

BIORREDUÇÃO DA ACETOFENONA UTILIZANDO CÉLULAS ÍNTEGRAS DO FRUTO DO JATOBÁ COMO BIOCATALISADORES

Caroline R. Teixeira (PG)¹; Marta S. Jesus (PG)¹; Lucineia C. Schneider (PQ)¹; Raimundo F. S. Filho (PQ)² Valdeilson S. Braga (PQ)¹; José Domingos S. Silva (PQ)¹; Luciana L. Machado (PQ)^{*1}

¹Universidade Federal do Oeste da Bahia - Centro das Ciências Exatas e das Tecnologias - Programa de Pós-Graduação em Química Pura e Aplicada.

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano - *Campus Guanambi*.

¹caroline.t0753@ufob.edu.br; ¹luciana.lucas@ufob.edu.br.

Palavras-Chave: Álcoois quirais, biocatálise, cetonas aromáticas, enzimas redutoras.

Introdução

A biocatálise ou biotransformação consiste na utilização de catalizadores naturais, as enzimas, que realizam modificações específicas ou interconversões da estrutura química de substâncias orgânicas. As reações catalisadas por enzimas são viáveis do ponto de vista ambiental, uma vez que diferente dos catalisadores químicos convencionais, estes estão intrinsecamente ligados aos princípios da química verde (Castro, 2004; Souza, 2012).

As reações de catálise enzimática são caracterizadas pela transformação de um substrato não-natural catalisado por células íntegras que contêm enzimas ou por enzimas isoladas provenientes de micro-organismos (bactérias, leveduras, archeas), fungos filamentosos, plantas, animais e vegetais (Milagre, 2023). Assim, a escolha de biocatalisadores eficientes é uma alternativa para a metodologia tradicional, visto que as enzimas são originadas de fontes sustentáveis, são biodegradáveis e apresentam baixa ou nenhuma toxicidade (Souza, 2012).

A aplicação de células íntegras no processo de catalise é bastante atrativa industrialmente, em especial para a indústria farmacêutica, visto que as enzimas são altamente versáteis e permitem a obtenção de intermediários quirais com uma ampla aplicação, podendo catalisar a transformação de substratos não-naturais de forma regioseletiva, enantioseletiva e quimiosseletiva (Gonçalves, 2013). Com isso, a utilização de vegetais no processo de redução catalítica de cetonas para produção de álcoois vem ganhando destaque em estudos que buscam pela identificação de novos biocatalisadores provenientes de materiais de fácil obtenção e baixo custo (Milagre, 2023).

Nessa ótica, a utilização de fontes residuais de vegetais como biocatalisadores é amplamente investigada e discutida na literatura, mostrando-se vantajosa devido a ampla

biodiversidade de espécies conhecidas no Brasil. Nessa perspectiva, existem vegetais cultivados no país que podem servir como fontes enzimáticas redutoras, posto que na literatura encontram-se dados de estudos com células integras de *Passiflora edulis* (maracujá) (Machado *et al.*, 2008), *Manihot dulcis* e *Manihot esculenta* (macaxeira e mandioca, respectivamente) (Machado *et al.*, 2006), *Cocos nucifera* (água de coco) (Fonseca *et al.*, 2009), *Ipomoea batatas* (batata doce) (Souza, 2013) e *Helianthus annuus* L (girassol) (Souza, 2012).

Nessa perspectiva, o jatobá (*Hymenea courbaril Linnaeus*) é uma espécie pertencente à família *Fabaceae* e à subfamília *Caesalpinioideae*. De acordo com suas propriedades botânicas, essa planta é caracterizada pela presença de folhas compostas e frutos com forma de vagens indeiscentes, duros e pardo-escuros, apresentando de 2 a 6 sementes, envoltas por uma polpa farinácea, comestível de grande valor nutritivo. Além disso, o jatobá também é considerado uma planta de grande porte, podendo ultrapassar até 30 metros de altura e 200 centímetros de diâmetro (Rosário *et al.*, 2022).

O presente trabalho teve como objetivo realizar experimentos relacionados à biocatálise com cetonas pró-quirais a partir da investigação de novas fontes vegetais com potencial promissor para biotransformação de substratos, destacando-se a casca e polpa proveniente do fruto do jatobá (*Hymenea courbaril Linnaeus*) na biorredução de cetonas aromáticas.

