



Biorredução de cetonas pró-quirais utilizando *Daucus carota*: uma alternativa sustentável na obtenção de álcoois quirais

Felipe de Oliveira Souza¹, Rogério Aparecido Minini dos Santos^{1,2}, Paulo Sérgio da Silva³, José Eduardo Gonçalves^{3,*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá – UEM

²Departamento de Farmácia, Centro Universitário de Maringá - UniCesumar

³Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Limpas, Centro Universitário de Maringá - UniCesumar, (jose.goncalves@unicesumar.edu.br)

Resumo

Síntese sustentável de álcoois quirais através da reação de biorredução de cetonas pró-quirais mediada pelo vegetal *Daucus carota* foram realizadas neste trabalho por biocatálise. Na reação de biorredução um substrato sintético (acetofenona) e outro natural (óleo essencial de *Mentha piperita* L.) foram usados como fonte de monoterpenos cetônicos. A biocatálise realizada com *D.carota* após a otimização da influência da variação de concentração do substrato, bem como a quantidade de biomassa do vegetal, promoveu a redução da acetofenona à 1-feniletanol com rendimento de até 97% e elevou o teor de mentol contido no óleo essencial de *Mentha piperita* L. de 49 à 87 % por meio da biorredução do monoterpeno mentona presente naturalmente no óleo essencial de *Mentha piperita* L.

Palavras-chave: Biocatálise, *Daucus carota*, Mentol.

Área Temática: Tecnologias Limpas

Bioreduction of prochiral ketones using *Daucus carota*: a sustainable alternative to obtain chiral alcohols

Abstract

Sustainable synthesis of chiral alcohols by biocatalysis, by bioreduction reaction of prochiral ketones mediated by *Daucus carota* vegetable. It was used in bioreduction reaction a synthetic substrate (acetophenone) and other natural (essential oil of *Mentha piperita* L.) as a source of monoterpenes ketone, were also the influence of substrate concentration variation and the amount of biomass in the reaction yield. Biocatalysis with *D. carota* promoted the reduction of acetophenone to 1-phenyl ethanol yield up to 97% and raised menthol content contained in the essential oil of *Mentha piperita* L. of 49 to 87% by bioreduction of menthone monoterpenes also naturally present in the essential oil of *Mentha piperita* L.

Keywords: Biocatalysis, *Daucus carota*, Menthol.

Theme Area: Clean Technologies



1 Introdução

A Química Verde é definida como o desenvolvimento de produtos e processos químicos que reduzem ou eliminam o uso e a geração de substâncias perigosas ao meio ambiente e as pessoas. Dentre as metodologias de Química Verde podemos destacar a biocatálise, tendo por definição o uso de enzimas como biocatalisadores em síntese química, sendo utilizadas de forma isolada ou presentes em células íntegras, como micro-organismos ou vegetais (ANASTAS, EGHBALI, 2010) (VANDENBERGHE, et., al. 2013).

Ao longo dos anos a biocatálise tornou-se uma ferramenta útil e atrativa para os químicos orgânicos sintéticos devido a suas características como alta seletividade (régio, químico e estereoseletividade) e sustentabilidade. As reações biocatalisadas atendem aos princípios da Química Verde, pois minimizam a geração de resíduos e uso de substâncias tóxicas, reduzindo ou eliminando grupos protetores, reações laterais e simplificando processos de separação (CELIK, AKTAS, 2013). Possibilitam a eliminação de solventes orgânicos e metais pesados, podendo ser utilizada em meio aquoso e em condições brandas de temperatura, pressão, com consequente aumento da eficiência reacional, aumento do rendimento, com redução de custos e resíduos (CARVALHO, 2011).

A eficiência e sustentabilidade das reações biocatalíticas levaram sua aplicação até o setor industrial, fundamentalmente na obtenção de blocos de construção quirais, como álcoois quirais moléculas amplamente utilizadas como intermediários na síntese de fármacos, flavorizantes, essências e produtos agrícolas (Ni, Xu, 2012).

