



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA.**

**OBTENÇÃO DE DERIVADOS QUÍMICOS  
DE PRODUTOS NATURAIS EMPREGANDO CATÁLISE  
CONVENCIONAL E ENZIMÁTICA.**

**MARIA DE LOURDES E SILVA**

**VIRTUTE SPIRITUS**

**SALVADOR**

**2012**

**MARIA DE LOURDES E SILVA**

**OBTENÇÃO DE DERIVADOS QUÍMICOS  
DE PRODUTOS NATURAIS EMPREGANDO CATÁLISE  
CONVENCIONAL E ENZIMÁTICA.**

TESE apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Química.

Orientador: Prof . Dr. Jorge Mauricio David

**SALVADOR  
2012**

Sistema de Bibliotecas – IQ/UFBA

Silva, Maria de Lourdes e .

Obtenção de derivados químicos de produtos naturais empregando catálise convencional e enzimática / Maria de Lourdes e Silva. - 2012.

202 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Maurício David.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2012.

1. Produtos naturais. 2. Lamiaceae. 3. Triterpenos. 4. Antioxidantes. 5. Plantas - Compostos bioativos. I. David, Jorge Maurício. II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química. IV. Título.

CDD – 583.32

CDU – 547.9

TERMO DE APROVAÇÃO

MARIA DE LOURDES E SILVA

Obtenção de derivados químicos de produtos naturais empregando catálise convencional e enzimática

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Hugo Neves Brandão Hugo Neves Brandão  
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)  
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Jorge Mauricio David - Orientador Jorge Mauricio David  
Doutorado em Química Orgânica, Universidade de São Paulo (USP)  
Universidade Federal da Bahia

Profa. Dra. Juceni Pereira de Lima David Juceni Pereira de Lima David  
Doutorado em Química Orgânica, Universidade de São Paulo (USP)  
Universidade Federal da Bahia

Profa. Dra. Lidércia Cavalcanti Ribeiro Cerqueira e Silva Lidércia Cavalcanti Ribeiro Cerqueira e Silva  
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)  
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Marcus Vinicius Bahia Marcus Vinicius Bahia  
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)  
Instituto Federal da Bahia

Salvador, 17 de maio de 2012.

*“Quem sonha, não realiza  
Quem não pensa, não conhece  
seus limites”.*

*(Arquimedes)*

### **Dedicatória**

*Aos meus pais: "In Memória" Quitéria e Manuel Eduardo,  
por terem me concedido a vida, por cada palavra dita,  
cada ensinamento, cada carinho retribuído, por me  
possibilitarem a realização deste sonho,  
pelo privilégio de ser sua filha.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus, por ter estado sempre ao meu lado, dando-me força e consentido que eu chegasse com êxito ao fim desta caminhada.

Ao Prof.<sup>o</sup>. Dr. Jorge Mauricio David, meu orientador obrigada pela oportunidade de desenvolver este projeto, pela confiança e incentivo. Agradeço pela ótima orientação, amizade, paciência, dedicação e acima de tudo por estar ao meu lado sempre que precisei do seu apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia, por tornar possível a realização deste trabalho.

À Banca Examinadora pelas valiosas contribuições que serão dadas a este trabalho.

A Prof.<sup>a</sup> Dra. Juceni Pereira David pelo apoio, sempre disposta a ajudar a superar qualquer obstáculo que surgisse.

A Prof.<sup>a</sup> Dra. Lidércia Cavalcanti R. Cerqueira e Silva, pelo seu apoio, paciência, incentivo e colaboração durante esta caminhada.

A Neilson Queiroz da Silva pelo apoio e colaboração durante todas as etapas do doutorado.

A Eliezer Pereira da Silva pelo apoio incondicional durante toda fase experimental

A Rauldemis A. F. Santos pelo apoio na realização da parte experimental

A Hector Hugo Silva Machado, pelo apoio e realização dos registros dos cromatogramas de CG.

A Albertino Freitas Santana Neto, pelo apoio na digitação.

Ao Laboratório Santa Helena, Camaçari pela utilização do CG.

A equipe do Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais do Instituto de Química da UFBA, e a todos os colegas de pós-Graduação.

A todos que contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado, meus sinceros agradecimentos.

.A CENAUREM (UFC) pelo registro de espectros de RMN.

## RESUMO

Os triterpenos são extensamente distribuídos na natureza, principalmente no reino vegetal, pois se acredita que uma de suas funções fisiológicas nos vegetais seja de defesa química contra patógenos e herbívora. Podem ser encontrados na forma livre, como glicosídeos ou ainda derivados esterificados. Os ácidos oleanólico, betulínico e ursólico são os triterpenos ácidos mais comuns de ocorrência em vegetais e, possuem atividades antitumorais conhecidas. Este trabalho descreve um levantamento da ocorrência dessas substâncias e obtenção de derivados a partir deles e de ácidos graxos comuns. Os ácidos betulínico, ursólico e oleanólico, isolados das partes aéreas de *Eriope blanchetii* (Lamiaceae), foram submetidos a diferentes reações de esterificação obtendo-se assim 12 derivados esterificados na posição C-3. Tanto as substâncias isoladas quanto os derivados triterpênicos foram caracterizados por técnicas espectroscópicas no IV, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Os derivados foram submetidos a testes de atividade antioxidante, letalidade frente *Artemia salina* e atividade antimicrobiana. Além disso, o ácido o-metoxicinâmico e ácido oleico foram submetidos a esterificação com etanol e metanol empregando-se Novoenzyme, comparando-se o rendimento do produto da reação a temperatura ambiente e sob irradiação de microondas.

Palavras chave: *Eriope blanchetii*, Lamiaceae, derivados triterpenos, letalidade *Artemia salina*, atividades antimicrobiana.



## ABSTRACT

Triterpenes are compounds widely distributed in plants and other organisms. They play an ecological role of protection against pathogens and herbivores. They can be found as glycosides, free or as esterified derivatives. Betulinic, oleanolic and ursolic acids are the most common triterpene acids and they are known by important biological activities, as anticancer for instance. This work describes the occurrence and biological activities of these compounds as well as the preparation of chemical derivatives. The betulinic, ursolic and oleanolic acids isolated from the aerial parts of *Eriope blanchetii* (Lamiaceae) were submitted to different esterification reactions obtained 12 ester derivatives at C-3 positions. All compounds were identified by spectroscopic techniques such as IR and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR and MS. The derivatives were submitted to antioxidant tests, lethality of *Artemia salina* and determination of antimicrobial activities. Besides, o-Methoxycinnamic acid and oleic acid were submitted to esterification reaction employing ethanol and methanol and immobilized lipase. The yields of the room temperature microwave reactions were compared.

**Keywords:** *Eriope blanchetii*, Lamiaceae, triterpenes derivatives, *Artemia salina* lethality, antimicrobial activities.

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etila
BuOH	Butanol
CC	Cromatografia em Coluna (pressão atmosférica)
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CG	Cromatografia Gasosa
$\epsilon'$	Constante dielétrica
CMC	Concentração Micelar Crítica
DMAP	2,4-dimetil amino piridina
DMAPP	Dimentil-alil-difosfato
DPPH	1,1 difenil-2-picril-hidrazil
EM	Espectrometria de massa
EtOH	Etanol
$\epsilon''$	Fator de perda dielétrica
GPP	Geranil-pirosfosfato
Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	Concentração suficiente para obter 50% da capacidade máxima de seqüestrar os radicais DPPH
IPP	Isopentenil-difosfato
<i>J</i>	Constante de acoplamento
MeOH	Metanol
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13o
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RSD %	Desvio padrão relativo
$\delta$	Deslocamento químico (ppm)
$\mu$ g	Micrograma

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estrutura dos ácidos oleanólico (1), betulínico (2) e ursólico (3).	07
<b>Figura 2</b>	Estrutura do isopreno (A) e geranyl pirofosfato (B)	08
<b>Figura 3</b>	Esquema geral da biossíntese dos terpenos.	09
<b>Figura 4</b>	Ciclização do esqualeno.	10
<b>Figura 5</b>	Obtenção do ácido betulínico a partir da betulina	14
<b>Figura 6</b>	Reações de hidrólise e síntese de ésteres e transesterificação	18
<b>Figura 7</b>	Ondas eletromagnéticas	30
<b>Figura 8</b>	Localização da região de microondas no espectro eletromagnético	31
<b>Figura 9</b>	Aquecimento da amostra por condução e aquecimento por microondas	33
<b>Figura 10</b>	O magnetron	34
<b>Figura 11</b>	Comportamento dos diferentes tipos de materiais diante das microondas	34
<b>Figura 12</b>	Propagação de uma onda plana em um meio com perdas	35
<b>Figura 13</b>	Reator de Microondas Discover	39
<b>Figura 14</b>	Quadro de figuras da palmeira e do coco de babaçu	42
<b>Figura 15</b>	Ácido oléico	43
<b>Figura 16</b>	Transesterificação de triacilgliceróis (triglicerídeos)	44
<b>Figura 17</b>	Mecanismo das três etapas da Reação de Transesterificação	45
<b>Figura 18</b>	Fluxograma de obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos presentes no óleo de babaçu.	46
<b>Figura 19</b>	Cromatograma do óleo de babaçu	48
<b>Figura 20</b>	Cromatograma do azeite de oliva	50
<b>Figura 21</b>	Cromatograma do ácido oleico esterificado sob catálise enzimática	59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Classes de triterpenos	<b>11</b>
<b>Tabela 2</b>	Classificação das enzimas	<b>20</b>
<b>Tabela 3</b>	Aplicação industrial da lipase	<b>27</b>
<b>Tabela 4</b>	Constantes, fatores de perda dielétricas	<b>31</b>
<b>Tabela 5</b>	Reações enzimáticas assistidas por microondas	<b>37</b>
<b>Tabela 6</b>	Forma resumida de dados descritos na literatura referente à condução de reações enzimáticas usando reatores de microondas	<b>39</b>
<b>Tabela 7</b>	Composição química do óleo de babaçu	<b>47</b>
<b>Tabela 8</b>	Composição química do azeite de oliva	<b>50</b>
<b>Tabela 9</b>	Tipos de análises e equipamentos utilizados	<b>52</b>

## LISTAS DE QUADROS

Quadro 1	Ocorrência do ácido oleanólico	12
Quadro 2	Ocorrência do ácido betulínico	13
Quadro 3	Ocorrência do ácido ursólico	15

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	01
<b>2 OBJETIVOS</b>	07
2.1 Objetivo geral	07
2.2 Objetivos específicos	08
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	08
3.1 TRITERPENOS	08
3.1.1 TERPENOS E SUA FORMAÇÃO	08
3.1.2 Formação de triterpenos.	10
3.1.3 Classes de Triterpenóides.	11
3.1.4 TRITERPENOS ÁCIDOS MAIS COMUNS	11
3.1.5 Ácido Oleanólico (1)	12
3.1.6 Ácido Betulínico (2)	13
3.1.7 O ácido ursólico (3)	15
3.2 ENZIMAS NA PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE PRODUTOS NATURAIS	17
3.2.1 Reações de transformação de ácido graxos em ésteres empregando enzimas	18
3.2.2 Classificação e Nomenclatura das enzimas	21
3.2.3 Comparação do uso de catalisadores químicos com os enzimáticos	22
3.2.4 Uso de enzimas como biocatalizadores	22
3.2.5 Imobilização de enzimas	23
3.3 LIPASES	24
3.3.1 Propriedades físico-químicas	26
3.3.2 Especificidade	26
3.3.3 Atuação na interface	27
3.3.4 Aplicações	28
3.3.5 Imobilização de enzimas	28
3.3.6 Efeito dos solventes orgânicos	30
4 NOVOS MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE DERIVADOS DE PRODUTOS NATURAIS	30
4.1 Utilização de irradiação de microondas em reações enzimáticas	31
4.1.1 Histórico de microondas	31
4.1.2 Fundamentos dos microondas	32

4.1.3 Reflexão e penetração das microondas	35
4.1.4 Comparação do aquecimento de microondas com o aquecimento convencional	36
4.1.5 Reações enzimáticas assistidas por microondas	37
4.1.6 Reatores de microondas	39
<b>5 EMPREGO DE LIPASE NA OBTENÇÃO DE DERIVADOS DE ÁCIDO GRAXO E METOXCINÂMICO</b>	42
5.1 Introdução	42
5.2 Parte experimental	45
5.3 Obtenção do biodiesel do Babaçu	46
5.3.2 Determinação da composição em ácido graxos de óleo de coco Babaçu	48
5.3.3 Análise cromatográfica	48
5.4 Obtenção do biodiesel do azeite de oliva (Rota etílica)	50
5.4.1 Reação de transesterificação	50
5.4.2 Determinação da composição do ácido graxo do azeite de oliva	50
5.4.3 Análise cromatográfica	51
5.5 Conclusões	52
<b>6 Reações enzimáticas</b>	52
6.1 Obtenção dos derivados de ácido 2-metoxicinâmico e oleico utilizando lipases	52
6.1.1 Fonte de lipases	52
6.2 Substratos e reagentes	53
6.3 Equipamentos	53
6.4 Reação de esterificação enzimática do ácido 2-metoxicinâmico e etanol sob aquecimento	54
6.5 Reações com o padrão de ácido oleico	56
6.6 Reação de esterificação enzimática do ácido oleico e etanol sob irradiação de microondas (Reator Discover)	58
<b>6.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	59
<b>7 REFERÊNCIAS</b>	61
<b>8 ARTIGO</b>	78
<b>9 ANEXOS</b>	95

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto à civilização humana e, por um longo tempo, produtos minerais, plantas e animais foram as principais fontes de medicamentos. A Revolução Industrial e o desenvolvimento da química orgânica propiciaram o uso intenso de produtos sintéticos para fins terapêutico, devido estes serem obtidos por síntese orgânica e modificações estruturais em moléculas conhecidas, aumentando assim a potência e a eficácia dessas moléculas (RATES, 2000).

Observa-se um interesse crescente em terapias alternativas e utilização de produtos naturais, especialmente vegetais com finalidade terapêutica. Este interesse é devido: a ineficiência de fármacos sintéticos para várias patologias, efeitos colaterais, elevado custo do tratamento farmacológico, dificuldade da indústria em obter novos agentes terapêuticos, alto custo de pesquisa e produção de novas moléculas biologicamente ativas, entre outros motivos (CAPASSO, 2000; RATES, 2000; NIERO, 2003).

As plantas medicinais têm demonstrado desde o início do século passado que são importantes fontes de novos medicamentos, o que vem sendo confirmado através de pesquisas científicas, especialmente nas áreas de química e farmacologia. Sabe-se que aproximadamente 25% dos fármacos empregados na terapêutica são obtidos de forma direta ou indireta de produtos naturais, especialmente plantas superiores (YUNES, 2001)

A partir das plantas medicinais podem ser obtidos medicamentos fitoterápicos (complexidade de composto) e fitofármacos (composto isolado), os quais são formulados a partir de pesquisas científicas para serem introduzidos no mercado. No entanto, o sucesso de um trabalho científico depende inicialmente da seleção adequada de uma planta, que pode ser feita pela observação do uso popular, do conteúdo químico, toxicidade, seleção ao acaso ou a combinação de muitos critérios (RATES, 2000; YUNES, 2001).

O reino vegetal tem sido então uma das mais ricas fontes de substâncias orgânicas, contribuindo de forma significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, dos quais muitos têm sido utilizados como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PINTO, 2002; NIERO, 2003).

Sob este aspecto, o Brasil é o país com maior potencial para pesquisa com espécies vegetais, pois detém a maior e mais rica biodiversidade do planeta, distribuída em seis biomas distintos, sendo a mata atlântica, uma das mais ricas em biodiversidade, porém a mais



devastada do país. Nesta predomina o clima quente e tropical, com mais de dez mil espécies (VIEIRA, 1999).

