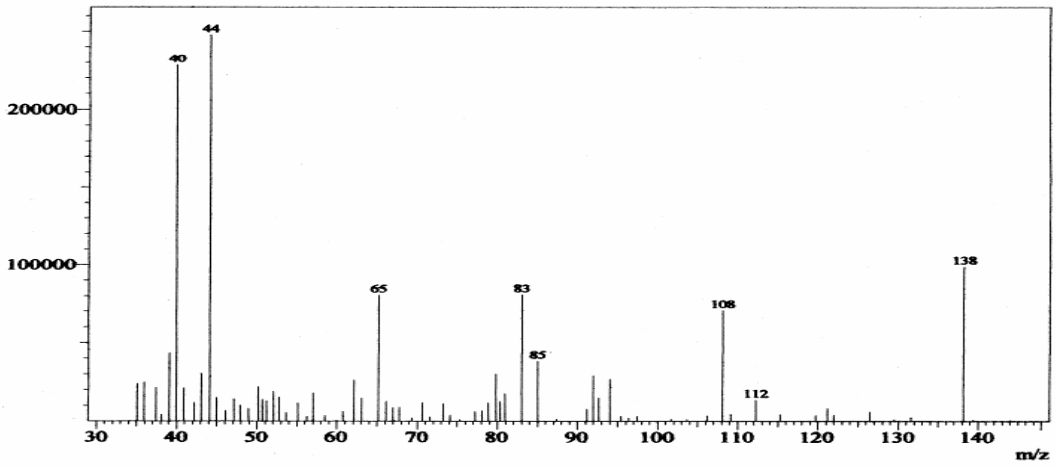
Espectro de massa da 1-feniletanol.