Material e Métodos

Os frutos de *Hymenea courbaril Linnaeus* (jatobá) foram coletados em fase de maturidade fisiológica com coloração da casca uniforme, marrom escura, no mês de dezembro de 2023 em seu ambiente natural na Fazenda Limeira, zona rural do distrito de Morrinhos, pertencente a cidade de Guanambi no estado da Bahia, Brasil (14°13'38.1"S 42°38'19.0"W) e, posteriormente, foram encaminhados para o Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB) localizado na cidade Barreiras no estado da Bahia, Brasil (12°08'54.8"S 45°01'18.9"W). Estes foram submetidas aos testes do potencial de redução enzimática de cetonas aromáticas pró-quiral e ainda se encontram disponíveis no herbário na Universidade para certificação da espécie vegetal.

Nessa perspectiva, foi utilizada a metodologia empregada por Machado (2006) com modificações nas quantidades do biocatalizador, do solvente e do substrato, considerando a mesma proporção em massa, a fim de reduzir custos operacionais. A cetona utilizada para a redução enzimática foi a acetofenona e os vegetais empregados foram a casca e a polpa da espécie *Hymenea courbaril Linnaeus* (jatobá).

Para cada reação utilizou-se uma proporção de 3,4g do vegetal, 30mg de acetofenona e 20mL de água destilada, acondicionados em erlenmeyers de 125 ml e submetidos a agitação de 140 rpm em temperatura ambiente por 96 horas. Em seguida as amostras foram filtradas e extraídas com duas partições de 20 ml com acetato de etila. Os materiais orgânicos foram secos com sulfato de potássio (K_2SO_4) e concentrados em rotaevaporador controlado sob pressão reduzida em banho maria a 60 °C. Na sequência, os materiais obtidos foram analisados em CCD (Cromatografia em Camada Delgada) por comparação dos spots da acetofenona (cetona) e do fenil etanol (álcool).

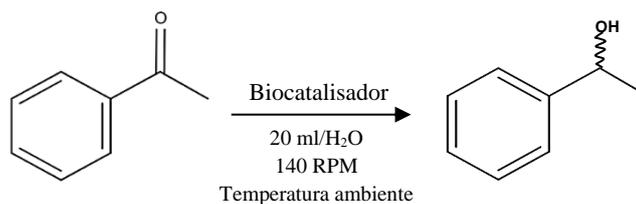
Com o objetivo de obter as melhores condições de reação para a redução enzimática da acetofenona, investigou-se o comportamento da enzima a cada 12 horas em um período de 96 horas. Assim, foram realizadas 8 reações nas proporções anteriormente descritas para cada uma das partes vegetais investigadas com tempo de duração de 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas, com o propósito de verificar o melhor tempo de conversão do substrato. Os produtos das reações foram analisados inicialmente em CCD, comparando-se os spots da acetofenona e do fenil etanol, e em seguida, foram analisados por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/MS).

Ao determinar os melhores valores de conversão aplicados ao tempo, foram realizadas reações variando a quantidade do biocatalisador no melhor tempo obtido. Para essas reações foram utilizadas 30mg de acetofenona, 20 ml de água com agitação de 140 rpm, a temperatura ambiente em diferentes quantidades do biocatalisador: 1,7g (metade da massa inicial), 3,4 (massa inicial), 6,8g (o dobro da massa inicial), 10,2g (o triplo da massa inicial) e 13,6g (o quádruplo da massa inicial). Os produtos das reações foram analisados por CG/MS.

Resultados e Discussão

As análises de CCD realizadas inicialmente para o tempo de 96 horas apresentou índices satisfatórios para a redução enzimática, uma vez que o material obtido da polpa e a casca do vegetal quando comparado com os spots da acetofenona e do álcool correspondente (fenil etanol) se mostraram promissores no estudo da biocatálise, em seguida a conversão foi confirmada pela análise no CG/MS. Nessa perspectiva, na finalidade de determinar as melhores condições experimentais para as partes do vegetal, realizou-se um estudo cinético variando o tempo reacional e a quantidade do biocatalisador.

Figura 01: Esquema de redução da acetofenona produzindo o 2-fenil etanol.



Fonte: Autores (2024).

Os resultados para a redução enzimática da polpa e a casca da espécie estudada variando o tempo reacional estão dispostos na tabela 01:

Tabela 01: Resultados de conversão (c%) para as reações realizadas em 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h, 84h e 96 horas utilizando a polpa e as cascas do fruto da espécie vegetal *Hymenea courbaril* *Linnaeus* (Jatobá) como biocatalisador.