A evolução do homem, entre outras coisas tem sido acompanhada por um valioso conhecimento de plantas. Nos primórdios, as civilizações transmitiam aos seus descendentes um discernimento empírico que ia desde as plantas que podiam ser comestíveis até aquelas que apresentavam toxicidade ou mesmo um potencial curativo. Tal informação no início foi passada oralmente para as gerações posteriores e, depois com o surgimento da escrita, foi armazenada em papiros ou escrituras. (CUNHA, 2007).

As evidências da utilização de plantas medicinais, tanto no Ocidente como no Oriente, remontam a cerca de 60.000 anos. Um dos primeiros escritos que se tem informação, refere-se à farmacopéia do imperador chinês Shen Nung. Escrita por volta dos anos 2730 – 3000 a. C., que descreve o uso medicinal de várias espécies tais como a efedra (*Ephedra sinica*. Stapf, ou Ma Huang), pela medicina chinesa, que tem como substância ativa o alcaloide efedrina e é conhecida por promover perda de peso, aumentar a energia, tratar problemas respiratórios e como antitussígeno (BRIAN, et al 2003).

O papiro de Ebers, decifrado em 1873 pelo egiptólogo alemão Georg Ebers, representa o primeiro tratado médico egípcio conhecido e foi escrito em 1500 a. C. Parte de seu texto se destina a tratamento de doenças e indicações sobre os medicamentos a serem empregados para tal (GOSSEL-WILLIAMS, 2006).

Uma das mais importantes contribuições para o conhecimento atual sobre medicina natural partiu de Hipócrates, que nasceu na ilha de Cós e viveu até a segunda metade do século V a. C. (RIBEIRO, 2003). Ele é considerado “o pai da medicina”, graças a sua pesquisa e a uma vasta obra composta por 53 livros que foram reunidos em Alexandria por Baccheio no século III a. C. , denominados *Corpus Hippocratrium*. Esta obra é considerada a mais clara e completa da antiguidade já que faz referencia não só a plantas medicinais, mas, também as bases das ciências médica em sua totalidade (DIAS, 2007).

Por volta de 1800, os químicos e os médicos que estudavam plantas medicinais, cujos recursos experimentais eram extremamente limitados, se dedicam especialmente, a isolar e determinar a estrutura de substâncias conhecidas e experimentadas pelo uso popular ao longo do tempo, e geralmente incorporadas nas farmacopéias da época. (YUNES & CALIXTO, 2001). Apesar disso, alguns fármacos, foram descobertos e muito deles ainda são usados na terapêutica atual. Como exemplos, pode ser mencionado a *Atropa belladonna* L., espécie conhecida desde o início do século XVI, (YUNES & CALIXTO, 2001). Um dos constituintes

ativos foi determinado como sendo o alcalóide atropina isolado pela primeira vez por Mein em 1831, e seus efeitos foram estudados no século XIX (CANAES, 2006).

*Hyoscyamus niver* L. (Solanaceae), conhecida popularmente como meimendro, tendo como substância ativa o alcaloide hioscianina, já era utilizada pelos povos antigos. A espécie era empregada contra dores do trato gastrointestinal na antiga Babilônia e figura no papiro de Ebers. Foi utilizada na Inglaterra, na idade média e depois de um período de esquecimento, no século XVIII a espécie foi reintroduzida na *London Pharmacopéia*, de 1809 (SIMÕES, et al 2000).

Por fim, pode ser salientado o caso da *Salix alba* L., cujas cascas foram usadas durante milênios na Europa, Ásia e África para combater dor e febre, mas que somente em 1763 foi estudada cientificamente pelo reverendo E. Stone, da Inglaterra, que publicou seu trabalho de observação clínica, mostrando o efeito analgésico das cascas dessa planta (YUNES & CALIXTO, 2001). A substância ativa e bastante conhecida desta espécie é a salicilina isolada pela primeira vez em 1829 pelo farmacêutico francês H. Leurox. Em 1838 o químico italiano Raffaele Piria obteve o ácido salicílico semi-sintético, através da hidrólise oxidativa da salicilina e, posteriormente, Kolbe e Dresden em 1859, sintetizaram os salicilatos. Em 1897, incentivado pelo caso de seu pai que sofria de reumatismo crônico e não tolerava o efeito colateral dos salicilatos, o químico alemão Felix Hofmam concluiu a síntese do ácido acetilsalicílico (AAS), um composto de caráter menos ácido e que ainda hoje é o analgésico mais consumido e vendido no mundo (MENEGATTI, 2001).

Assim, na busca por substâncias ativas, um dos principais aspectos a serem observados consiste nas informações oriunda da medicina popular. A seleção de espécies vegetais para pesquisa, baseada na alegação de um dado efeito terapêutico em humanos, pode se constituir num valioso atalho para a descoberta de novos fármacos (ELIZABETSKY, 2000).

A OMS (Organização Mundial de Saúde) estima que as vendas totais de ervas medicinais alcançaram a cifra de US\$ 400 milhões no Brasil em 2001 (SOYAMA, 2007). Estima-se que 49% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir e modelos ou diretamente de fontes naturais, sendo as plantas responsáveis por 25% desse total (CALIXTO, 2003; SOYAMA, 2007). Somente no período entre 1983 e 1994, dos 520 novos fármacos aprovados pela agencia americana de controle de medicamentos e alimentos (FDA), 220 (39%) foram desenvolvidos a partir de produtos naturais (CRAGG, 1997; SHU, 1998). E ainda quando se fala de câncer ou doenças infecciosas, entre 60% e 75% dos medicamentos disponíveis, são de origem natural (NEWMAN, 2003).

No Brasil, as pesquisas com plantas ainda estão muito inseridas no contexto de Universidades e Institutos de pesquisa. Mesmo assim, já existem vários grupos nacionais envolvidos com busca de princípios bioativos de plantas. (MONTANARI & BOLJANI, 2001).

A pesquisa por novas entidades químicas bioativas pelos laboratórios de pesquisa industriais tem adotado novas técnicas, como o uso da química combinatória para se obter maior número de substâncias com atividades farmacológicas em um menor tempo. Essa técnica teve o seu tempo áureo na indústria farmacêutica na década de 90 (MULLIN, 2007), quando foram sintetizados e avaliados farmacologicamente milhares de compostos.

Uma estratégia para busca de novos fármacos chamada “Diversity-oriented synthesis” - DOS - foi desenvolvida para tentar resolver o problema da biocompatibilidade. É uma técnica para criar um banco de dados de compostos de estruturas semelhante a produtos naturais compartilhados entre diversos centros de pesquisa. Uma vez identificado o protótipo, este será “melhorado” e posteriormente submetido a ensaios clínicos (BORMAN, 2006).

A introdução de novas tecnologias tornou a química medicinal mais ampla em sua concepção, ampliando seu caráter interdisciplinar (HILEMAN, 2006). Em uma visão moderna, a química medicinal dedica-se à compreensão das razões moleculares da ação dos fármacos, da relação entre a estrutura química e atividade farmacológica dos mesmos considerando fatores farmacodinâmicos e farmacocinéticos que se traduzem em propriedades farmacoterapeuticamente úteis e, portanto, represente um novo composto-protótipo, candidato efetivo a novo fármaco (VIEGAS, 2006).

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) define fitofármaco com “princípios ativos”, que corresponde a uma substância ou grupo dessas, quimicamente caracterizadas, cuja ação farmacológica conhecida e responsável, total ou parcialmente, pelos efeitos terapêuticos do produto fitoterápico.

E o medicamento fitoterápico, também segundo a ANVISA, caracteriza-se pelo emprego exclusivo de matérias-primas vegetais ativas, cuja eficácia e riscos de seu uso sejam conhecidos, assim como a reprodutibilidade e constância de sua qualidade.

O desenvolvimento de fitoterápicos inclui etapas e é um processo interdisciplinar, multidisciplinar e interinstitucional. As áreas de conhecimento envolvidas vão desde a botânica, etnobotânica, agronomia, ecologia, química, fotoquímica, farmacologia, toxicologia, biotecnologia até a tecnologia farmacêutica (TOLEDO, et al 2003).

Dentre as substâncias naturais com interesse científico encontram-se aquelas com atividades antioxidantes. Existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. A oxidação é

parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. No entanto, o excesso de radicais livres pode apresentar efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios da membrana, agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (BARREIROS, et al 2006). Desta forma, encontram-se relacionados com várias patologias, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (CASTRO, 1995). O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta.

De acordo com Halliwell (HALLIWEL, 2000) “Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”. Dentre os aspectos preventivos, é interessante ressaltar a correlação existente entre atividade antioxidante de substâncias polares e capacidade de inibir ou retardar o aparecimento de células cancerígenas, além de retardar o envelhecimento das células em geral (CASTRO, 1995).

Das classes de produtos naturais conhecidos, os triterpenos se destacam por pertencerem a um grupo diverso e onipresente de terpenos (CONNOLLY, 2002) que são biosinteticamente derivados da ciclização do esqualeno. Muitos triterpenos apresentam interesse devido às atividades farmacológicas e biológicas que incluem entre outras, a inibição seletiva da síntese do óxido nítrico induzida (iNOS) (HONDA, et al 1994) e ciclooxigenase-2 (COX-2) (SUH, et al 1999 ; RINGBOM, et al 1998), modulação da síntese de colágeno (PAPER, 1998), inibição da formação de tumores (WANG, et al 1991) e a habilidade do efeito de proliferação celular (UMEHARA, et al 1992; PAPER, 1998).

Os triterpenos são extensamente distribuídos na natureza, principalmente no reino vegetal, pois se acredita que uma de suas funções fisiológicas nos vegetais seja de defesa química contra patógenos e herbívora. Podem ser encontrados na forma livre, como glicosídeos ou ainda derivados esterificados. Tem-se isolado triterpenos em vegetais, mesmo em animais, como por exemplo, o esqualeno que é obtido do óleo do fígado do tubarão. O esqualeno é o mais simples e é também o precursor imediato de todos os outros triterpenóides. Sua formação se dá a partir de duas unidades de pirofosfato de farnesila (PATOCKA, 2003; MAHATO, 1994).

Os ácidos oleanólico (1), betulínico (2) e ursólico (3) são os triterpenos ácidos (Fig. 1) mais comuns de ocorrência em vegetais e, possuem atividades antitumorais conhecidas. No Japão, por exemplo, são usados na terapia de câncer de pele (MUTO, 1998) e as preparações

contendo os três isômeros são também recomendadas para evitar o surgimento de melanomas (ISHILDA, et al 1990). Estes ácidos também são empregados em cremes cosméticos, pois melhoram a saúde da pele e do cabelo, formando uma barreira de proteção contra as agressões externas. Desta forma melhoram a elasticidade da pele e restaura as fibras de colágeno, a queratina, além de atenuarem as linhas de expressões, rugas e manchas da pele (KATSUO, et al 1997). Os derivados de ácido oleanólico esterificados com derivados de ácido cinâmico apresentam atividade imunomoduladora (inibição do NO e linfoproliferação) (DAVID, et al 2001).

Os ácidos betulínico, oleanólico e ursólico, componentes comuns de diversos vegetais, possuem atividades biológicas conhecidas. Seus derivados podem ser empregados como potenciais antioxidantes e podem ser utilizados para proteção de cosméticos, drogas e alimentos contra a decomposição oxidativa pela ação da luz, temperatura e umidade. As células e organismos vivos desenvolveram vários mecanismos de proteção à ação oxidante. Tem sido demonstrado em diversos experimentos que enzimas e metabólitos presentes em vegetais superiores se protegem da ação oxidante através da inibição da formação de radicais livres e pelo “seqüestro” dessas espécies oxigenadas, como por exemplo, os radicais peróxidos. Substâncias com grupos fenólicos, tais como flavonóides e lignanas, são exemplos de substâncias naturais que têm apresentado variadas atividades antioxidantes (FAURÉ, 1990), mas pouco é conhecido da atividade antioxidante de triterpenos com grupos fenólicos.

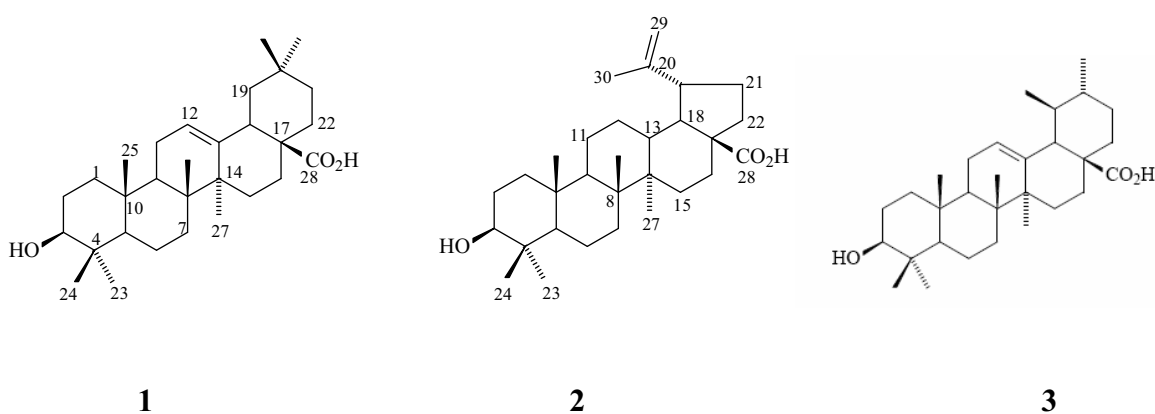


Figura 1 – Estrutura dos ácidos oleanólico (1), betulínico (2) e ursólico (3)

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo deste trabalho é apresentar um levantamento das atividades biológicas e ocorrência de triterpenos ácidos mais comuns, sintetizar derivados químicos bioativos dessas substâncias e utilizar catálise enzimática na obtenção de derivados de produtos naturais.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Atualizar informações sobre ocorrência e atividades biológicas dos ácidos betulínico, ursólico e oleanólico;

Isolar e caracterizar ácidos triterpenos de fontes vegetais;

Obter derivados esterificados com os ácidos isolados;

Caracterizar os derivados obtidos;

Testar a lipase imobilizada (Novozyme 435) na obtenção de ácidos esterificados com etanol e metanol

## **3 REVISÃO BIBLIOGRAFIA**

Em virtude da diversidade de temas que compõe este trabalho, esta revisão bibliográfica apresenta-se dividida em capítulos distintos, procurando seguir uma seqüência lógica de eventos, dando ênfase aos pontos relevantes do trabalho. Inicialmente as reações de biotransformações de ácidos em ésteres objeto deste estudo, são expostas. Especial atenção é dada à utilização de lipases como catalisadores nas reações de esterificação, enfatizando importantes propriedades destas enzimas, que tornam seu uso atrativo como catalisador em biotransformação, por serem extremamente ativas, versáteis e realizarem uma variedade de transformações sob condições brandas e de maneira seletiva. Na seqüência deste capítulo, a utilização de solventes orgânicos é enfocada, principalmente no que diz respeito às vantagens e desvantagens na utilização dos mesmos. Após a compilação de todas as informações necessárias ao completo entendimento do trabalho, uma revisão relacionada à reação enzimática de particular interesse, esterificação de ácido oléico e derivados do ácido cinâmico

utilizando lípase, é apresentada. E finalizando este trabalho, é realizada a comparação entre a esterificação convencional e a submetida a radiações de microondas.