Espectro EIMS do composto 4-nitroacetanilida

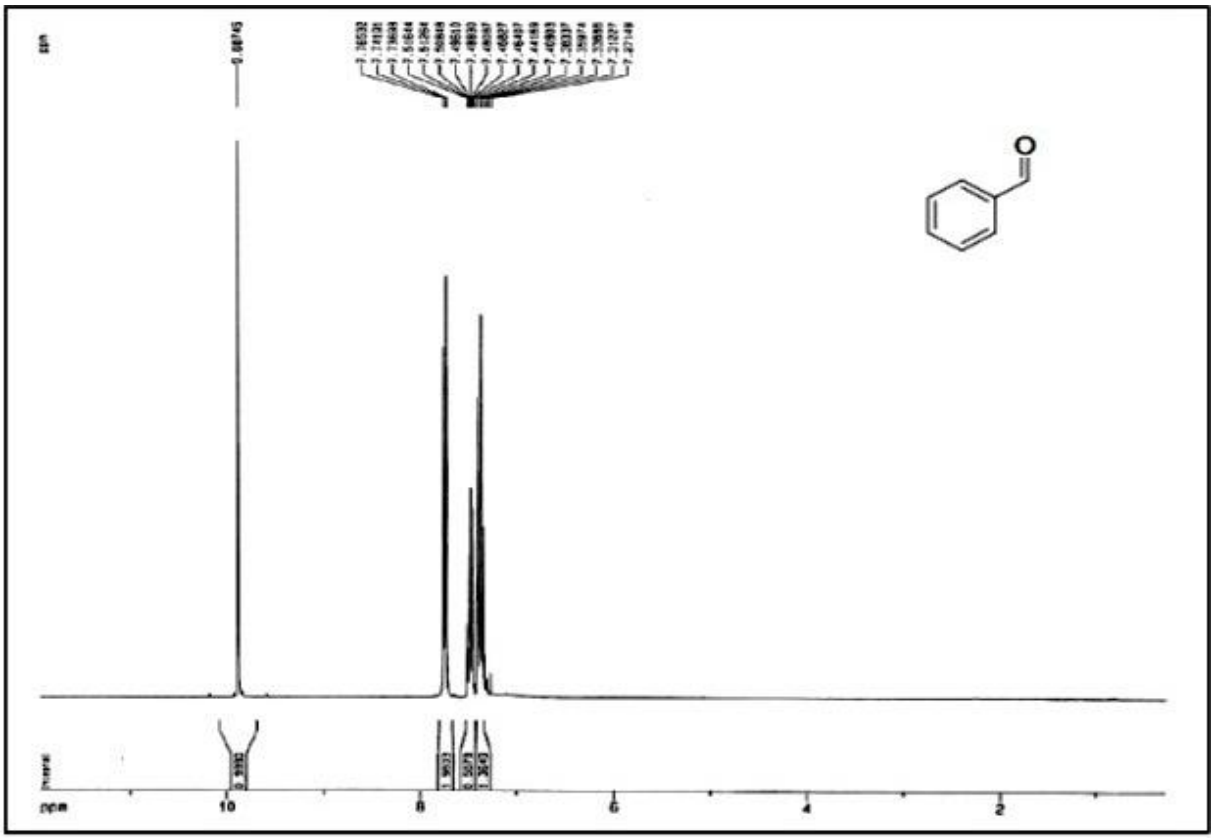


Espectro EIMS do composto 4-aminoacetanilida.

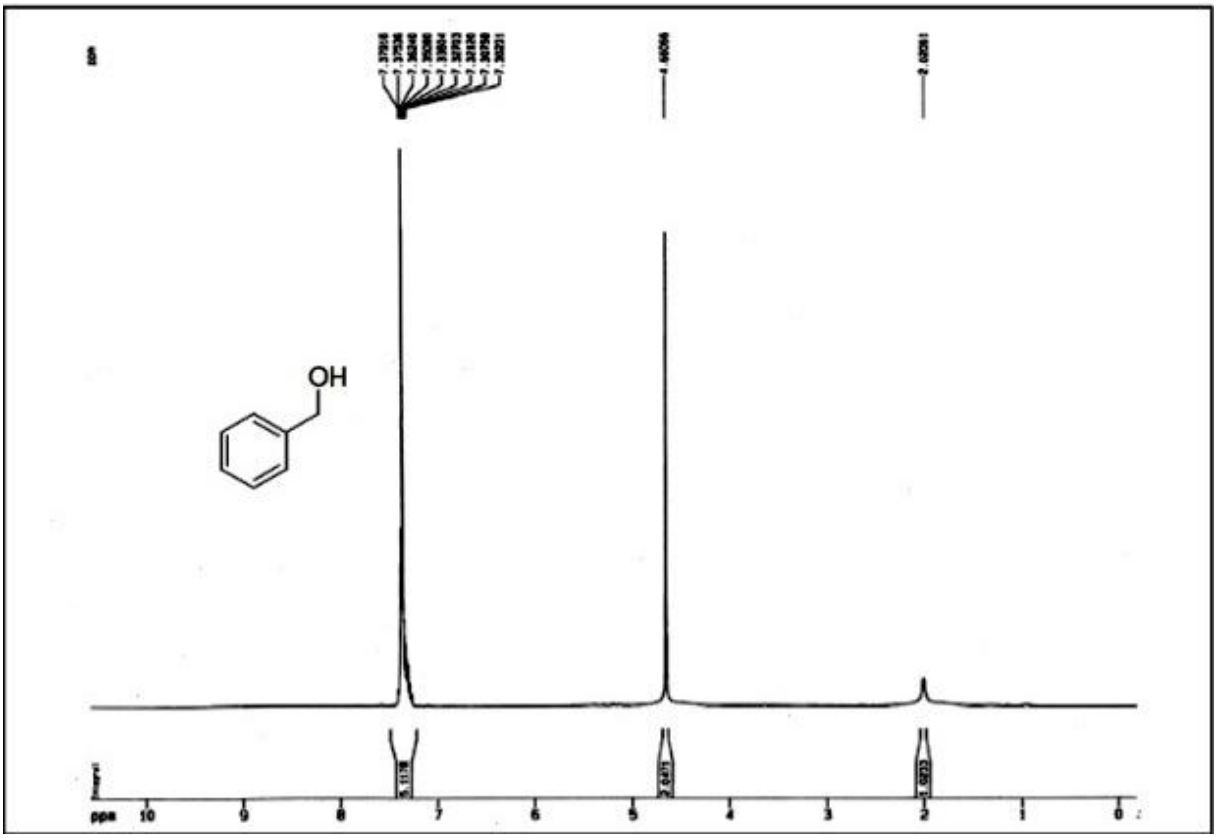


Espectro EIMS do composto 4-nitroanilina.