Álcoois quirais podem ser obtidos em reações de biorredução de cetonas pró-quirais, essas reações são mediadas por enzimas Álcool Desidrogenases (ADHs) as quais utilizam co-fatores Nicotinamida (NADH, NADPH) como fontes de hidreto na biorredução de grupos cetônicos. Devido a dependência das ADHs por co-fatores, nas reações em que se utilizam enzimas isoladas é necessário a adição estequiométrica dos co-fatores NADH ou NADPH, inviabilizando o processo devido ao elevado custo destes. Biorreduções promovidas por células inteiras mostram-se economicamente viáveis pelo fato das células íntegras possuirem os co-fatores e sistemas de reciclagem destes como parte natural de seu metabolismo (HUDLICKY, REED, 2009).

No presente trabalho é proposto uma alternativa sustentável para a síntese de álcoois quirais utilizando a *Daucus carota* (Cenoura) na biorredução da acetofenona e do Óleo Essencial de *Mentha piperita* L. (OEMP) como fonte de cetonas, com variações nas concentrações dos substratos e quantidade de biomassa dos vegetais a fim de avaliar variações no rendimento dos produtos reacionais.

2 Materiais e Métodos

2.1 Procedimento para a biocatálise

As cenouras frescas (*Daucus carota*) foram lavadas em água corrente, cortadas em fatias de cerca de 0,5 cm e imersas em solução de hipoclorito de sódio a 1% para evitar possíveis reações laterais de micro-organismos presentes no vegetal. Toda a manipulação foi feita de forma asséptica.

A Tabela 1 descreve as quantidades necessárias de biomassa do vegetal, volume do meio reacional e quantidade de substratos utilizados em cada experimento. Os ensaios de biocatálise foram divididos como A, B e C (Tabela 1) para cada substrato (acetofenona e OEMP), objetivando estabelecer as condições reacionais ideais, baseado nas diferentes concentrações



5º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 5 a 7 de Abril de 2016

de substratos e biomassa de vegetal que constam nas metodologias reportadas na literatura (Xu et al., 2010 Yadav et al., 2008 Liu et. al, 2012 Omori, Portas, Oliveira 2012, Freira te al., 2011).

Tabela 1. Determinação das condições reacionais ideais

Quantidade de vegetal	Concentração de substrato	Quantidade de água
	Acetofenona	Óleo de Hortelã
10 g (A)	20 µL (A)	20 µL (A)
10 g (B)	30 µL (B)	30 µL (B)
15 g (C)	20 µL (C)	20 µL (C)

Após o preparo de cada experimento, os erlenmeyers foram incubados em agitador rotatório a 35 C°, 150 rpm, onde permaneceram por 72 horas. A cada 24 horas de incubação, foram retiradas alíquotas de 2 mL para o acompanhamento da biocatálise, as alíquotas foram transferidas para tubos de ensaio e extraídas com 1 mL de acetato de etila (AcOEt). A fração orgânica foi analisada por cromatografia em camada delgada (CCD).

Ao término da reação, a fase líquida foi transferida para um funil de separação de 125mL e extraída com AcOEt (2 x 10 mL). À fase orgânica foi adicionado sulfato de sódio (Na₂SO₄) anidro, filtrada e o solvente evaporado sob vácuo em evaporador rotativo.

2.2 Determinação da conversão dos substratos

Os produtos obtidos nas reações de biocatálise foram analisados por CCD (Cromatografia em Camada Delgada) e CG/EM (Cromatografia em fase Gasosa, acoplada a Espectrômetro de Massas).