### 3.1. TRITERPENOS

#### 3.1.1. TERPENOS E SUA FORMAÇÃO

Os triterpenóides pertencem à larga e estruturalmente diversa família de produtos naturais conhecida como terpenóides (ou terpenos). Estes compostos são todos derivados de unidades de isopreno C5 que se ligam entre si, orientados em sentido inverso (cabeça-cauda) (DEWICK, 2000).

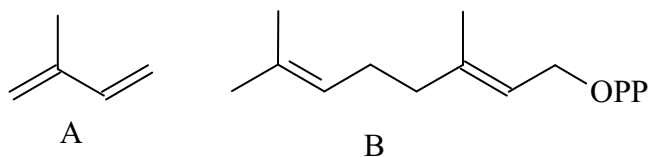


Figura 2 – Estrutura do Isopreno (A) e geranyl-pirofosfato (B)

Terpenóides apresentam grande diversidade, mas todos se originam pela condensação do isopentenil-difosfato (IPP) com o dimitil-alil-difosfato (DMAPP), conhecidos como hemiterpenos, formando o geranyl-pirosfosfato (GPP) (Figura 2).

Através de ligações sucessivas de esqueletos de carbono, representadas por  $(C_5)_n$ , obtêm-se assim as classes principais de terpenos, conforme esquema abaixo: 27

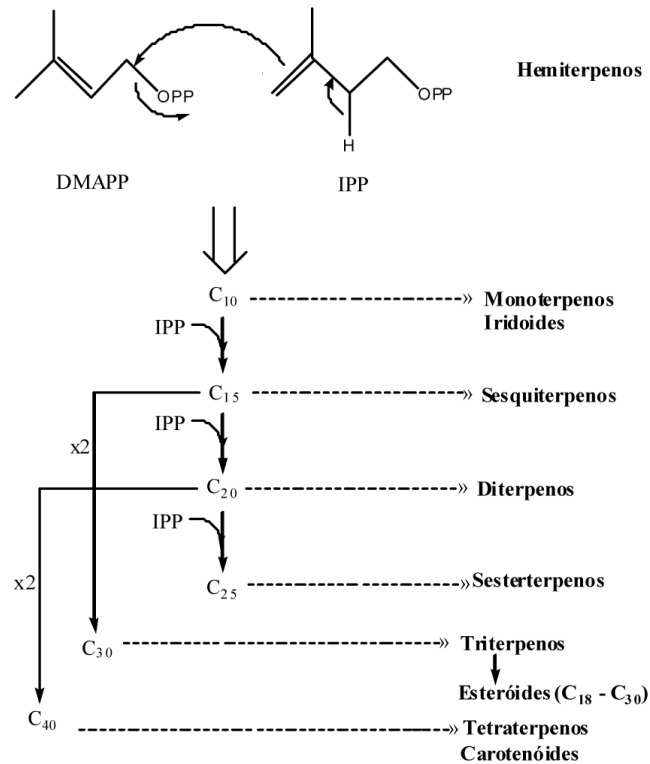


Figura 3: Esquema da formação geral dos terpenos.

Mas a maioria dos terpenóides não ocorre na sua forma aberta, e sim sob a forma de estruturas cíclicas, obtidas através de reações de ciclização sucessivas.

### 3.1.2 Formação de triterpenos.

Os triterpenos não são formados através do processo de acrescentar IPP à cadeia já existente, ilustrado na figura 4, formando uma maior. Ao invés, duas moléculas de pirofosfato de farnesila associam-se “cauda a cauda” por intermédio de um processo complexo para formar um hidrocarboneto de nome esqualeno, que é considerado o precursor tanto dos triterpenos como dos esteróides. (DEWICK, 2000). A sua ciclização pode ser observada na Figura 4.



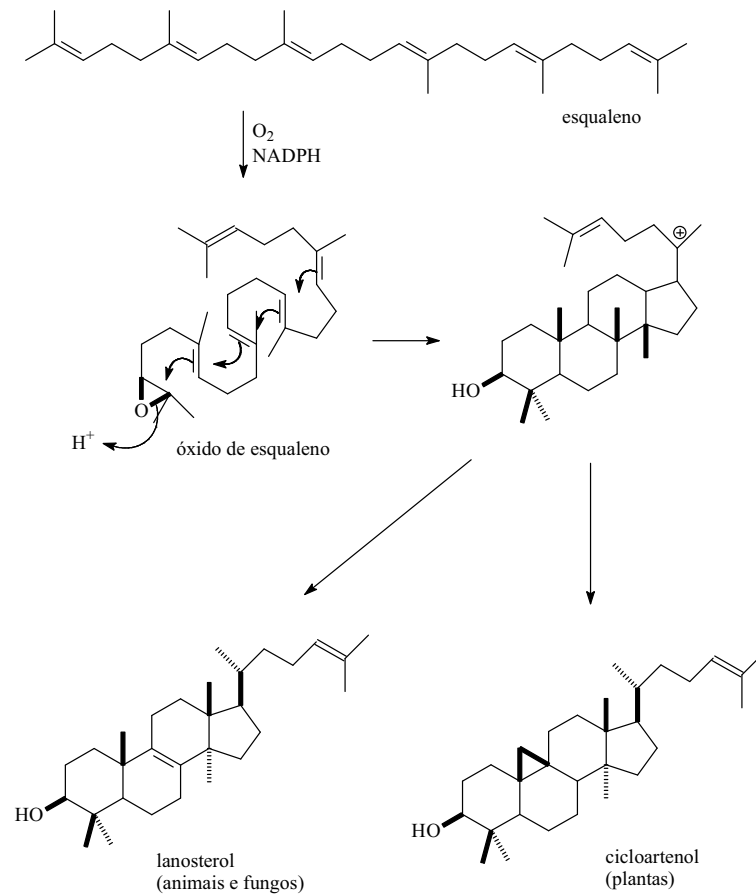


Figura 4 – Ciclização do esqualeno

Como mostrado na Figura 4, tanto nos animais quanto nas plantas, praticamente, todos os triterpenóides derivam do cátion protosterilil. Portanto, os demais tipos de triterpenos de plantas são derivados do cicloartenol.

### 3.1.3 Classes de triterpenóides

Conforme as suas estruturas os triterpenóides são agrupados em classes (CONNOLLY, 2002). As mais importantes estão representados na (Tabela 1).

Tabela 1 – Classes de Triterpenos

<b>Classes</b>	<b>Estruturas</b>
Esqualenos	Linear
Damaranos	Tetranortriterpenóides e quassinóides
Lupanos	Pentacíclicos
Oleanos	Pentacíclicos
Ursanos	Pentacíclicos
Hopanos	Pentacíclicos

Fonte: Tabela elaborada pelo autor

Os triperpenóides têm bastantes propriedades medicinais, com grandes potencialidades em atividades biológicas: são antiinflamatórios, bacterianos, fungicidas, antivirais, analgésicos, cardiovasculares, antitumorais.

Existe, pelo menos cerca de 4000 triterpenóides conhecidos encontrados na natureza, a maioria deles facilmente encontrados em muitas plantas. Os triterpenos de estrutura pentacíclica são aqueles que possuem maiores capacidade anticancerígenas.

Devido à sua enorme diversidade o seu estudo tem despertado grande interesse na tentativa de novas e reais aplicabilidades.

### 3.1.4 TRITERPENOS ÁCIDOS MAIS COMUNS

Existem atualmente cerca de 4000 triterpenos descritos na literatura (MAHATO, 1994). No entanto, os mais comuns são os de esqueletos oleano, ursano e lupano e, dentre estes, os de ocorrência vegetal mais freqüente são os ácidos, oleanólico (1), betulínico (2) e ursólico(3).

#### 3.1.5. Ácido Oleanólico (1)

É um triterpenóide pentacíclico pertencente ao grupo dos oleanos (Figura 1), também conhecido como ácido (3 $\beta$ )-hidroxioleano-12-en-28-óico. Do ponto de vista de suas características biológicas, este triterpeno é ativo contra câncer de pele (melanomas), porém exibe uma atividade inferior ao ácido betulínico. Normalmente, este triterpeno ocorre em mistura com o ácido ursólico (3) em igual quantidade, assim, é sempre preferível à utilização do mais ativo, no caso o ácido ursólico. No entanto, a obtenção de alguns derivados de (1) são

bastante mais ativos que o próprio ácido oleanólico. (SABINSA CORPORATION, 2000. Acesso em 08.04.12.

Mesmo assim, o ácido oleanólico possui uma maior capacidade anticancerígena que a maioria dos triterpenóides, e, como sendo relativamente fácil de encontrar na natureza, apresenta bastante importância medicinal. (SPORN, 2000). O quadro (1) sintetiza as principais fontes de ácido oleanólico, com as respectivas famílias e nomes populares.

Quadro 1: Ocorrência de ácido oleanólico em plantas

<b>Nome Botânico</b>	<b>Nome popular</b>	<b>Família</b>	<b>Referencia</b>
<i>Mormodia charantia</i> L.	Melão de São caetano	Curcubitaceae	Di Stasi, 2002
<i>Artemisia absinthium</i>	Losna	Artereaceae	Verdi, et al 2005
<i>Syzygium cumini</i> (L)	Jambolão	Myrtaceae	Migliato, K. F. 2005.
<i>Asclepias syriaca</i>	Hibisco de flor vermelha	Asclepiadaceae	Juan, et al 2012.
<i>Sonchus arvensis</i> L.	Relógio-de-pastor	Asteraceae	Yang, et al 2009.
<i>Ziziphus jujuba</i>	Jujuba selvagem	Rhamnaceae	Jiang et al., 2007
<i>Viscum album</i> L	Visqueiro	Loranthaceae	Kiu et al., 2003b
<i>Terminalia ivorensis</i>	Terminália	Combretaceae	Dongmo et al, 2006
<i>Baccharis articulata</i>	Carqueja	Asteraceae	Fachinetto et al, 2009
<i>Byrsonima</i>	Murici do campo	Malpighiaceae	Guilhon-Simplicio et al, 2011

### 3.1.6 Ácido Betulínico (2)

Esse triterpenóide pentacíclico pertence ao grupo dos lupanos (Figura 1) e ocorre em muitas plantas, porém quase sempre encontrado em pequenas concentrações nas espécies vegetais. É conhecido pelas suas propriedades antiinflamatórias, mas, que mais têm sido estudadas nos últimos anos são as anticancerígenas. Através das investigações decorridas descobriu-se o potencial citotóxico do ácido betulínico para as células de melanomas cancerígenos, não só em ratos como mesmo em células humanas. O triterpeno não só inibe o crescimento das células malignas, como provoca mesmo a autodestruição, a sua morte “programada” (apoptose) (PEZZUTO, Patente Americana nº 5 862 527, 1999).

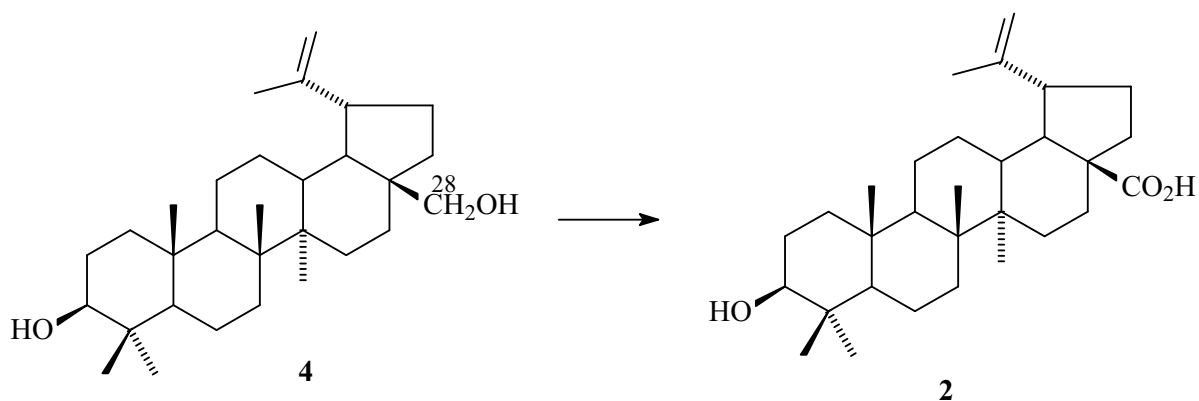
A sua grande especificidade para as células tumorais tem também outra vantagem: não ataca as células saudáveis circundantes. Tendo em conta que os atuais medicamentos existentes no mercado funcionam como um veneno, matando e impedindo de se replicar qualquer tipo de células quer sejam malignas ou não, o ácido betulínico adquire certa vantagem sobre estes medicamentos. (PEZZUTO, Patente Americana nº 5 862 527, 1999).

O seu baixo custo, a sua fácil obtenção, a sua baixa toxicidade em organismos vivos e as características únicas antitumorais tornam o ácido betulínico o mais promissor triterpenóide a ser usado no tratamento do câncer. (quadro2)

Quadro 2: Ocorrência do Acido Betulinico em vegetais

<b>Nome Botânico</b>	<b>Nome Popular</b>	<b>Família</b>	<b>Referência</b>
<i>Hypericum lanceolatum</i>	Erva-de-são-joão	Hypericaceae	Zofou, et al 2011
<i>Breynia fruticosa (L.)</i>	Begonia	Euphorbiaceae	Qiu, et al 1996
<i>Myrciaria dubia</i>	Camu-camu	Myrtaceae	Zanatta, et al 2005
<i>Ficus polita Vahl.</i>	Figueira	Moraceae	Kuete, et al 2008.
<i>Diospyros crassiflora</i>	Caqui-do-cerrado	<i>Ebenaceae</i>	Tangmouo, et al 2006.
<i>Sorbus decora</i>	Piteira-brava	Rosaceae	Leduc, et al 2006
<i>Cássia obtusifolia</i>	Fedegoso	Leguminosae	Joshi, et al 2003.
<i>Potentilla discolor</i>	Mimosa	Rosaceae	Xue, et al 2006
<i>Artocarpus rigida</i>	Jaqueira	Moraceae	Ko, et al 2005
<i>Callistemon lanceolatus DC.</i>	Escovilhão-carmesim	Myrtaceae	Simpson, et al 2006

Devido sua pequena concentração em tecidos de plantas e grande procura para produção de preparados terapêuticos, o ácido betulínico é obtido a partir da oxidação da hidroxila primária do C-28 (Figura 5) da betulina (4), um triterpeno que pode ser encontrado em *Betula papyrifera* (Betulaceae) popularmente conhecida como carvalho branco (“white birch”).



**Figura 5:** Obtenção do ácido betulinico a partir da betulina

### 3.1.7. Ácido ursólico (3)

É um triterpenóide pentacíclico pertencente ao grupo dos ursanos (Figura 1), e normalmente surge associado ao seu isômero ácido oleanólico. Há apenas alguns anos se descobriu que esta substância era ativa do ponto de vista farmacológico, tendo sido usado durante muito tempo apenas em cosméticos e como agente emulsionante na indústria de alimentos. A sua toxicidade (aguda e crônica) é praticamente nula, e é considerado dermatologicamente inócuo. Com o aumento da investigação científica veio-se a descobrir e a atribuir ao (3) e derivados propriedades antiinflamatórias, antitumorais e antimicrobianas (SPORN, 2000).

As propriedades anticancerígenas do ácido ursólico foram estudadas em diversas investigações *in vitro*, passando para condições *in vivo* quando se obtinha resposta positiva. Daí conclui-se que este triterpeno possui algumas capacidades inibitórias contra o desenvolvimento de tumores. (SPORN, 2000 ; SUH, 1999). Através da inibição da ativação do vírus Epstein-Barr pelo TPA (12-O-tetradecanolforbol 13-acetato), o ácido ursólico mostrou que provoca um grande atraso na formação de papilomas sendo esta inibição mais importante em câncer de pele. Estudos feitos em ratos mostraram a diminuição significativa da ocorrência de tumores na pele em vários períodos de tempo. Este efeito é comparável ao já conhecido inibidor tumoral ácido retinóico, tendo ele apresentado melhores resultados.