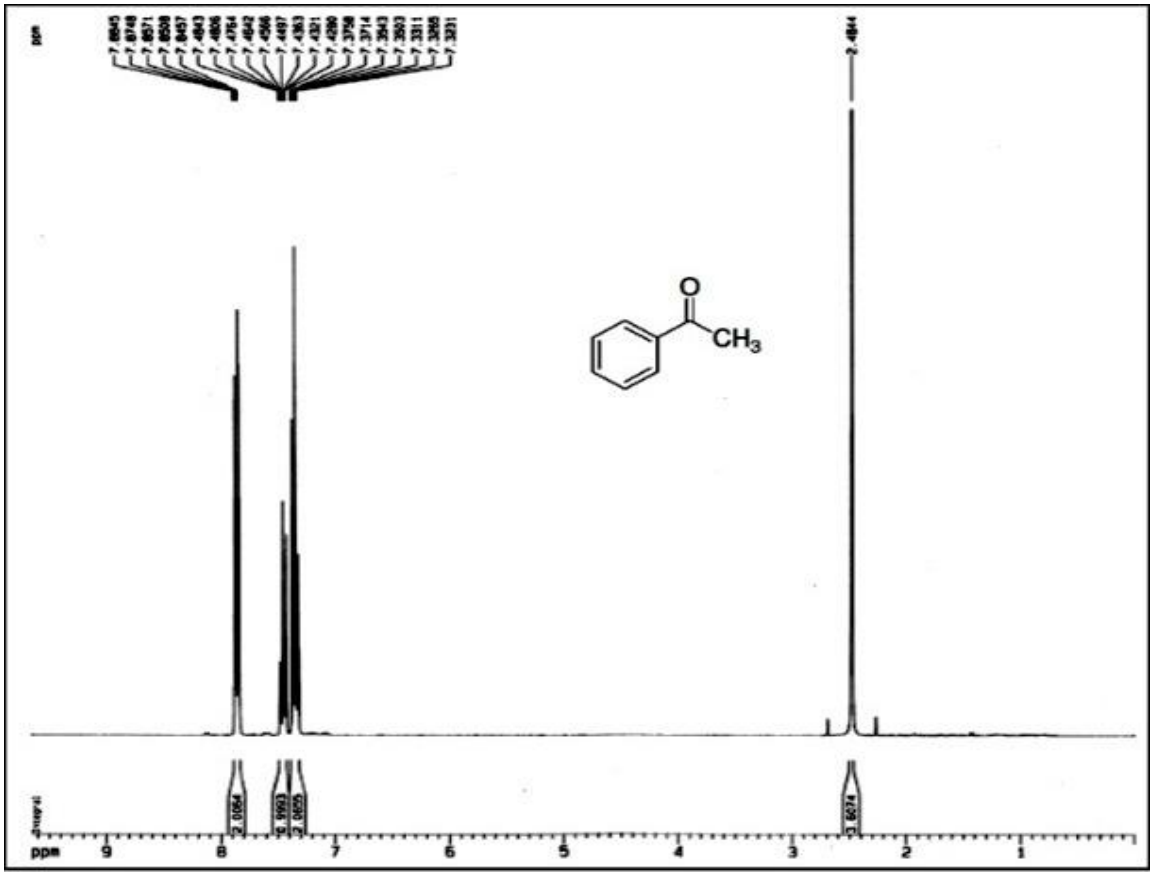
ANEXO C _ ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA



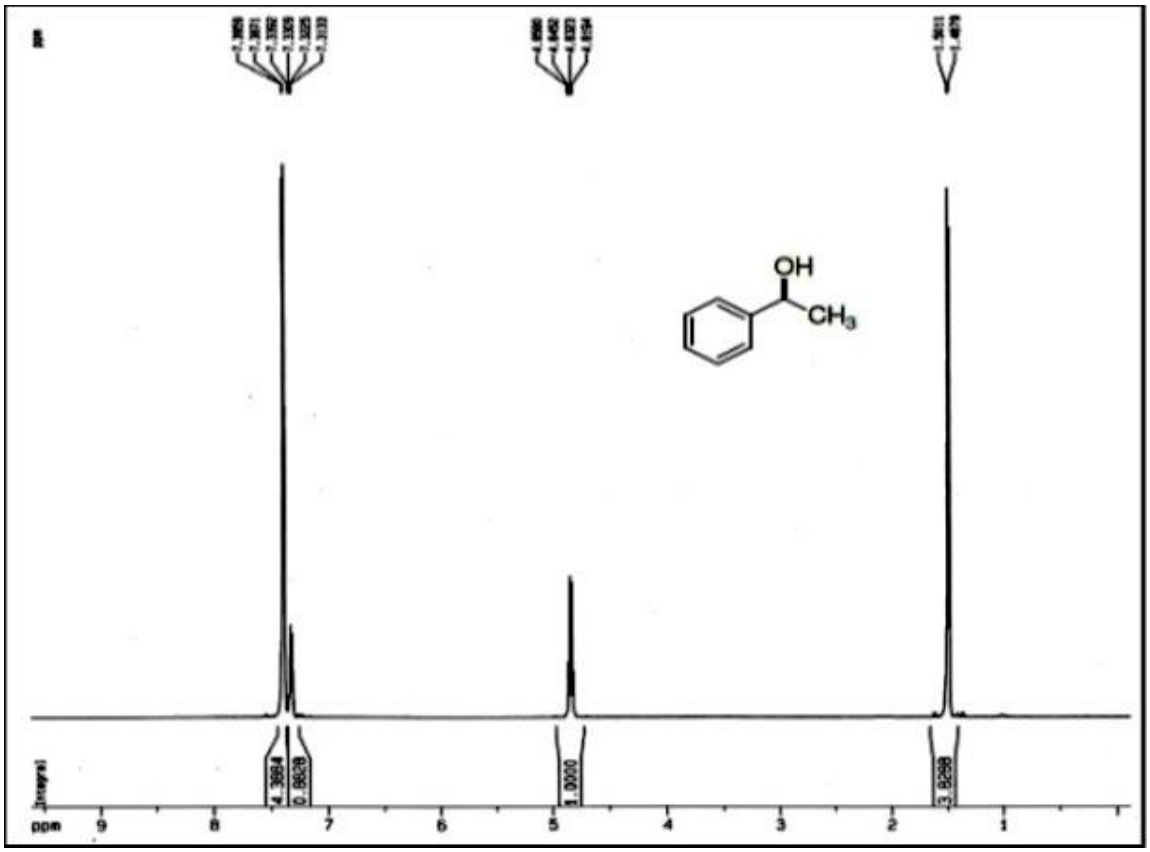
Espectro de RMN de 1H (300 MHz, CDCl3 1,88mmolL-1 do benzaldeído).



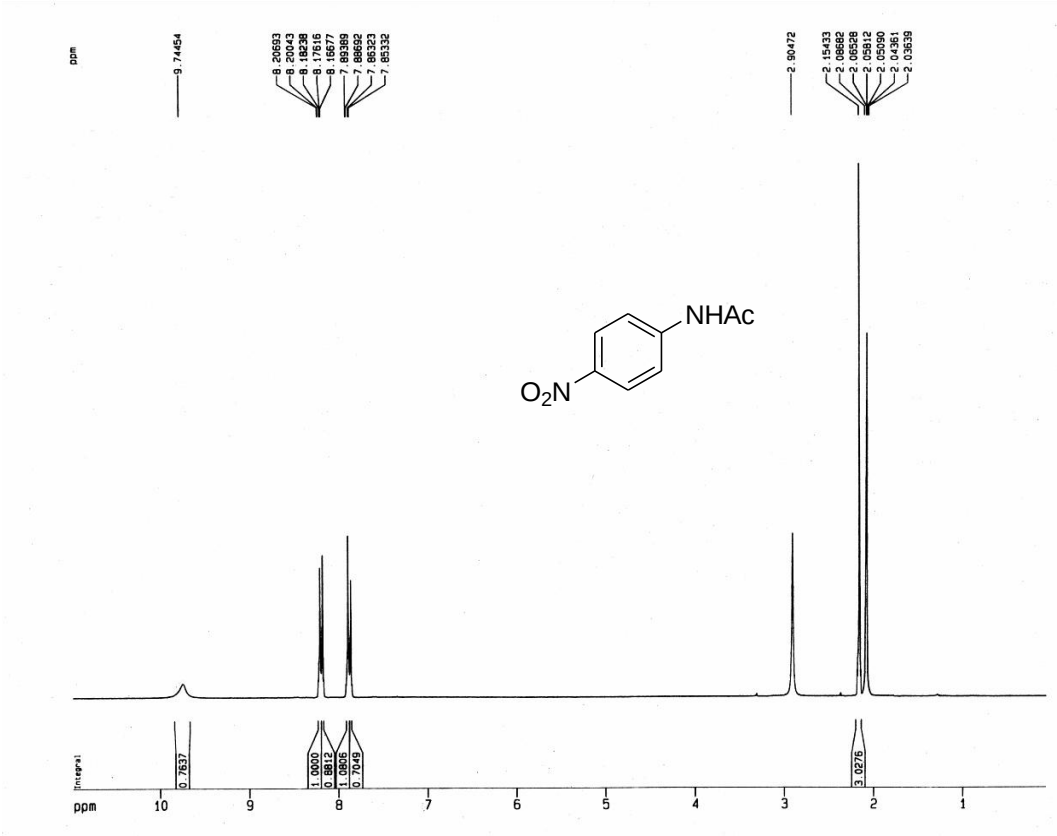
Espectro de RMN de 1H (300 MHz, CDCl3 do álcool benzílico).