Tempo de reação	Polpa do Jatobá c%	Casca do Jatobá c%
12 h	25,86	22,75
24 h	83,63	31,25
36 h	37,04	21,50
48 h	32,11	29,08
60 h	45,51	19,61
72 h	95,40	65,59
84 h	78,66	18,41
96 h	91,33	46,95

Fonte: Autores (2024).

Para os resultados obtidos da conversão utilizando a polpa do fruto da espécie jatobá, observou-se que nas primeiras 12h a conversão do substrato ao 2-fenil etanol foi de 25,86%, com 24h nota-se que produção álcool aumentou apresentando uma conversão de 83,67%. Em 36 e 48h, a produção do álcool diminui, chegando em 37,04 e 32,11 %, respectivamente, indicando a ocorrência de uma oxidação. Com 60h de reação, a produção do álcool começa a aumentar novamente, apresentando 45,51% de conversão. Na sequência, em 72h foi encontrado um excelente valor para c% do substrato, no qual observou-se 95,40 % de produção para o 2-fenil etanol. Nessa ótica, em 84h de reação é identificado uma pequena oxidação, visto que o valor de conversão é de 78,66%, aumentando a produção do álcool em 96h com uma conversão de 91,33% para polpa do fruto da espécie estudada.

Com relação aos resultados obtidos para a conversão dos experimentos realizados com a casca do fruto do jatobá, observou-se que nas primeiras 24h a conversão do substrato ao álcool correspondente foi de 22,75 e 31,25%, respectivamente. Em 36h, a produção do 2-fenil etanol diminui para 21,50%, indicando a ocorrência de uma oxidação. Com isso, em 48h esse valor de produção do álcool aumenta novamente para 26,08% e volta a oxidar em 60h, com valor de conversão igual a 19,61%. Em 72h, foi determinado o melhor valor de conversão do substrato com relação a casca do fruto da espécie, visto que a produção do álcool foi de 65,59%. Nessa perspectiva, em 84h de reação foi identificado dados que afirmaram uma oxidação, visto que o valor de c% apresentado foi de 18,41%, aumentando a produção do álcool em 96h com uma conversão de 46,95% para casca do fruto da espécie estudada.

De acordo com os dados alcançados é possível notar que resultados similares foram obtidos para os experimentos realizados com a polpa e a casca da espécie, uma vez que para ambas amostras vegetais o melhor tempo de conversão do substrato ao álcool foi em 72 horas de reação. Além disso, deve-se considerar que tanto a casca quando a polpa sofreu oxidação em 36 e 84h, voltando a produção do 2-fenil etanol em 48 e 96h. Assim, ao determinar o melhor tempo reacional, foram feitos experimentos para determinar a melhor quantidade do biocatalisador, visando obter as melhores condições de reação para a redução enzimática na biocatálise. Os resultados para a conversão do substrato a partir ação enzimática da polpa e da casca da espécie estudada variando a quantidade do biocatalisador estão dispostos na tabela 02:

Tabela 02: Resultados da biorredução da acetofenona realizada em 72 horas utilizando a polpa e as cascas do fruto da espécie vegetal *Hymenea courbaril Linnaeus* (Jatobá) com variação da quantidade do biocatalisador a partir das massas 1,7g, 3,4g, 6,8g, 10,2g e 13,6g.

Massa (gramas)	Polpa do Jatobá (c%)	Casca do Jatobá (c%)
1,7 g	0,0	22,45
3,4 g	95,40	62,59
6,8 g	4,76	16,96
10,2 g	44,53	32,10
13,6 g	5,18	10,61

Fonte: Autores (2024).

Para os resultados obtidos de conversão do substrato a partir da polpa do fruto do jatobá em 72h, os valores mostraram que a quantidade inicial de 3,4g foi satisfatória, pois proporcionou 95,40% de produção para o 2-fenil etanol. Quando essa quantidade foi reduzida para metade observou-se que a massa de 1,7g não foi adequada, visto que não houve redução enzimática nessas condições. Já em relação ao dobro (6,8g) da quantidade do biocatalisador inicial, o resultado obtido para a redução da acetofenona foi pouco satisfatório, apresentando um grau de conversão de 4,76 %. Com relação ao triplo (10,2g) da massa inicial, foi obtido um valor expressivo de conversão igual a 44,53%, todavia, uma quantidade maior de biocatalisador ao analisar o quádruplo (13,6) da massa inicial não apresentou resultados favoráveis, visto que a conversão foi de 5,18%.