O ácido ursólico demonstra assim um grande potencial futuro de tratamento de câncer de pele, tendo sido já iniciados estudos com vista à comercialização de medicamentos baseados na sua ação no Japão. (SABINSA CORPORATION, 2000). Acesso em 22.11.07.

Quadro 3: Ocorrência do ácido ursólico em vegetais

<b>Nome Botânico</b>	<b>Nome Popular</b>	<b>Família</b>	<b>Referência</b>
<i>Hyssopus cuspidatus</i>	Erva-sagrada	Labiatae	Ablizl et al., 2009
<i>Viburnum punctatum</i>	Trepadeira-ninho-de-passarinho	Caprifoliaceae	Altun, et al 2009
<i>Radermachera boniana</i>	-	Bignoniaceae	Soejarto, et al 2006
<i>Rhododendron ferrugineum</i> L.	Neve rosa	Ericaceae	Gunduz, et al 2006
<i>Hyptidendron canum</i>	Pinha-do-cerrado	Lamiaceae	Connolly, et al 2009
<i>Lantana camara</i> L	Cambará	Verbenaceae	Ghisalberti, et al 2000
<i>Clinopodium mexicanum</i>	Toronjil de Monte	Lamiaceae	Castilho et al., 2006
<i>Terminalia arjuna</i> Roxb	Arjuna	Combretaceae	Chatterjee, et al 1994
<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	Mirtilo	Ericaceae	De Pascual-Teresa, et al 2008
<i>Jacaranda decurrens</i> Cham.	Carobinha	Bignoniaceae	Boudet, et al 2007

### 3.2 ENZIMAS NA PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE PRODUTOS NATURAIS

Enzimas isoladas ou purificadas possuem um número de propriedades que tornam seu uso atrativo como catalisador em biotransformação. Elas são extremamente ativas, versáteis e realizam uma variedade de transformações sob condições brandas e de maneira seletiva. Adicionalmente, desenvolvimentos recentes em enzimologia, principalmente engenharia de proteínas e reações enzimáticas em meio não aquoso, aumentam consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisador em processos industriais (MACRAE, A. 1985; IUPAC, 1990)

A utilização de enzimas isoladas na transformação de compostos orgânicos é conhecida há mais de cem anos, apesar deste potencial ter sido mais intensamente explorado a partir da segunda metade da última década. Durante este período um grande número de reações catalisadas por enzimas foi desenvolvido e tornaram-se familiares aos químicos orgânicos. Dentre as principais enzimas utilizadas destacam-se as lipases por apresentarem capacidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito. Não obstante, o elevado potencial de aplicação das lipases também é justificado pela sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, sua estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos, e sua quimio-régio e enantiosseletividade. Uma das principais contribuições deste tipo de metodologia biossintética tem sido na obtenção de compostos enantioméricamente puros ou enriquecidos, geralmente intermediários ou produtos finais de rotas sintéticas estereocontroladas (SIH e WU, 1989; SANTANIELLO, 1990; THEIL, 1995; STECHER et al 1992; FABER, 1997). A tecnologia enzimática é hoje uma das áreas mais promissoras entre as novas tecnologias para a síntese de compostos com alto valor agregado. Alinhando esta tecnologia à utilização de reatores de microondas, podemos controlar a seletividade, realizar reações com ou na ausência de solventes, diminuir consideravelmente o tempo de reação, além de aumentar o rendimento.

Um outro aspecto é que a descoberta de novas substâncias de origem vegetal com atividade antioxidante têm grande interesse científico e farmacêutico, pois, sabe-se que existe uma correlação entre esta atividade e a propriedade que alguns antioxidantes apresentam de inibir o aparecimento de células cancerígenas, além de retardar o envelhecimento das células em geral. (HO, et al 1994). Além disso, o uso de substâncias antioxidantes na imobilização de enzimas é uma das técnicas mais importantes na aplicação de catálise enzimática para reações sintéticas em solventes orgânicos. Por razões

práticas e econômicas, é muitas vezes vantajoso usar enzimas imobilizadas visto que, com poucas exceções, elas são insolúveis em solventes orgânicos (KISE, 1991). Uma das vantagens da imobilização é poder utilizar o catalisador repetidamente sem considerável perda da atividade catalítica (POTTIE, 1995). Considerando a compatibilidade com a enzima, géis hidrofílicos têm sido freqüentemente empregados como suportes enzimáticos. Às vezes, a enantiosseletividade é aumentada (POTTIE, 1995).

Dentre as enzimas, pode-se destacar as lipases, que são enzimas hidrolíticas que hidrolisam triglicerídeos em ácidos graxos livres e glicerol. Elas têm atraído a atenção dos pesquisadores principalmente por suas propriedades enantiosseletivas. As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica devido à sua versatilidade catalítica, disponibilidade comercial, baixo custo, além de não requererem co-fatores (CASTRO, 1995).

Muitos estudos para a utilização de lipases em síntese orgânica têm envolvido conversão assimétrica, um dos temas centrais da síntese orgânica moderna (KLIBANOV, 1989). No entanto, elas promovem também a esterificação quando utilizadas sob condições específicas.

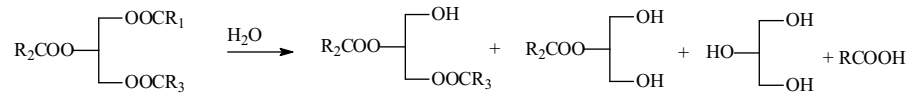
A indústria farmacêutica tem demonstrado grande interesse nesta área, visto que a atividade biológica de muitas drogas racêmicas muito vezes reside em um único enantiômero. Sintetizar tais drogas em sua forma enantiometricamente pura está se tornando um caminho importante na química de biotransformação.

### 3.2.1 REAÇÕES DE TRANSFORMAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM ÉSTERES EMPREGANDO ENZIMAS

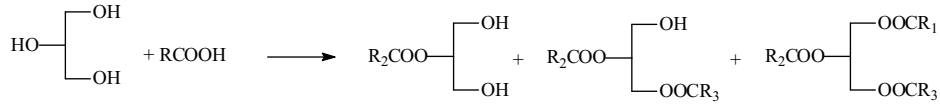
Neste cenário, dentre os processos mais promissores para transformação de ácidos graxos em ésteres estão as reações de hidrólise, síntese de ésteres e transesterificação destes materiais na presença de catalisadores químicos ou enzimáticos (Figura 6)



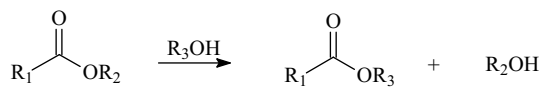
## a. Hidrólise



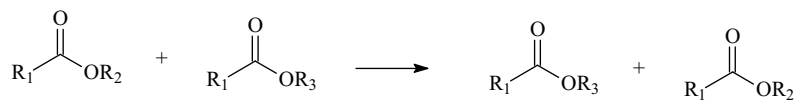
## b. Esterificação



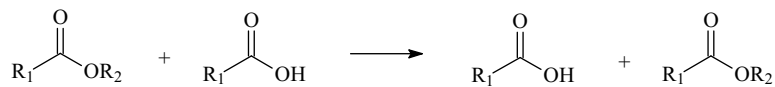
## c. Transesterificação



## d. Interesterificação



## e. Acidólise



**Figura 6:** Reações de hidrólise e síntese de ésteres e transesterificação.

As enzimas estão presentes em todas as células vivas, onde exercem a função de catalisar as reações metabólicas, aumentando a velocidade em até  $10^{14}$  vezes. Com exceção de alguns pequenos ácidos nucleicos (RNAs) com função catalítica, os biocatalisadores são moléculas de proteínas e o seu poder catalítico está associado à conformação nativa, que depende de condições específicas de temperatura, pH e força iônica (MADIGAN; MATINKO; PARKER, 2000).

As enzimas apresentam propriedades que as tornam altamente requisitadas como biocatalisadores. Elas são versáteis e executam uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido, em condições brandas de reação. Além disso, a atividade enzimática pode ser regulada com relativa facilidade, bastando modificar a natureza do meio de reação, como por exemplo, pela alteração do valor do pH ou pela adição de algum inibidor. Toda enzima em razão de sua grande especificidade, catalisa as transformações moleculares sem ocorrência

de reações paralelas indesejáveis que são comuns em sínteses químicas. Conseqüentemente, os processos industriais que empregam enzimas são, em geral, relativamente simples, fáceis de controlar e energeticamente eficientes (PATEL, 2000; OLIVEIRA, MANTOVANI., 2009). Além disso, as enzimas atendem as especificações atuais da química verde e são capazes de catalisar um amplo espectro de reações.

De acordo com os relatórios da “Business Communications Company,” o valor da venda das enzimas para a utilização industrial (alimentos, detergentes e especialidades químicas) foi estimado em 2 bilhões de dólares em 2004. As projeções naquela época previam um aumento na taxa de crescimento do mercado de biocatalisadores de 4-5% ao ano, em função do aumento do número de empresas que comercializam enzimas com preços competitivos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Entretanto, essas expectativas foram superadas e o crescimento da demanda global alcançou valores de 7,6% ao ano com o valor de venda estimado em 6 bilhões de dólares em 2011. Para os próximos 5 anos, está prevista a manutenção desta taxa de crescimento impulsionado pelo desenvolvimento de novas rotas de processos, para obtenção de produtos novos ou conhecidos a custos mais competitivos, ampliando simultaneamente o potencial de aplicações de enzimas em processos industriais (BCC RESERCH, 2010).

O mercado global de enzimas se divide em três seguimentos de aplicação como (i) enzimas técnicas, (ii) enzimas utilizadas por indústrias de alimentos e (iii) para ração animal. O mercado consumidor que mais cresce é aquele destinado ao setor alimentício, em torno de 4% ao ano. As enzimas técnicas são utilizadas na produção de xarope de açúcar invertido e para produção de compostos aromatizantes. Enzimas técnicas são utilizadas na formulação de detergentes, produção de papel e celulose, manufatura de couro e produção de fármacos. Este é o principal mercado consumidor e representa aproximadamente 50% do total de enzimas comercializadas no mercado.

As enzimas mais utilizadas no setor industrial são proteases, 40% do mercado de enzima, seguido de carboidrases e lipases (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

O rápido crescimento da biocatálise está certamente associado às ferramentas de Biologia Molecular e Engenharia de Proteínas, que permitem gerar variável com propriedades diferentes como estruturas, função, seletividade e também tolerância a solventes não-aquosos. Hoje já são conhecidas várias enzimas que são cataliticamente ativas em meios reacionais predominantemente não-aquosos, os quais são também denominados meios não convencionais (OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009).

### 3.2.2 Classificação e Nomenclatura das enzimas

As enzimas são geralmente classificadas em seis tipos principais (Tabela 2). A União Internacional de Bioquímica recomendou que as enzimas tivessem três nomes, a saber: um nome sistemático que mostra a reação catalisada e o tipo de reação baseada na classificação da Tabela 1: Um nome comum recomendado; e um código de quatro algarismos da Comissão de Enzimas (Código EC) também baseado na classificação do tipo de reação catalisada. (THOMAS, 2000).

As enzimas são classificadas pelos substratos com que reagem e por sua especificidade de reação. As enzimas se denominam adicionando a terminação *ase* ao nome do substrato com o qual realizam reações (LAIDLER, 1954). Segundo o mesmo autor, a enzima que controla a decomposição da uréia recebe o nome de uréase; aquelas que controlam a hidrólise de proteínas denominam-se proteases assim como as que hidrolisam o amido são chamadas de amilases. Algumas enzimas como as proteases, tripsina e pepsina, conservaram os nomes utilizados antes que se adotasse esta nomenclatura.

Tabela 2 – Classificação das enzimas

Código	Classificação	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Oxidações e reduções
2	Transferases	Transferência de um grupamento de uma molécula para outra
3	Hidrolases	Hidrólise de vários grupamentos funcionais
4	Liasas	Clivagem de uma valência por mecanismos não-oxidativos e não-hidrolíticos
5	Isomerases	A interconversão de todos os tipos de isômeros
6	Ligases	A formação de uma ligação entre moléculas

**Fonte:** (THOMAS, 2000).

### 3.2. 3. - Comparação do uso de catalisadores químicos com os enzimáticos

Uso de catalisadores químicos métodos químicos convencionais para transformação de ácidos graxos em ésteres envolvem a produção de triglicerídeos modificados, muito importantes para as indústrias de alimentos e farmacêuticas, na presença de catalisadores ácidos e básicos, sendo comumente utilizado o ácido sulfúrico, para esta função. Entretanto, ele geralmente conduz à formação de subprodutos indesejáveis que podem ser difíceis de serem separados e recuperados do produto (AL SAADI, 1981). Neste sentido o uso de catalisadores ácidos tem o inconveniente de proporcionar baixos rendimentos e sua ação corrosiva implicaria na necessidade de equipamentos específicos para tal fim.

Apesar dos elevados rendimentos obtidos quando se utiliza catalisador básico como hidróxidos alcalinos, às reações devem ser conduzidas utilizando produtos vegetais neutros ou de baixa acidez, pois a presença de ácidos graxos livres neutraliza a ação catalítica. Além de que, a separação dos sabões formados na reação apresenta algumas dificuldades, que conduzem quase sempre a perdas no rendimento da mistura de ésteres.

### 3.2.4 - Uso de enzimas como biocatalisadores

O enorme potencial de aplicação de enzimas no desenvolvimento de processos de síntese é hoje uma realidade inquestionável. No entanto, foi apenas na década de 80 que a biocatálise sofreu o seu maior impulso, através da quebra do dogma de que as enzimas só funcionariam em meios aquosos. A utilização de enzimas em meios não convencionais (p. ex. solventes orgânicos) permitiu aplicar estes biocatalisadores em reações de síntese química.

A utilização de enzimas em meio aquoso foi extensamente usada em processos catalíticos, por vários anos. Porém o seu uso tornou-se limitado, pelo fato de muitos substratos serem pouco solúveis em água, o que demandava grande volume reacional e procedimentos de separação complexos. O uso de solventes orgânicos em reações enzimáticas superou este problema e o desenvolvimento de novos métodos de imobilização permitiu que várias reações pudessem se tornar viáveis. A adição de quantidade moderada de solvente orgânico e forma direta de aumentar a solubilidade de substratos hidrofóbicos e de tornar a reação possível (AIRES-BARROS, 2002).

### 3.2.5 - Imobilização de enzimas

Enzimas imobilizadas são definidas como aquelas confinadas ou localizadas em uma certa região do espaço, com retenção de sua atividade catalítica, podendo ser usadas repetidamente e continuamente. Além de favorecer a reutilização da enzima, a imobilização pode melhorar sua estabilidade por restringir o desenovelamento, porém podendo resultar em perda da atividade (POWEL, 1996). A reutilização da enzima provê grande vantagem no custo, sendo um pré-requisito essencial quando se deseja estabelecer um processo economicamente viável (TISCHER & KASCHE, 1999). Em alguns casos, a imobilização pode aumentar a enantiosseletividade destas enzimas (REETZ, 2002).