Espectro de RMN de 1H (300 MHz, CDCl3 1,66mmolL-1 da acetofenona).

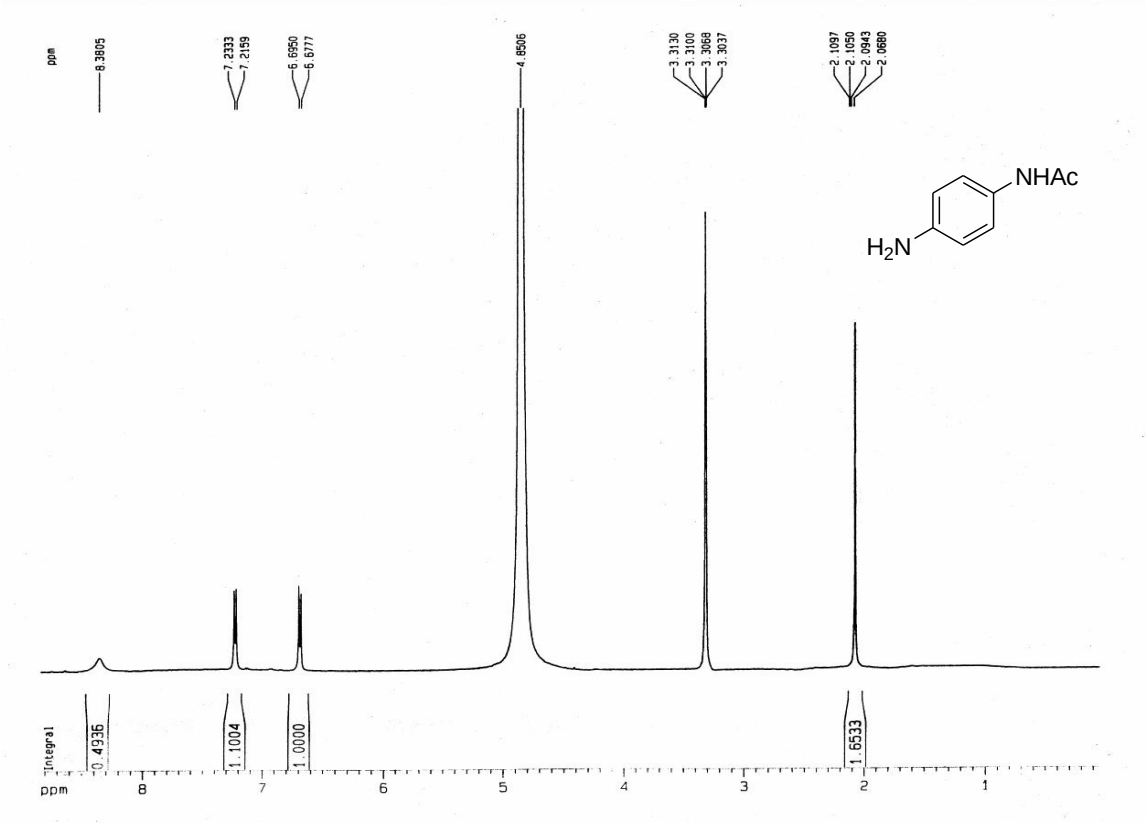


Espectro de RMN de 1H (300 MHz, CDCl3 do 1-feniletanol).