Os resultados obtidos quando a casca do fruto do jatobá foi utilizada como biocatalisador mostraram que a massa inicial (3,4g) foi satisfatória para a produção do álcool correspondente, proporcionando 62,59% de conversão. Quando essa quantidade foi reduzida pela metade (1,7g) a conversão foi de 22,45%, assim, a redução da quantidade de biocatalisador proporcionou um decréscimo na conversão. Com relação ao dobro (6,8g) da quantidade do biocatalisador inicial, o grau de conversão foi de 19,96 %, pouco satisfatório ao comparado com a primeira massa utilizada. Já para o triplo (10,2g) da massa inicial, foi obtido um valor de conversão igual a 33,10% sendo considerada o segundo melhor resultado ao se tratar da quantidade do biocatalisador, entretanto, ao analisar o quádruplo (13,6) da massa inicial os resultados foram pouco favoráveis, visto que a conversão foi de 5,18%.

Nessa perspectiva, pode-se considerar que quantidade de biocatalisador adequada para melhores condições reacionais foi de 3,4 gramas, visto que os valores de conversão do substrato foram satisfatórios tanto para casca quanto para polpa do jatobá. Além disso, foi observado uma similaridade dos dados obtidos com relação a segunda melhor massa do biocatalisador, posto que tanto a polpa quanto a casca apresentaram valores significativos em 10,2g.

Portanto, os dados apresentados evidenciam que as partes vegetais, casca e polpa, provenientes do fruto do jatobá possui um relevante potencial biocatalítico na redução enzimática cetonas, o que fundamentam a importância do presente trabalho, visto que na literatura ainda não são encontrados dados que apontam a capacidade biocatalítica das partes vegetais da espécie *Hymenea courbaril Linnaeus* (jatobá) como fontes enzimáticas redutoras.

Os cromatogramas obtidos das análises realizadas por meio da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS) para o melhor tempo e quantidade do biocatalisador estão dispostos nas figuras 02 e 03:

Figura 02: Cromatograma obtido para a redução da acetofenona com 3,4g do biocatalisador (polpa do fruto do jatobá) em 72 horas de reação.

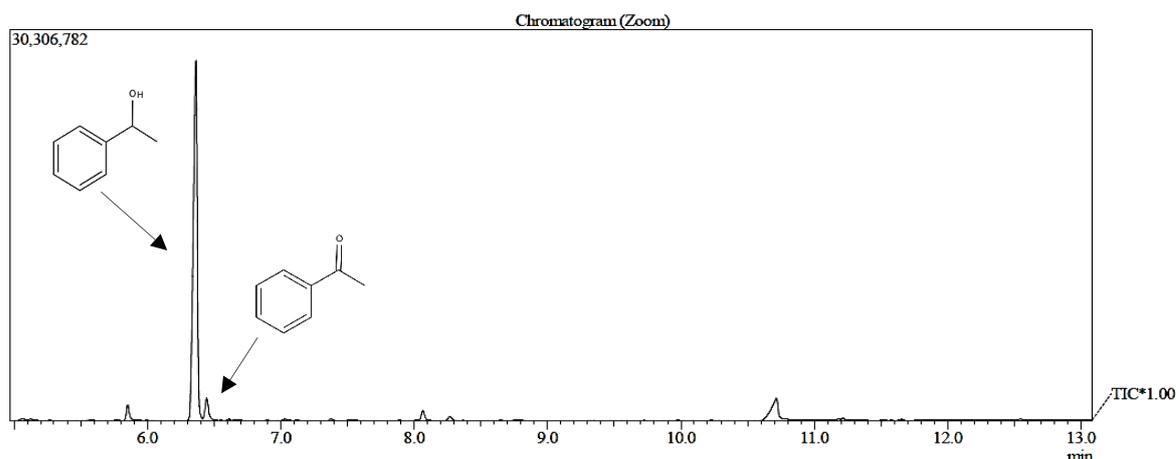
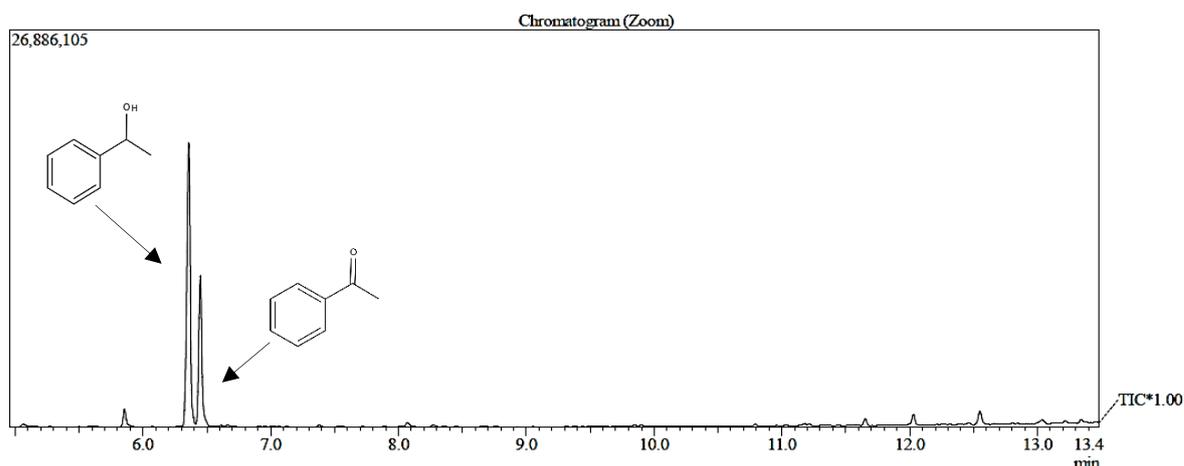
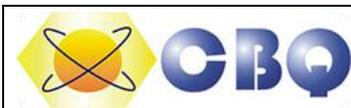