O uso de enzimas imobilizadas compete com a utilização de enzimas nativas e com os processos químicos convencionais. Entretanto, uma cuidadosa avaliação de diversos fatores deve ser feita para a escolha do método a ser utilizado. O custo do processo de imobilização, a perda da atividade da enzima e a necessidade de produtos mais puros devem ser levados em consideração (UHLIG, 1998). Embora existam muitas técnicas de imobilização, ainda não existe uma que possa ser considerada como universal para todas as aplicações ou para todas as enzimas. Isto se deve às diferentes características químicas e composição das enzimas, às diferentes propriedades dos substratos e produtos, assim como às diversas aplicações. Para cada utilização torna-se necessário encontrar um procedimento que seja simples e barato, e que origine produtos com alta retenção de atividade e com alta estabilidade operacional (KENNEDY & ROIG, 1995).

É notável que qualquer alteração no equilíbrio entre as formas “abertas” e “fechada” ou mesmo na conformação da enzima, pode provocar mudanças drásticas em suas propriedades catalíticas. Este fato pode ser observado nas mais diversas técnicas de imobilização, envolvendo diferentes áreas da enzima, gerando diferença na rigidez de sua estrutura ou mesmo criando um microambiente específico ao seu redor. A combinação entre a técnica de imobilização e as condições de reação conseguem gerar resultados bastante diversos (PALOMO, 2002).

As lipases são espontaneamente solúveis em soluções aquosas, porém seus substratos naturais não são. Embora o uso de solventes orgânicos adequados ou de emulsificantes, ajudem a solucionar o problema do contato entre enzima e substrato, a formação destes sistemas pseudo-homogêneos apresenta desvantagens. Estas podem ser de natureza tecnológica, como a contaminação dos produtos pela enzima residual, ou ainda econômica, como a não reutilização da enzima (BALCÃO, PAIVA & MALCATA, 1996).

A princípio, todos os métodos existentes para imobilização podem ser empregados para lipases, dando-se preferência à utilização daqueles que apresentem uma alta retenção de atividade (UHLIG, 1998). O método mais fácil de preparar uma enzima imobilizada está baseado na adsorção física das moléculas desta sobre a superfície de matrizes sólidas. O método consiste em colocar em contato a solução aquosa da enzima e o suporte (KENNEDY & ROIG, 1995). Entre todos os métodos, o de adsorção é o mais utilizado para lipases devido a facilidades no preparo, na recuperação do suporte e ao baixo custo (PAIVA, BALCÃO & MALCATA, 2000). Este método tem sido muito útil em sistemas não aquosos, onde a desorção consegue ser evitada devido à baixa solubilidade da enzima nos solventes hidrofóbicos (TISCHER & KASCHE, 1999).

Têm sido relatados na literatura outros métodos tais como: oclusão, ligação covalente, ligação cruzada, precipitação, ligação metálica, membranas, entre outros. Estes podem ser utilizados isoladamente ou combinados (BALCÃO, PAIVA & MALCATA, 1996).

### 3.3 LIPASES

Entre os processos enzimáticos de maior interesse industrial está às reações catalisadas pelas lipases, as quais representam aproximadamente 20% das biotransformações realizadas atualmente (FABER, 1997). Lipases (triacilglicerol hidrolases E. C. 3. 1.1.3) são obtidas de fontes microbianas, animais e vegetais e atuam sobre a ligação éster de vários compostos, sendo os acilgliceróis seus melhores substratos. Antigamente, elas eram predominantemente obtidas do pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para consumo humano. A hidrólise de triacilgliceróis utilizando lipases é reação reversível, portanto o equilíbrio pode ser alterado pela variação de concentração, reagente ou produtos. Essas duas reações básicas podem ser combinadas de modo seqüencial, fornecendo um grupo de reações denominado interesterificação (CASTRO, ANDERSON, 1995). Essas reações usualmente são processadas com alta régia enantiosseletividade, tornando as lipases um importante grupo de biocatalizadores.

Atualmente, as lipases são produzidas, preferencialmente de microorganismos devido às facilidades de controle e de aumento da capacidade produtiva processos fermentativos, além da redução do seu custo de obtenção.

Diferentes técnicas foram aperfeiçoadas ou desenvolvidas para o estudo da otimização de biotransformações (COSTA, 1999), como por exemplo: imobilização da enzima, modificação enzimática por engenharia genética ou via interação não-covalente “*imprinting*”, reincubação

do produto ou do substrato, mapeamento do sítio, estudo da variação do solvente “*solvent engineering*” e estudo da variação de doadores acila em relação à síntese.

A imobilização da enzima é uma das técnicas mais importantes na aplicação de catálise enzimática para reações sintéticas em solvente orgânicas. Por razões práticas e econômicas, é vantajoso usar enzimas imobilizadas, visto que, com poucas exceções, elas são insolúveis em solventes orgânicos (KISE, 1991). Considerando a compatibilidade com a enzima, géis hidrofílicos têm sido freqüentemente empregados como suportes enzimáticos.

### **A enzima Novozyme 435**

Novozyme 435 é uma lipase produzida por fermentação submersa dos microorganismos *Aspergillus niger* geneticamente modificada e suportada sobre resina acrílica macroporosa numa concentração de 3% massa/massa, consistem de partículas com diâmetro na escala de 0,3-0,9 mm, densidade aproximada de 430 kg/m<sup>3</sup> contendo 1-2% de água massa/massa

A lipase é termoestável e particularmente usada na síntese de ésteres e amidas. Novozyme 435 tem sido empregada na resolução de uma grande escala de álcoois primários e secundários, bem como de ácidos carboxílicos. Nos parâmetros de reação a enzima tem atividade máxima na faixa de 70-80 °C, mas a melhor estabilidade térmica encontra-se na faixa de 40-60 °C. Quanto ao risco que a enzima apresenta, ela é nociva à pele, olhos e mucosas quando em contato prolongado e neste caso deve-se lavar a região com água por um longo período.

#### **3.3.1 - Propriedades físico-químicas**

As lipases são usualmente estáveis em soluções neutras à temperatura ambiente. A maioria das lipases apresenta sua atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 a 40°C. Sua termoestabilidade varia consideravelmente em função de sua origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (MACRAE e HAMMOND, 1985)

Em geral, lipases são ativas em uma ampla faixa de pH apresentando uma alta atividade na faixa de pH 5-9, com o máximo freqüentemente situado entre 6 e 8 (MACRAE e HAMMOND, 1985).

O peso molecular das lipases pode variar de 20000 a 60000 daltons. Algumas são conhecidas por formar agregados em solução e isto pode explicar o alto peso molecular reportado para algumas lipases parcialmente purificadas (MACRAE e HAMMOND, 1985).

### 3.3.2 - Especificidade

Durante muito tempo as lipases apresentaram como definição de especificidade a diferença na taxa de hidrólise entre dois substratos distintos. Levando isso em consideração, estas enzimas foram classificadas em dois grandes grupos: lipases específicas e não específicas (ADER, et al 1997). O conceito de seletividade e especificidade tem sido diferenciado em alguns trabalhos mais recentes. Pela nova classificação, nas reações de hidrólise são medidas as concentrações das espécies encontradas, onde ocorre um equilíbrio entre substrato e produtos. Sendo assim, estas enzimas podem ser consideradas como lipases 1,3 específicas, lipases 1,3 seletivas e lipases não específicas (ADER, et al 1997). A grande maioria das lipases atua preferencialmente nas posições 1 e 3 dos triacilgliceróis. A hidrólise seletiva da ligação na posição 2 fica extremamente dificultada em função do impedimento estérico ao qual está submetida. Pode ocorrer um rearranjo espontâneo ou transesterificação de alguns monoacilgliceróis ou diacilgliceróis, havendo assim a hidrólise completa do triacilglicerol. Contudo, Sugihara e colaboradores (1991) reportaram o isolamento de uma cepa de *Geotrichum candidum* capaz de produzir uma lipase com alguma seletividade pela posição 2 do triacilglicerol.

As lipases específicas são aquelas que catalisam preferencialmente a hidrólise de substratos definidos quanto ao tamanho da cadeia carbônica ou quanto ao grau de insaturação (YADAV, 1998). As lipases não específicas são aquelas capazes de hidrolisar diferentes triacilgliceróis, ou ainda, ligações éster em quaisquer posições do triacilglicerol (SZTAJER, et al 1992).

Além da especificidade pelo substrato e da régioseletividade, as lipases podem apresentar especificidade ou seletividade frente a um substrato com distribuição estérica conhecida (LANG, 1998). Esta característica é de grande interesse industrial, pois sugere seu potencial uso na resolução de misturas racêmicas em que somente um dos enantiômeros é de interesse. Estas enzimas foram utilizadas em reações de hidrólise (ROGALSKA, et al 1993) e esterificação (OKAHATA & MORI, 1997) estereoseletivas, além da obtenção de isômeros a partir de precursores pró-quirais (SCHMID & VERGER, 1998).

### 3.3.3 - Atuação na interface

As lipases têm como característica específica a capacidade de agir sobre substratos pouco solúveis em água. Atuando apenas na interface água/lipídeo, diferenciando-se, assim das



esterases, que atuam sobre a ligação éster de substâncias solúveis em água. A atividade catalítica das lipases é sensivelmente diminuída na ausência de uma interfase, o que se torna evidente pela baixa conversão na hidrólise de ésteres solúveis em água por elas catalisadas (OLIVEIRA, 1999).

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a ativação de lipases na interface: a) uma mudança conformacional induzida interfacialmente gerando uma enzima mais ativa, isto é explicado pelo fato de que os sítios de adsorção na interface não são os sítios ativos onde ocorre a reação, desta forma, ao entrar em contato com a interface a lipase assume uma nova conformação espacial; b) uma maior concentração do substrato no local; c) uma orientação mais favorável do substrato no local; d) um menor grau de hidratação do substrato, tendo em vista que a hidratação das moléculas de lipídeo representa uma proteção às ligações éster. Portanto, devido à redução do número das moléculas de água esta proteção diminui, favorecendo a ação da lipase (YANG e RUSSEL, 1996).

### 3.2.4 - Aplicações

As lipases são consideradas excelentes biocatalizadores em numerosos processos industriais nas mais diversas áreas, tais como alimentos, processos farmacêuticos, formulação de detergentes, oleoquímica, agroquímica, cosméticos, manufatura de papéis, couro, entre outras (VULFSON, 1994). Ainda podem ser ferramentas úteis na fabricação de biosensores para utilização em análises clínicas, análises de alimentos, análises químicas, de contaminação ou poluição de ambientes (PANDEY, et al 1999). Além disso, as lipases têm sido utilizadas em terapias enzimáticas e tratamento de dejetos, efluentes e esgoto (KURITA-WATER, 1994; JAEGER & REETZ, 1998). As principais aplicações das lipases encontram-se resumidas na (Tabela 3).

De todas as aplicações possíveis, a indústria de detergentes tem sido o principal mercado para as lipases. Com o advento da engenharia genética, foram obtidas melhores estabilidade e atividade sob as condições alcalinas prevalentes nos processos de lavagem (BALCÃO, PAIVA & MALCATA, 1996). Estima-se que 1000 toneladas de lipases sejam adicionadas a aproximadamente 13 bilhões de toneladas de detergentes produzidos por ano. As “enzimas detergentes” detêm cerca de 32% do total da venda de lipases (JAEGER & REETZ, 1998).

O crescimento de seu uso em biotecnologia, especialmente no setor de química fina (incluindo o farmacêutico), em comparação com outras enzimas hidrolíticas, se deve à grande especificidade de algumas lipases e à possibilidade de sua utilização em solventes orgânicos.

A síntese de compostos opticamente puros torna-se cada vez mais essencial na obtenção de produtos farmacêuticos, tendo em vista os inconvenientes da utilização de fármacos como mistura racêmica (PANDEY, et al 1999).

Tabela 3 – Aplicações industriais de lipases

<b>Indústria</b>	<b>Ação</b>	<b>Produto ou aplicação</b>
Detergente	Hidrólise de gorduras	Remoção de manchas
Laticínios	Hidrólise de leite gordo, queijo curado, modificação da gordura de manteiga	Desenvolvimento de agentes de sabor em leite, queijo e manteiga
Panificação	Melhora do sabor	Prolongamento do tempo de prateleira
Bebidas	Melhora aroma	Bebidas
Molhos para alimentos	Melhora qualidade	Maionese
Nutracêuticos	Transesterificação	Nutracêuticos
Carne e peixe	Desenvolvimento do sabor	Produtos cárnicos e pescados
Óleos e gorduras	Transesterificação, hidrólise	Manteiga de cacau, margarina, ácidos graxos, glicerol, mono e diglicerídios
Química	Enantiosseletividade, síntese	Produtos químicos
Cosmética	Síntese	Emulsificantes, umidificantes
Couro	Hidrólise	Produtos feitos de couro
Papel	Hidrólise	Melhora na qualidade
Limpeza	Hidrólise	Remoção de gordura
Farmacêutica	Transesterificação, hidrólise	Cefalosporinas, penicilinas naproxeno, ibuprofeno hidantoínas, patuloide A rapamicina-42, lamivudina vitamina D

Fonte: TICOM, 2003

### 3.3.5 Efeito dos solventes orgânicos

O interesse no uso das lipases em síntese orgânica é devido à sua versatilidade catalítica, disponibilidade comercial, baixo custo além de não requererem cofatores (JESUS, 1998), por atuarem em uma ampla faixa de pH e serem muito estáveis (RAMOS, 1999). O uso de lipases está diretamente relacionado com a sua seletividade em relação aos substratos, a sua habilidade para discriminar entre um ácido graxo específico ou um grupo acila em particular (RAMOS, 1999).

Em solvente orgânico, as lipases catalisam a transferência de grupos acila de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores diferentes da água. Dependendo do tipo do doador acila e doceptor, as reações catalisadas por lipases incluem esterificações e transesterificações, amidação, síntese de peptídeos e formação de lactonas macrocíclicas. Embora as lipases possam hidrolisar e formar ésteres como as proteases e esterases, seu mecanismo molecular é diferente, cuja diferença mais importante entre as lipases e esterases é a interação físico-química com seus substratos. Em comparação com as esterases que mostram uma atividade “normal” segundo Michaelis-Menten, um aumento da concentração de enxofre conduz a um aumento na atividade. As lipases não mostram atividade quando a concentração de substrato é baixa. Quando a concentração é gradualmente aumentada acima de sua solubilidade limite, é observado um aumento repentino na sua atividade. O fato de lipases não hidrolisarem substratos abaixo da concentração micelar crítica” (CMC), exibindo, porém, uma alta atividade acima dela tem sido chamada de “ativação interfacial” (BOSSI, 2004). O mecanismo de ativação interfacial está associado à mudança conformacional na enzima (COSTA; AMORIM, 1999).

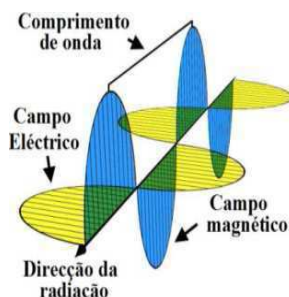
A água ativa a enzima porque possibilita uma maior flexibilidade. Sua presença é imprescindível nas reações catalisadas por enzimas. Estudos mostram que existe um mínimo de água para cada molécula de enzima. Essa quantidade de água corresponde a um monocamada de solvatação, proporcionando que a enzima não seja inativada. Mesmo nos sistemas de solventes anidros, existe uma pequena quantidade de água presente no solvente.

## 4 NOVOS MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE DERIVADOS DE PRODUTOS NATURAIS

### 4.1 Utilização de irradiação de microondas em reações enzimáticas

#### 4.1.1 Histórico de microondas

As microondas apareceram na forma teórica pelas mãos de Maxwell em 1873, na publicação “Tratado sobre Eletricidade e Magnetismo”, no entanto foi Hertz que em 1887 as constatou na prática. As microondas ou ondas eletromagnéticas podem ser definidas como ondas não ionizantes e que apresentam fenômenos de propagação, sem que haja a necessidade de suporte material, nas quais estão associados campos elétricos e campos magnéticos com variação temporal e espacial, figura, bem como apresentam propriedades como reflexão, refração, difração e polarização, as mesmas propriedades que outras frequências ópticas. (RIBEIRO 2004; DALL’OGLIO, et al 2002; HIPPEL,1954).