A identificação dos produtos, as concentrações das cetonas e seus respectivos álcoois foram obtidas por um cromatógrafo à gas (Agilent 7890B) acoplada á espectrômetro de massas (Agilent 5977A MSD), a fase estacionária foi uma coluna HP-5MS UI Agilent (30 m x 0,250 mm x 0,25 µm) e 2µL de cada amostra foi injetada no modo de injeção split na razão 1:20 com um fluxo constante 1,0 mL min⁻¹ de Hélio utilizado como gás de arraste. A temperatura do forno foi programada em 60 °C e em seguida aumentada 3°C/min até 90°C depois de 90 °C a 285 °C com aumento de 50 °C/min. A temperatura do injetor e a linha de transferência foram 220 e 240 °C, respectivamente. No detector de massas a temperatura da câmara de ionização foi de 230 °C a temperatura do quadrupolo foi de 150 °C, os espectros de massas registrados por impacto de elétrons com uma energia de ionização de 70 eV.

A caracterização dos compostos foi realizada através da utilização da biblioteca NIST Mass Spectral Database - NIST 11 e também através da comparação do tempo de retenção e dos espectros de massas a partir dos padrões. As concentrações foram obtidas por análise de área relativa (Jesus, Nogueira, Fonseca, 2013; Gören et al, 2002; Prado 2007).

3 Resultados

3.1 Determinação das condições reacionais ideais

No ensaio B (30 µL de substrato e 10g de biomassa) houve diminuição do rendimento reacional em relação ao ensaio A (20 µL de substrato e 10g de biomassa), já o ensaio C (20 µL de substrato e 15g de biomassa) apresentou rendimento ainda menor que o ensaio B, desta forma a condição ideal para a reação de biocatálise é a que ocorre no ensaio A sendo o de maior rendimento reacional (Tabela 2 e 3).

Tabela 2. Biorredução da acetofenona por *Daucus carota*

Identificação	Substrato	Produto	Rendimento %	Final do Produto	
			A	B	C
Acetofenona			97,97%	96,37%	92,88%

Método de análise: CG/EM

Tabela 3. Biorredução da mentona por *Daucus carota*

Identificação	Substrato	Produto	Rendimento %	Final do Produto	
			A	B	C
Mentona			87,45%	86,60%	80,97%

Percentual inicial de mentol no óleo de *Mentha piperita* L.: 49,47%

Método de análise: CG/EM

3.2 Biorredução da acetofenona

A Tabela 2 apresenta a relação dos percentuais de acetofenona e o produto de sua redução o 1-feniletanol. Os resultados das conversões foram confirmados através do cálculo da área relativa dos respectivos picos cromatográficos. Os resultados obtidos mostraram grande efetividade na biocatálise promovida por *Daucus carota*, com percentuais de conversão da acetofenona de 92% a mais de 97% (Tabela 2), resultados de 5% à 17% maiores que os obtidos anteriormente por outros pesquisadores (Xu et al, 2010; Yadav et al, 2002; Liu et al 2012).

3.3 Biorredução em óleo essencial

A *Daucus carota* promoveu a biorredução da (-)-mentona em seu respectivo álcool que seria o mentol, como descrito na Tabela 3. Através da análise pôde-se observar uma excelente taxa de conversão em que houve aumento do produto (mentol ou neomentol) de 49% para 87% no óleo essencial de *Mentha piperita* L.

Na composição do OEMP havia outros monoterpenos cetônicos os quais não foram reduzidas aos seus respectivos alcoóis, como a isomentona e as cetonas α , β -insaturadas piperitona e pulegona, demonstrando quimiosseletividade e diasterosseletividade.