Figura 03: Cromatograma obtido para a redução da acetofenona com 3,4g do biocatalisador (casca do fruto do jatobá) em 72 horas de reação.



Conclusões

A utilização de biocatalisadores provenientes de vegetais na redução de cetonas aromáticas a álcoois quirais é um método eficaz da biocatálise, visto que é possível a produção de compostos enantiomericamente puro de baixos custos e que obedecem aos princípios da química verde. Deste modo, esta pesquisa evidenciou que as partes vegetais, casca e polpa, provenientes do fruto do jatobá apresentam um excelente potencial biocatalítico na redução enzimática da acetofenona para produção de álcoois. A determinação das condições ideais de reação é um método importante na obtenção de novos biocatalisadores, para o presente estudo, foi certificado que as condições ideais de reação tanto para a polpa quanto para a casca do jatobá é o tempo de 72 horas e quantidade do biocatalisador igual a 3,4g. Assim, além desses parâmetros já analisados, futuramente do estudo cinético será ampliado para testes a partir da



variação do pH, concentração do tampão, temperatura reacional e a determinação do excesso enantiomérico e outras cetonas pró-quirais.

Agradecimentos

À CAPES e ao CNPQ.

Referências

CASTRO, Heizir F. de et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v. 27, p. 146-156, 2004.

FONSECA, Aluísio Marques da. Contribuição ao Conhecimento Fitoquímico e Biotecnológico da água-de-coco (*Cocos nucifera* L.). 2009.

GONÇALVES, Caroline da; MARSAIOLI, Anita J. Fatos e tendências da biocatálise. *Química Nova*, v. 36, p. 1587-1590, 2013.

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. *Pytochemistry*, v. 67, p. 1637-1643, 2006.

MACHADO, L. L.; MONTE, F. J.Q.; OLIVEIRA, M. C. F.; MATTOS, M. C.; LEMOS, T. L. G. Bioreduction of aromatic aldehydes and ketones by fruits' barks of *Passiflora edulis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v. 54, p. 130- 133, 2008.

MILAGRE, Cíntia Duarte de Freitas. Biocatálise: a escolha por uma estratégia mais sustentável. 2023.

ROSÁRIO, Marinalda et al. ADUBAÇÃO FOSFATADA PROPORCIONA MELHORES MUDAS DE JATOBÁ (*HYMENAEA COURBARIL* L.). *ENCICLOPEDIA BIOSFERA*, v. 19, n. 42, 2022.

SOUZA, Diana de Meneses. Biotransformações utilizando biocatalisadores de células íntegras de vegetais cultivados no cerrado em reações de redução de cetonas aromáticas. 2013.

SOUZA, Juliana Maria Oliveira de. Biorredução de cetonas aromáticas utilizando células íntegras de *Helianthus annuus* L.(Girassol). 2012.