**Figura 7:** ondas eletromagnéticas

**Fonte:** Instituto de Física da UFRGS, 2008,

O uso de microondas em Química Analítica já é conhecido desde a década de 70, sendo que entre as aplicações mais importantes podemos citar: a digestão de amostras para análise elementar, a extração de diversas substâncias e a desorção térmica de vários compostos (ZLOTORZYNSKI, 1995). O aquecimento por microondas também é largamente utilizado em escala comercial na preparação e secagem de alimentos (DAGANI,1997).

Uma aplicação recente é a obtenção de produtos orgânicos em escala de laboratório usando o aquecimento por microondas, onde as reações são conduzidas em forno de microondas de cozinha ou em reatores especificamente desenhados para esta finalidade.

#### 4.1.2 Fundamentos das Microondas

Microondas (MO) são radiações eletromagnéticas não ionizantes com comprimento de onda da ordem de 1 a 30 cm e com frequência no intervalo amplo de 300 MHz a 300 GHz. Nos fornos de microondas domésticos e nos equipamentos para estudo científico de amostras, em geral é utilizada a frequência de 2,45 MHz e comprimento de onda de cerca de 12cm. No forno ou no reator de microondas, o aquecimento é seletivo em função de determinadas propriedades dielétricas do material a ser processado (AL-MAYMAN e ALZHRANI, 2003; DALL'OGGIO, et al 2006).

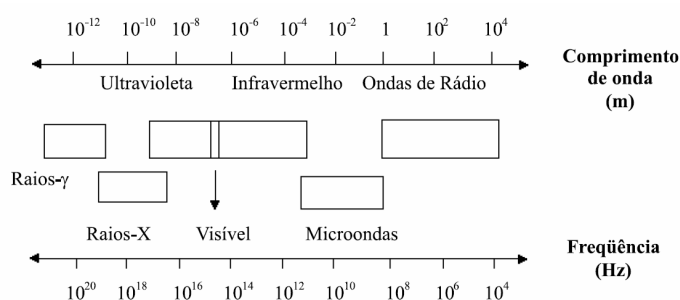


Figura 8: Localização da região de microondas no espectro eletromagnético (Fonte: SANSEVERINO, 2002)

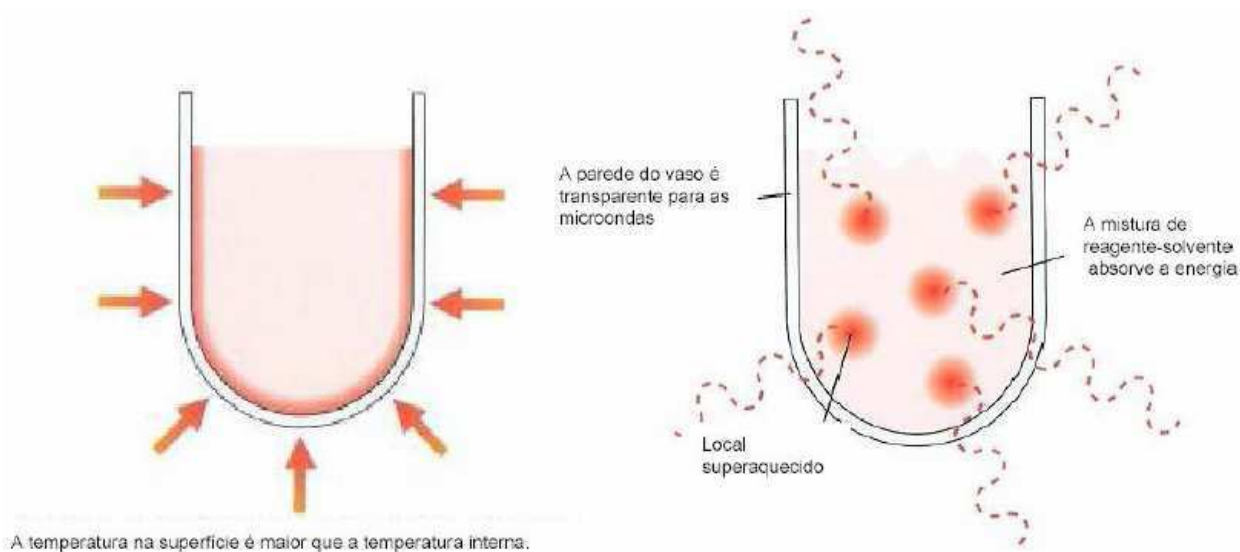
Diferentemente do aquecimento convencional, que é realizado por condução, irradiação e convecção, o aquecimento por microondas é também chamado de aquecimento dielétrico. Existem dois mecanismos principais para a transformação de energia eletromagnética em calor. O primeiro deles é chamado de rotação de dipolo e relaciona-se com o alinhamento das moléculas (que têm dipolos permanentes ou induzidos) com o campo elétrico aplicado. Quando o campo é removido, as moléculas voltam a um estado desordenado e a energia que foi absorvida para esta orientação é dissipada na forma de calor. O aquecimento por rotação de dipolo é extremamente dependente da frequência do campo elétrico e do tempo necessário para que os dipolos retornem ao seu estado de desordem inicial (tempo de relaxação) (BARBOZA, et al 2001; SANSEVERINO, 2002; STUERGA, 2002).

**Tabela 4** – Constantes, fatores de perda dielétricos e de dissipação de algumas substâncias a 25° C e 3GHz.

<b>Material</b>	<b><math>\epsilon'</math></b>	<b><math>\epsilon''</math></b>	<b><math>\epsilon''/\epsilon'</math></b>
Metanol	32,6	21,483	6590
Etanol	24,3	22,866	9410
Água (25°C)	76,7	12,0419	1570
Gelo	3,2	0,00288	9
NaCl a 0,1 M	75,5	18,12	2400
NaCl a 0,5 67M41,875	67	41,875	6250
Propanol	3,7	2,479	6700
Etilenoglicol	12	12	10000
Eptano	1,9	0,00019	1
CCl <sub>4</sub>	2,2	0,00088	4

Fonte: (SANSEVERINO, 2000)

O segundo mecanismo é chamado de condução iônica, onde o calor é gerado através de perdas por fricção que acontecem através da migração de íons dissolvidos quando sob a ação de um campo eletromagnético. O fator de perda dielétrica ( $\epsilon''$ ) mede a eficiência da conversão de energia eletromagnética em calor. A constante dielétrica ( $\epsilon'$ ) da substância é uma medida que indica a sua polaridade (apresentadas na Tabela 6). Já a razão  $\epsilon''/\epsilon'$ , é numericamente igual a tangente  $\delta$ , sendo chamada de fator de dissipação. Este fator indica a habilidade de uma amostra converter radiação eletromagnética em calor, onde quanto maior este valor, mais a substância é aquecida pelas microondas (SANSEVERINO, 2002; HAYES, 2002).



**Figura 9:** Aquecimento da amostra por condução e aquecimento por microondas.

Fonte: (Hayes, 2002)

No caso de misturas, o aquecimento por microondas não ocorre de modo igual, uma vez que diferentes substâncias químicas têm diferentes capacidades de aquecimento, deste modo podem ocorrer diferenças térmicas ao longo de todo o volume de mistura. As microondas além de serem responsáveis pela variação térmica de uma substância ao longo do seu volume, possibilitam o aumento da temperatura de ebulição, maior velocidade de reação em algumas reações, podendo ser utilizadas em reações catalíticas sobre suportes sólidos com a ausência de solventes devido à sua seletividade, podendo ainda apresentar deste modo menor degradação térmica nos suportes com baixa adsorção e conseqüentemente diminuição da quantidade de poluentes gerados nas reações, Quando utilizadas em reações que normalmente utilizem solventes, além disso, as microondas podem diminuir a energia livre de Gibbs, energia da ativação de reação, através da sua energia vibracional molecular ou do alinhamento molecular, que possibilita o aumento do número de colisões moleculares e a diminuição do tempo necessário para reagir. (MELO JUNIOR, 2008.)

Resumindo, as ondas eletromagnéticas apresentam como vantagens, a diminuição dos tempos de reação, a facilidade de manipulação, trabalhar com altas concentrações, diminuição dos custos e possibilidade da não utilização de solventes. (SAGRERA, SEOANE, 2005)

O mecanismo de geração de ondas é constituído por um gerador de hiperfrequências chamado microondas, figura 10, na qual ocorre emissão de elétrons no cátodo, fio de níquel, dentro de um tubo de vácuo, sendo posteriormente transferidos para o ânodo, cilindro não

magnético de cobre, provocando assim campos elétricos e magnético das ondas eletromagnéticas. (SALMORIA, 1996).

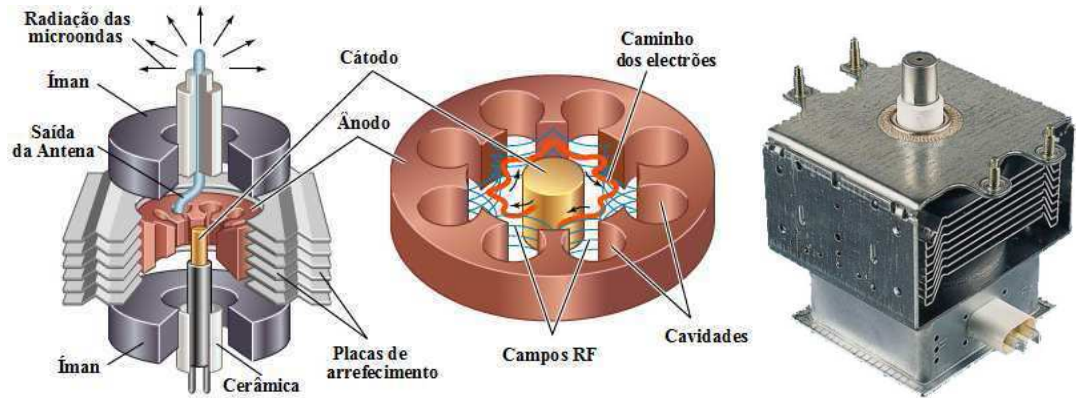
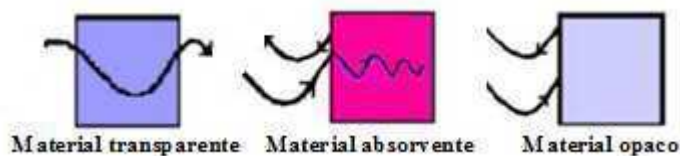


Figura 10 – O magnetron (Encyclopedia Britannica, Plactec-Placas & Assistência, 2008)

#### 4.1.3 Reflexão e penetração das microondas

A reflexão das microondas, figura 12, tal como em todas as outras, depende da natureza química das substâncias, podendo ocorrer desde a absorção até a reflexão total da onda, ou seja, o material pode-se apresentar transparente, absorvente ou opaco conforme o tipo de onda.



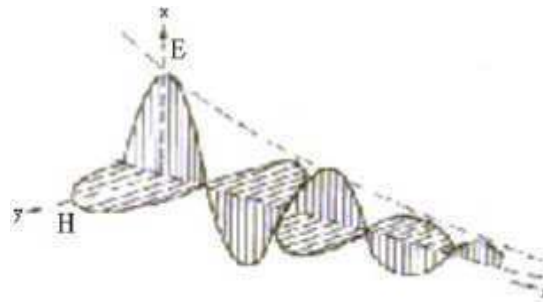
**Figura 11:** Comportamento dos diferentes tipos de materiais diante das microondas. **Fonte:** (DALL’OGLIO, et al 2002)

O tipo de comportamento óptico da absorção ou reflexão contribui para o processo de aquecimento, sendo que nos casos de penetração da onda existe aquecimento e quando ela é refletida isso não acontece. A profundidade de penetração  $D_p$  da onda no material é calculada através da equação 1.1, para a qual contribuem as características dielétricas e as permissividades do material, bem como o comprimento da onda no meio dielétrico. (DALL’OGLIO, et al 2002)



$$Dp = \lambda(\epsilon'')^{1/2}/2\pi\epsilon'' \quad \text{Eq. 1}$$

Isso mostra que, para estudar as interações das ondas eletromagnéticas com um objeto, é preciso observar a relação de suas dimensões geométricas com o comprimento de onda no meio. Assim, uma substância pouco sensível às microondas tem uma profundidade de penetração elevada, enquanto uma substância sensível, absorvente, a profundidade de penetração será pequena como ilustrado na figura 13. (DALL'OGGIO, et al 2002)



**Figura12:** Propagação de uma onda plana em um meio com perdas. (DALL'OGGIO, et al 2002)

#### 4.1.4 Comparação do aquecimento de microondas com o aquecimento convencional

Relatos apontam o uso de microondas como fonte de aquecimento de reações químicas, ressaltando a obtenção de menores tempos de reação e rendimentos superiores àqueles obtidos com fonte de aquecimento convencional. (GRAEBIN; EIFLERLIMA,2005)

Em um forno de microondas doméstico, as ondas eletromagnéticas geradas pelo magnetron são guiadas para a cavidade do forno e refletidas para as paredes deste. Ao contrário do aquecimento convencional, no qual uma substância é aquecida de fora para dentro, no interior do forno de microondas o que ocorre é uma transferência de calor dos diversos pontos que absorveram energia da parte interna para a externa. (SADICOFF; AMORIM; MATTOS, 2000).

Nos domínios da química e das ciências dos materiais, a aplicação da tecnologia de microondas tem despertado especial interesse na síntese de compostos orgânicos e inorgânicos e no tratamento térmico de muitos materiais em escala laboratorial e industrial (KEYSON, et al 2006).

Diversas reações clássicas podem ser bastante aceleradas (muitas vezes por um fator  $10^3$ ) quando o aquecimento é realizado por meio de radiações de microondas ao invés de aquecimento convencional. Além disso, os rendimentos das reações em microondas costumam ser maiores, geram menor quantidade de subprodutos e não ocorrem decomposição de materiais (SADICOFF; AMORIM; MATTOS, 2000).

As reações orgânicas com aquecimento por microondas podem ser conduzidas em microondas modificados, em digestores de microondas, (que tradicionalmente são usados em Química Analítica) ou em reatores de microondas. O surgimento de reatores de microondas para condução de reações químicas ocorreu como consequência direta do estudo das reações em forno doméstico, que demonstrou o grande potencial desta técnica. Segundo Sanseverino (2002), estes reatores apresentam algumas vantagens marcante sobre o forno doméstico de microondas, tais como: a possibilidade de realização de refluxo, controle de temperatura e pressão e outro fator muito importante é a distribuição homogênea desta ferramenta.

#### 4.1.5 Reações enzimáticas assistidas por microondas

No desenvolvimento de processos mais limpos e eficientes duas condições reacionais parecem bastante adequadas para as transformações químicas: reações enzimáticas em sistema isentos de solventes e reações aceleradas sob irradiação de microondas (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2006).

Trabalhos publicados sugerem a possibilidade do campo magnéticos de alta frequência influenciarem não apenas a velocidade inicial das reações, mas também a enantioselectividade das enzimas quando comparado com sistemas submetidos ao aquecimento convencional (GUPTA; ROY, 2004; YADAV et al 1998; LATHI, 2006). A Tabela 5 apresenta de forma resumida exemplos de diversas reações enzimáticas assistidas por microondas, com enfoque particular nos tipos de enzimas e substratos usados, bem como nos parâmetros de operação do equipamento gerador de microondas.