4 Conclusão

O presente trabalho demonstrou a capacidade da *Daucus carota* em reduzir cetonas pró-quirais de origem sintética como a acetofenona gerando o 1-feniletanol. Também foi evidenciada a capacidade da *Daucus carota* de promover biorredução da (-)-mentona diretamente no óleo essencial de *Mentha piperita* L., dando origem ao seu respectivo álcool quiral o (-)-mentol ou (+)-neomentol. Não foram reduzidas as cetonas α,β -insaturadas



5º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 5 a 7 de Abril de 2016

(pulegona e piperitona) e a isomentona também contidas no óleo essencial demonstrando quimiosseletividade e diasterosseletividade da enzima presente na *Daucus carota* pela (-)-mentona em relação as cetonas α,β -insaturadas e ao seu isômero isomentona. Podemos então concluir que esta metodologia é uma alternativa econômica, ecologicamente viável de obtenção de 1-feniletanol e mentol natural enantiomericamente enriquecidos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao UNICESUMAR por ter disponibilizado tanto os materiais quanto a infra-estrutura para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

ANASTAS, P., EGHBALI, N.; Green Chemistry: Principles and Practice. Chemical Society Reviews, v. 39, p. 301–312, 2010.

CARVALHO CCR. Enzymatic and whole cell catalysis: finding new strategies for old processes. Biotechnol Adv.2011; 29:80-38

CELIK A, AKTAS F. A new NADH-dependent, zinc containing alcohol dehydrogenase from *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis involved in oxidations of short to medium chain primary alcohols. J. Mol. Catal. B: Enzym. 2013; 89:114-6

FREIRE MM, JHAM GN, DHINGRA OD, JARDIM CM, BARCELOS RC, VALENTE VMM. Composition, antifungal activity and main fungitoxic components of the essential oil of *Mentha piperita L.* J. Food Safety 2011; 32: 34-21

HUDLICKY T, REED JW, Applications of biotransformations and biocatalysis to complexity generation in organic synthesis. Chem. Soc. Rev 2009; 38: 3118-99,21

LIU X, WANG Y, GAO HY, HE. Asymmetric reduction of α -hydroxy aromatic ketones to chiral aryl vicinal diols using carrot enzymes system. Chin. Chem. Lett.2012;23:637

NI Y, XU J. Biocatalytic ketone reduction: A green and efficient access to enantipure alcohols. Biotechnol Adv. 2012; 30:1279-1

OMORI ÁT, PORTAS VB, OLIVEIRA CS. Redução enzimática do 4-(dimetilamino)benzaldeído com pedaços de cenoura (*Daucus carota*): um experimento simples na compreensão da biocatálise. Quim. Nova 2012; 35(2):436-12

PRADO GP. Caracterização química e bioatividade do óleo essencial de *Cunila angustifolia* Benth (lamiaceae) Sobre *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (coleóptero: tenebrionidae) Universidade Comunitária Regional de Chapecó; Brasil 2007; 36

VANDENBERGHE A, MARKÓ IE, LUCACCIONI F, LUTTS S. Enantioselective hydrolysis of racemic 1-phenylethyl acetate by an enzymatic system from fresh vegetables. Ind Crop Prod. 2013; 42:381-1



5º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 5 a 7 de Abril de 2016

XU C, ZHONGHUA Y, RONG Z, GAI Y, JIABAO Y. Production of chiral aromatic alcohol by asymmetric reduction with vegetable catalyst. *Chin. J. Chem. Eng.* 2010; 18(6):1029-32, 1030-28

YADAV JS, REDDY GS, SABITHA G, KRISHNA AD, PRASAD AR, RAHAMAN HUR, RAO KV, RAO AB. *Daucus carota* and baker's yeast mediated bio-reduction of prochiral ketones. *Tetrahedron: Asymmetry* 2007; 18:720

YADAV JS, REDDY BVS, SREELAKSHMI C, KUMAR GGKSN, RAO AB. Enantioselective reduction of 2-substituted tetrahydropyran-4-ones using *Daucus carota* plant cells. *Tetrahedron Lett* 2008; 49:2768-23

YADAV JS, REDDY PT, NANDA S, RAO B. Stereoselective synthesis of (R)-(-)-denopamine, (R)-(-)-tembamide and (R)-(-)-aegeline via asymmetric reduction of azidoketones by *Daucus carota* in aqueous medium. *Tetrahedron: Asymmetry* 2002; 12:3382-13