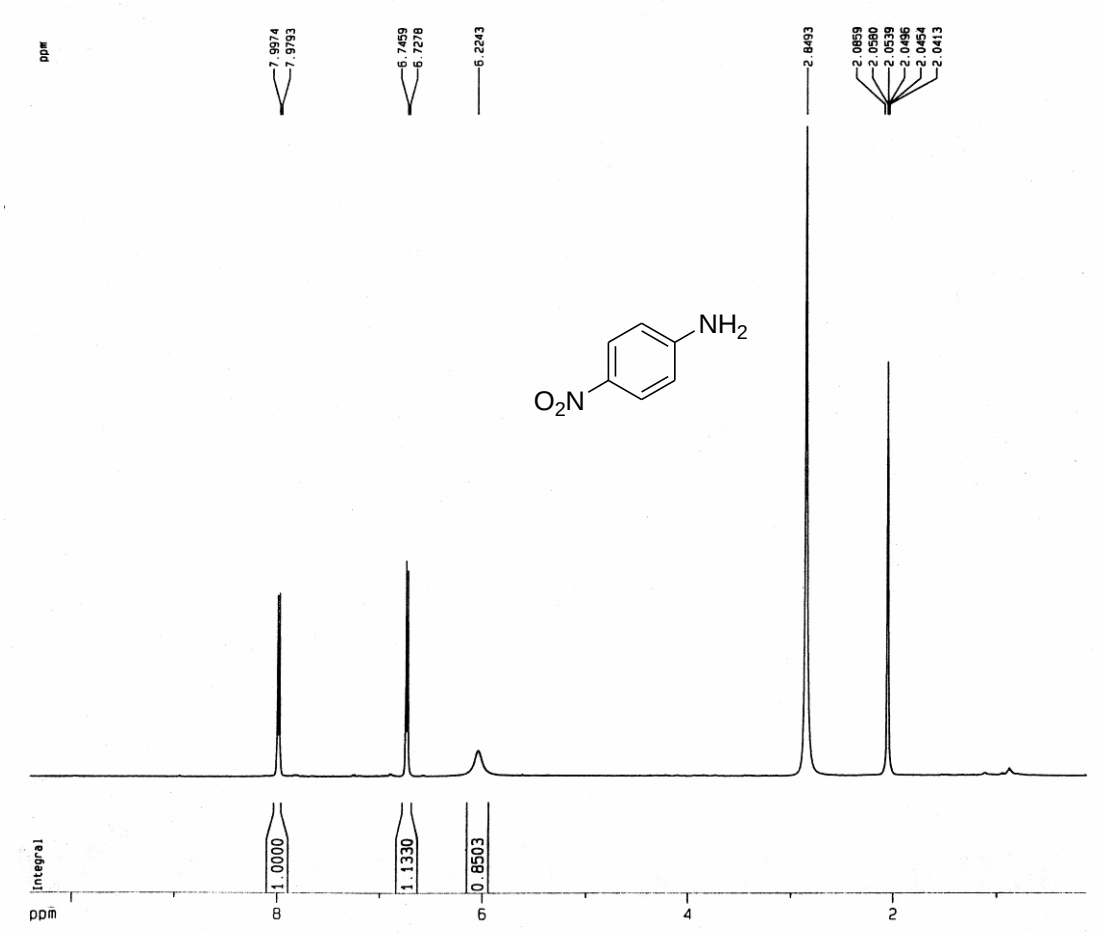


Espectro RMN H^1 (500 MHz, $(CD_3)_2CO$) do reagente 4-nitroacetanilida

.



Espectro RMN H^1 (500 MHz, CD_3OD) do composto 4-aminoacetanilida.



Espectro RMN H^1 (500 MHz, $(CD_3)_2CO$) do composto 4-nitroanilina.