A irradiação de microondas altera a taxa das reações químicas. Os resultados têm destacado com frequência: rendimentos elevados, produtos purificados, maior eficiência e distribuição homogênea da energia e efeitos de aquecimento e facilidade na eliminação da água (SAXENA, et al 2005).

As diversas técnicas de aquecimento por microondas têm se expandido e com profundo impacto. Um dos casos é na aplicação em processos biológicos relevantes, assim como na síntese de peptídeos e oligopeptídeos. Incluem também nesta grande área, a aplicação de aquecimento por irradiação de microondas para síntese orgânicas catalisadas por enzimas. Muitos dos trabalhos têm sido focalizados no uso de lipases: pesquisadores revelam que as velocidades de reações e os rendimentos dos produtos obtidos nas reações de esterificação e transesterificação catalisadas por lipases são significativamente elevados quando irradiado por microondas. A estabilidade enzimática também é mais elevada em comparação ao aquecimento térmico convencional (LEADEATER; STENCEL; WOOD, 2007).

Tabela: 5 Reações enzimáticas assistidas por microondas

<b>Tipo de reação</b>	<b>Substrato</b>	<b>Enzima</b>	<b>Parâmetro utilizado (Potencia/temperatura)</b>	<b>Referências</b>
Hidrólise	Triolina	Lipase de <i>Aspergillus carneus</i>	175w/38-40°C	SAXENA et al 2005
Transesterificação	Óleo vegetal	Lipase de <i>Aspergillus carneus</i>	800 w/90 °C	SAXENA et al 2005
Esterificação	n-Acetil-L-fenilalanina e etanol	$\alpha$ -Quimotripsina	Condições não especificadas	ROY;GUPTA,2003
Transesterificação (solvente organico)	n-Acetil-L-fenilalanina etil ester e propanol	Subtilisina Carlsberg	Condições não especificadas	ROY;GUPTA,2003
Síntese	p-nitrofenil- $\beta$ -D-galatopiranosid e lactose	$\beta$ -galatosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i>	12 w/40 °C	MAUGARD et al 2003
Acilação (solvente organico)	a)1,2,3,4-tetrahydro-1-naftol e b)Mentol e ácido palmítico	Lipase de pancreas de porco (LPP)	700 w/25-35 °C	LIN; LIN, et al 1998
Interesterificação	Butanol etilbutirano	<i>Fusarium solani</i> curinase	2,45 Ghz/50 °C	PARKER et al 1996
Hidrólise	P-nitrofenil poliéster e carboidratos	celulose	750w/75° C	KABZA et al 1996
Transesterificação	Feniletanol	<i>Candidas antartica</i> -Novozymes e <i>Pseudomonas cepacia</i>	30-90w/70-100°CV	CARRILLO MUNOZ et al 1996

#### 4.1.6 Reatores de microondas

Reatores de microondas são comercializados atualmente por diversas empresas, como: Cem e Aton Par. A tabela 6 apresenta de forma resumida dados descritos na literatura referente à condução de reações enzimáticas usando reatores de microondas manufaturado comercialmente. No presente trabalho foi utilizado o reator de microondas Discover 100 SP operando numa frequência de 2.5 GHz e potencia máxima de 300w. A temperatura do meio reacional foi monitorada por um sensor de infravermelho e a temperatura foi medida instantaneamente após a irradiação de microondas utilizando um Termopar (figura 14).



Figura 14: Reator de Microondas Discover

**Fonte:** TICOM, 2003

Tabela 6: forma resumida de dados descritos na literatura referente à condução de reações enzimáticas usando reatores de microondas

Objetivo do estudo	Tipos de reatores	Condições de operação do reator	Referencias
Influencia das microondas na digestão da tripsina em diferentes solventes.	Reator monomodo comercial (CEM Focused microwave synthesis, model Discover, CEM Co)	O reator foi operado numa frequência de 2,5 GHz e uma potencia máxima de 300 W. A temperatura do meio reacional foi monitorada por um sensor de infravermelho e a temperatura era medida instantaneamente apos a irradiação de microondas utilizando um termopar.	LIN et al, 2005
Síntese enzimática do propileno glicol mono laurato a partir do 1,2-propanodiol e acido laurico	Microondas Discover CEM-SP1245, model CEM Corporation, EUA	Foi utilizado um frasco cilíndrico de vidro, com capacidade para 120 mL no interior da câmara de microondas, sob agitação mecânica realizada por uma turbina de 1,5 cm de diâmetro, resultando em uma agitação do meio reacional em 500rpm.	YADAV; LATHI, 2006
Determinar a estabilidade térmica da lipase imobilizada de <i>Cândida Antarctica</i> B em meio organico	Reator de microondas monomodo Synthewave S402 (Prolabo, França)	O reator operava numa potencia máxima de 300 W, e era dotado de agitação em diferentes velocidades, além de possuir um controle de temperatura por infravermelho	RÈJASSE et al, 2004
Verificar efeitos da alta pressão e irradiação das microondas na hidrólise da $\beta$ -lactoglobina pela quimiopsina e pronase	Reator de microondas monomodo (Prolabo, Fontenay Sousboes, França)	O frasco contendo o substrato foi pré-aquecido a 40 °C, e após adição das enzimas foi acondicionado em um recipiente de teflon e inserido no forno para irradiação de microondas. Na reação foi utilizado entre 5 a 10% da potencia nominal do aparelho (300W)	IZQUIERDO,2005

## 5 EMPREGO DE LIPASE NA OBTENÇÃO DE DERIVADOS DE ÁCIDOS GRAXOS E METOXICINÂMICO.

### 5.1 Introdução

O Biodiesel tem sido produzido a partir de uma variedade de fontes, incluindo óleos vegetais crus e refinados, gorduras animais, óleos e produtos e gorduras residuais (RAMOS, 2003). Já com relação ao álcool empregado na reação de transesterificação, somente os álcoois simples, tais como metanol, etanol, propanol, butanol e pentanol, têm sido usados na produção do biodiesel.

Os óleos vegetais são constituídos de triacilgliceróis, sendo estes compostos, formados por cadeias curtas ou longas de ácidos graxos, cujo grau de saturação, ou insaturação, é função do tipo de semente que originou o óleo. Óleos que possuem maior número de ácidos graxos saturados, como por exemplo, o óleo de babaçu (rico em ácidos láurico), apresenta-se em estado sólido à temperatura de 20-25°C; aqueles cujo teor de poli-insaturados é mais elevado, por exemplo, soja, algodão, amendoim (ricos em ácidos linoléico/oléico) apresentam-se em estado líquido a temperatura ambiente (ABOISSA ÓLEOS VEGETAIS, 2008). Os ácidos graxos são uma classe de compostos orgânicos que constituem os lipídeos, os quais são vitais na construção da membrana celular, estando presente na epiderme, o qual protege e faz parte da barreira da pele evitando a sua desidratação, por perda de água transepidermica. O ácido oleico é um ácido graxo essencial (ômega 9), o qual participa do nosso metabolismo, desempenhando um papel fundamental na síntese dos hormônios.

O coco de babaçu conhecido como baguaçu ou coco-de-macaco (*Orrbignya speciosa*), pertence à família botânica da Palma original do Brasil – Região Amazônica e Mata Atlântica da Bahia. Os frutos são ovais alongados, de coloração castanha, a polpa é farinácea e oleosa, envolvendo de 3 a 4 sementes oleaginosas (ABOISSA ÓLEOS VEGETAIS, 2008).

Considerando os 17 milhões de hectares de florestas onde predomina a palmeira do babaçu e as possibilidades de aproveitamento integral do coco, o babaçu constitui potencialmente, uma extraordinária matéria-prima para a obtenção de produtos com altos teores de matérias graxas, ou seja, gordura de aplicação alimentícia ou industrial.

Constituindo cerca de 65% do peso da amêndoa, este óleo é utilizado para fabricação de sabão, glicerina, óleo comestível, entre outros. O óleo de coco babaçu refinado é um

produto largamente utilizado na produção de cosméticos, tais como, cremes faciais, creme para o corpo, creme para os lábios, cremes reparadores de cabelos secos.

Apesar desta potencialidade, medida pela dimensão de ocorrência e valor econômico das várias aplicações já testadas, a exploração do coco de babaçu é ainda realizada em grande parte do nordeste de forma muito artesanal (PARENTE, 2008).

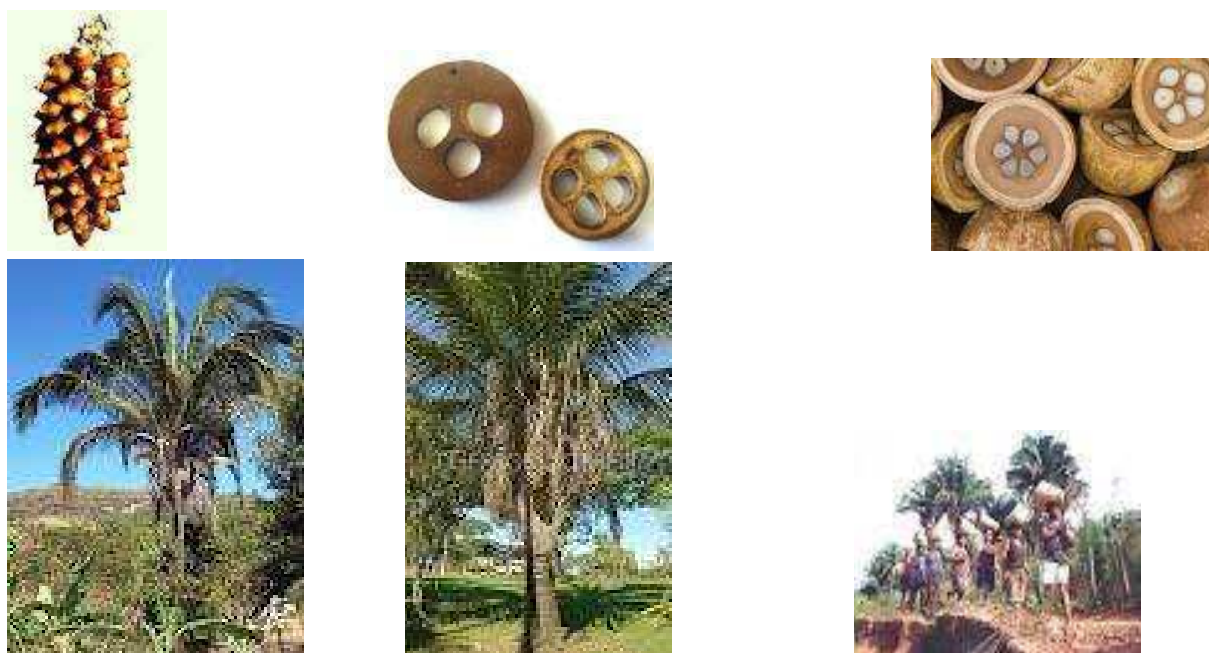
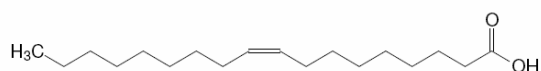


Figura 14: Quadro de figuras da palmeira e do coco de babaçu



**Figura 15:** ácido oléico

Dentre os ácidos graxos ou triglicerídeos líquidos, o ácido oléico é um dos ácidos graxos insaturados mais comuns, possuindo cadeia de 18 carbonos na sua estrutura. O ácido oléico, quando purificado e bi-destilado, apresenta-se na forma líquida na temperatura ambiente, sendo um líquido de cor incolor a levemente amarelado. O ácido oléico se solidifica com o abaixamento da temperatura, sendo que se torna sólido na temperatura de 14° - 16° C . Por



possuir uma cadeia grande lipofílica, o ácido oléico é insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos e óleos vegetais. Quando exposto ao ar ou ao calor se torna amarelo e rançoso, como em gorduras animais. No óleo de oliva (azeite) a sua concentração chega ser acima de 70%. Também está presente em alta concentração no óleo de sementes de uva, óleo de canola, óleo de gergelim, óleo de girassol, óleo de soja, óleo de palma e em animais marinhos, como o tubarão e bacalhau. (PATOCKA,2003; MAHATO, 1994).

O ácido oléico é obtido a partir da hidrólise da gordura animal e de certos óleos vegetais (óleo de oliva, palma, uva, etc) onde, após a separação da glicerina, ele é submetido a uma destilação sob alto vácuo e separados por cristalização fracionada da estearina, através do abaixamento da temperatura. Para se obter uma oleína altamente pura ela deve ser bidestilada e fracionada até se chegar na concentração acima de 95%.

O ácido oléico é muito utilizado como aditivo em base de sabões e sabonetes, para dar lubricidade e emoliência. O ácido oléico é um ácido graxo essencial, ômega 9, o qual participa do nosso metabolismo, desempenhando um papel fundamental na síntese dos hormônios. O ácido oléico é muito utilizado como aditivo em base de sabões e sabonetes, para dar lubricidade e emoliência. É muito empregado em cremes e emulsões cosméticas pelas suas propriedades emolientes e para recompor a oleosidade em peles ressecadas e com problemas de escamação. É usado em bronzeadores e produtos solares e pós-solares devido a sua capacidade de proteção e regeneração da pele dos danos e queimaduras causados pelos raios solares.

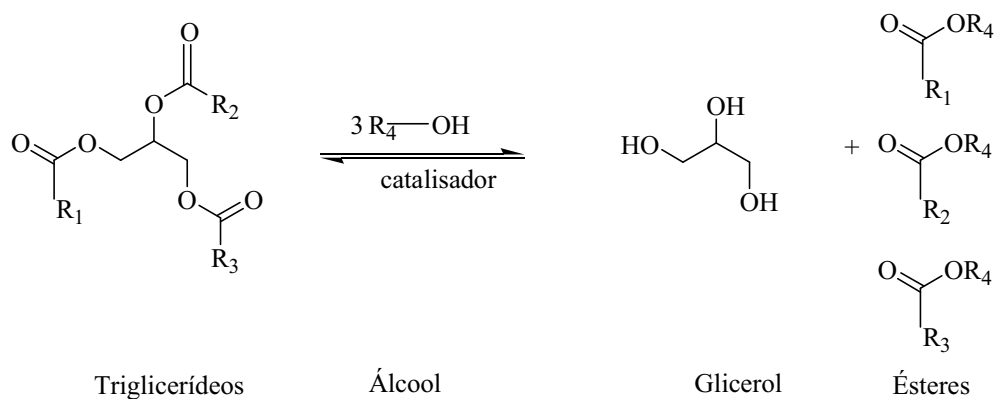
Deste modo, o objetivo do presente trabalho é analisar a composição de ácidos graxos do óleo de babaçu e posteriormente verificar o potencial para obtenção de derivados esterificados (metilados e etilados) do ácido oleico e ácido metoxicinâmico empregando-se lipase imobilizada.

## **5.2 Parte experimental**

### **Transesterificação**

A reação de transesterificação de óleos vegetais consiste em reagir um lipídeo (conhecidos como triacilglicerídeos ou triglicerídeos) com um mono-álcool de cadeia curta (metílico ou etílico), na presença de um catalisador (base ou ácido de Brønsted), resultando na produção de uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos (denominado de biodiesel)

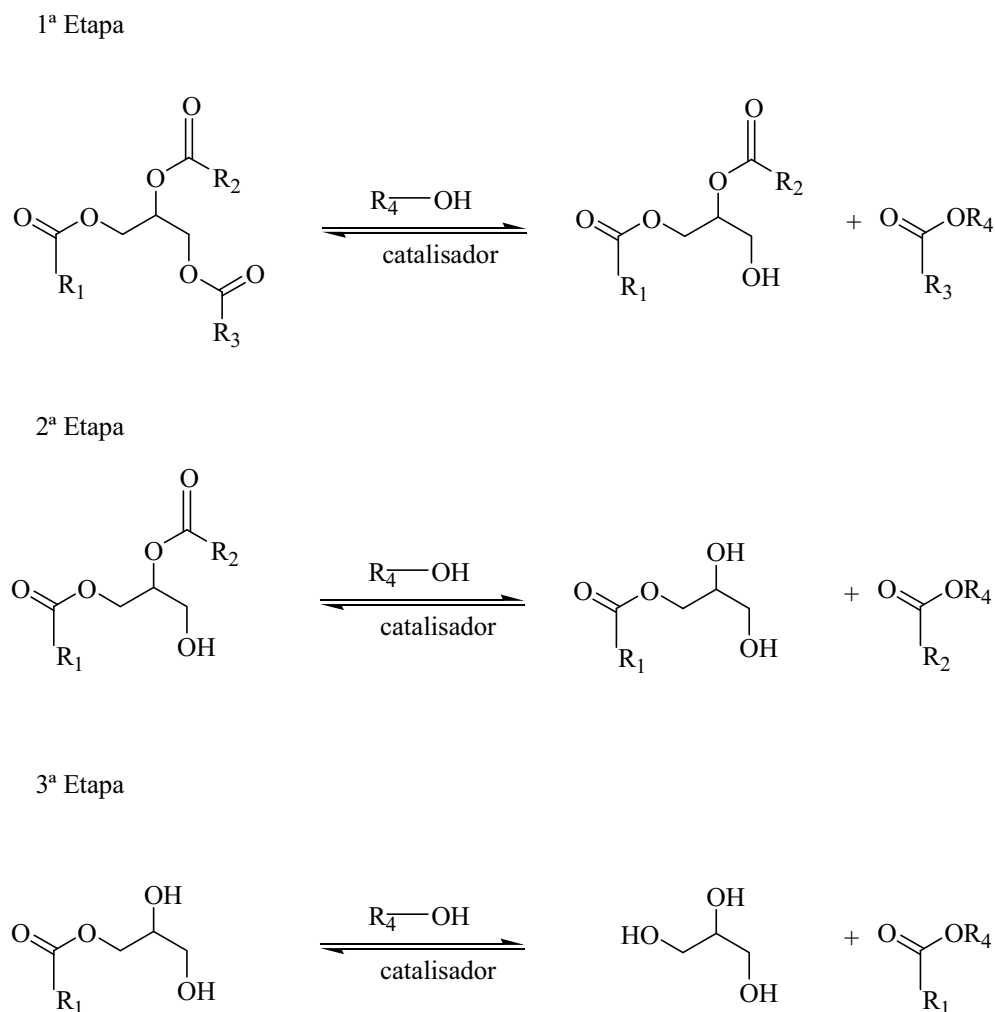
e glicerol (CANDEIA, 2008). A equação geral da reação de transesterificação é representada na Figura 1.



**Figura 16.** Transesterificação de triacilgliceróis (triglicerídeos)

Essa reação acontece em três etapas consecutivas e reversíveis, nas quais são formados diglicerídeos e monoglicerídeos como intermediários (SUAREZ, 2007). Inicialmente, a molécula de triacilglicerídeo é convertida em diglicerídeo, depois em monoglicerídeo e, finalmente, em glicerol, produzindo um mol de éster a cada etapa reacional e liberando a glicerina como co-produto (CANDEIA, 2008). O mecanismo reacional das três etapas está registrado na Figura 2.

Por questões econômicas e tecnológicas, a maioria das reações de transesterificação é realizada em meio básico. O álcool mais utilizado é o metanol, por conta das facilidades cinéticas que proporciona à reação (LIMA, 2007).



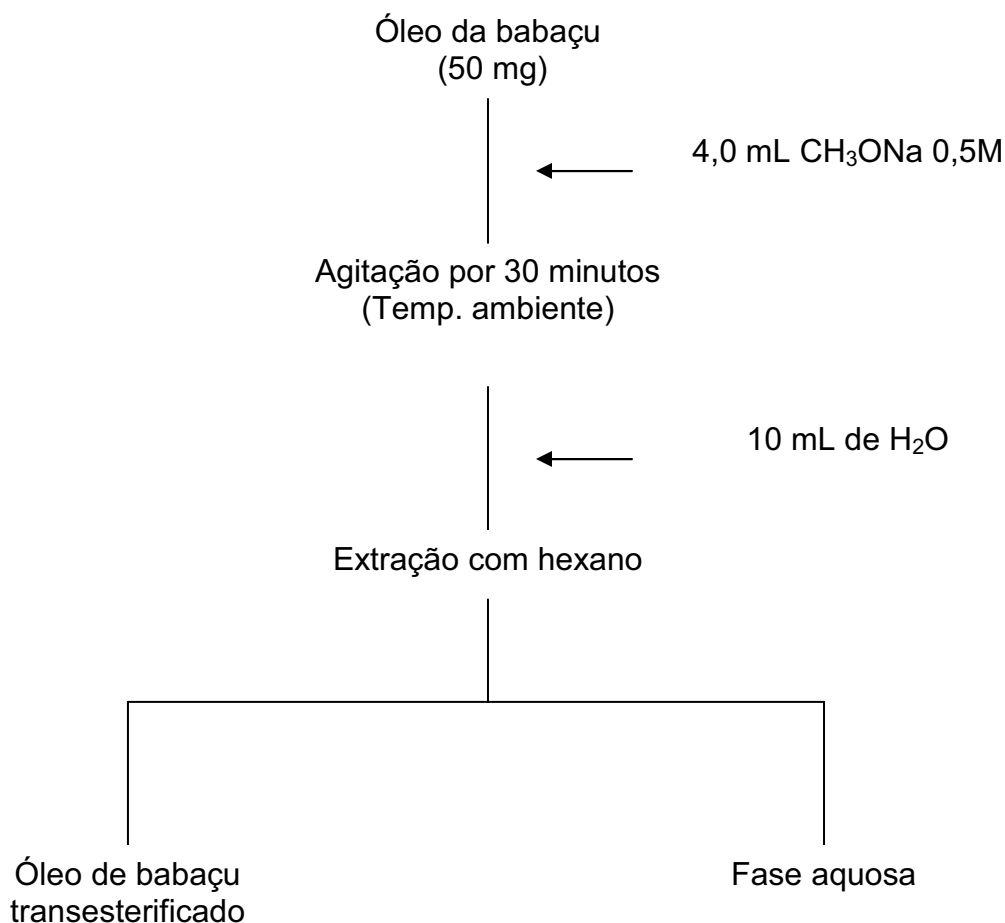
**Figura 17.** Mecanismo das três etapas da Reação de Transesterificação.

### 5.3 Obtenção do biodiesel de babaçu

As amostras do biodiesel metílico foram obtidas através da reação de transesterificação. Neste trabalho optou-se em realizar essa reação em meio básico. O procedimento adotado encontra-se registrado no item 2.1.

#### 5.3.1 Reação de transesterificação

O procedimento empregado na obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos presentes no óleo do coco babaçu consistiu no tratamento de 50 mg da amostra do óleo de babaçu com solução de metóxido de sódio (0,5 M) em metanol (4,0 mL). O isolamento dos ésteres metílicos foi realizado após adição de água destilada à mistura reacional, seguido de extração líquido-líquido com hexano (CORREIA, 2005). O fluxograma desse procedimento encontra-se ilustrado na Figura 18.



**Figura 18.** Fluxograma de obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos presentes no óleo de babaçu

### 5.3.2 Determinação da composição em ácidos graxos do óleo de coco babaçu

Após derivatização dos triglicerídeos presentes no óleo de babaçu por meio da reação de transesterificação e obtenção dos ésteres metílicos correspondentes, estes foram submetidos à análise por cromatografia em fase gasosa. A determinação dos ésteres metílicos derivados de ácidos graxos deu-se através da injeção de 1  $\mu$ L da amostra no cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) da Shimadzu modelo QP2010, equipado com coluna Rtx®-1 MS (Crossbond® 100% dimetil polisiloxano) de 30 m de comprimento, com 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu$ m de espessura do filme. As análises foram realizadas em triplicata.

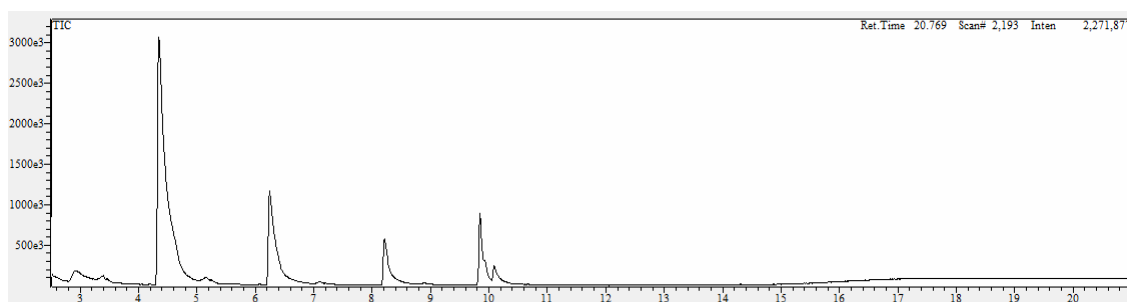
As condições cromatográficas foram as seguintes:

- ❖ Volume Injetado: 1,0  $\mu$ L
- ❖ Temperatura do injetor: 290°C
- ❖ Gás de Arraste: Hélio
- ❖ Fluxo da Coluna: 0,8 mL/min
- ❖ Programação da Temperatura do Forno: 150°C/1 min; de 150 a 240°C (10°C/min<sup>-1</sup>) e 240°C por 2 min; de 240 a 300°C (15°C/min<sup>-1</sup>) e 300°C por 5 min;
- ❖ Temperatura do Detector: 300°C

Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro de massas operando na forma *scan*; voltagem do filamento de 70 e V; voltagem do detector de 1,3 KV; analisador do tipo quadrupolo. Os ésteres metílicos foram identificados através de comparação com os espectros de massas das bibliotecas NIST 147 e WILEY 8.

### 5.3.3 Análises cromatográficas

No cromatograma obtido (Figura 19) foram registrados seis picos com diferentes tempos de retenção. Cada um deles originou um espectro de massas cujos respectivos íons moleculares em  $m/z$  186,  $m/z$  214,  $m/z$  242,  $m/z$  270,  $m/z$  296 e  $m/z$  298 são correspondentes ao decanoato de metila, dodecanoato de metila, tetradecanoato de metila, hexadecanoato de metila, 9 (Z)-octadecenoato de metila e ao octadecanoato de metila respectivamente.



**Figura 19.** Cromatograma do óleo de babaçu

Estes resultados permitem sugerir que a maioria dos compostos presentes no óleo de babaçu transesterificado, encontram-se esterificados com os seguintes ácidos graxos: ácido cáprico (ácido decanóico), ácido láurico (ácido tetradecanóico), ácido mirístico (ácido tetradecanóico), ácido palmítico (ácido hexadecanóico), ácido oléico (ácido 9-octadecenóico) e ácido esteárico (ácido octadecanóico) (Tabela 7).

Vale ressaltar que a identificação dos ésteres metílicos foi realizada através da comparação dos espectros de massas obtidos com os das bibliotecas NIST 147 e WILEY 8 com similaridade maior que 90% para todos os compostos. Assim, admite-se que a provável composição dos triglicerídeos presentes no óleo de babaçu sejam da mistura destes ésteres. Sendo que, o óleo de babaçu apresentou como componente majoritário o ácido láurico ( $58,80 \pm 0,39 \%$ ).

**Tabela 7.** Composição química do óleo de babaçu

<b>Ácido graxo</b>	<b>Tempo de retenção</b>	<b>% <math>\pm</math> DP</b>
Cáprico, 10:0	2,925	$2,67 \pm 0,26$
Láurico, 12:0	4,350	$58,80 \pm 0,39$
Mirístico, 14:0	6,242	$19,49 \pm 0,96$
Palmítico, 16:0	8,208	$7,77 \pm 0,08$
Oléico, 18:1 (9c)	9,850	$9,00 \pm 0,92$
Esteárico, 18:0	10,092	$2,25 \pm 0,22$

DP: desvio padrão

#### **5.4 Obtenção do biodiesel do azeite de oliva (rota etílica)**

As amostras do biodiesel etílico foram obtidas através da reação de transesterificação. Neste trabalho optou-se em realizar essa reação em meio básico. O procedimento é idêntico ao fluxograma da figura 18, mudando a rota metílica para etílica.

##### **5.4.1 Reação de transesterificação**

O procedimento empregado na obtenção dos ésteres etílicos de ácidos graxos presentes no azeite de oliva consistiu no tratamento de 10 mL da amostra com solução de KOH (0,5 M) em etanol (35 mL). Após a reação de transesterificação, o biodiesel foi transferido para um funil de separação, para que ocorresse a disjunção do biodiesel bruto da fase glicerínica. A mistura repousou por um período de 24-48 horas, garantindo assim, a separação total das fases.

Como a fase glicerínica é mais densa que o óleo a verificação da sua presença é notória a olho nu.

O isolamento dos ésteres etílicos foi realizado após adição de água destilada à mistura reacional, seguido de extração líquido-líquido com hexano.

#### **5.4.2 Determinação da composição em ácidos graxos do azeite de oliva**

Após derivatização dos triglicerídeos presentes no azeite de oliva por meio da reação de transesterificação e obtenção dos ésteres etílicos correspondentes, estes foram submetidos a análise por cromatografia em fase gasosa. A determinação dos ésteres etílicos derivados de ácidos graxos deu-se através da injeção de 1  $\mu\text{L}$  da amostra no cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) da Shimadzu modelo QP2010, equipado com coluna Rtx®-1 MS (Crossbond® 100% dimetil polisiloxano) de 30 m de comprimento, com 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura do filme. As análises foram realizadas em triplicata.

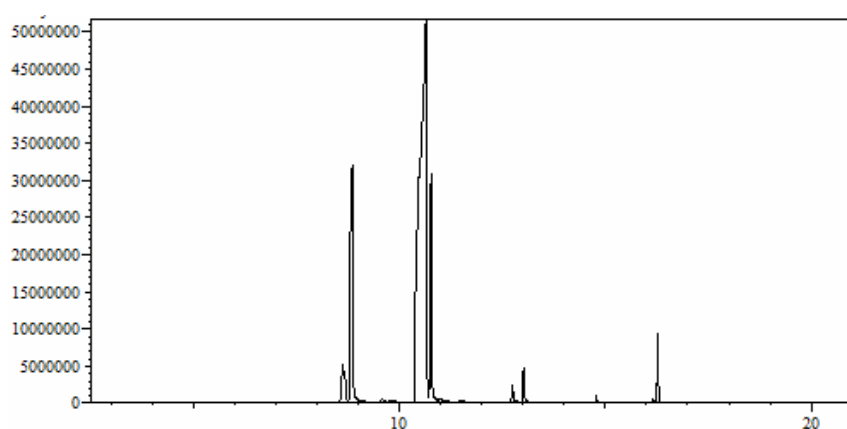
As condições cromatográficas foram as seguintes:

- ❖ Volume Injetado: 1,0  $\mu\text{L}$
- ❖ Temperatura do injetor: 290°C
- ❖ Gás de Arraste: Hélio
- ❖ Fluxo da Coluna: 0,8 mL/min
- ❖ Programação da Temperatura do Forno: 150°C/1 min; de 150 a 240°C (10°C/min<sup>-1</sup>) e 240°C por 2 min; de 240 a 300°C (15°C/min<sup>-1</sup>) e 300°C por 5 min;
- ❖ Temperatura do Detector: 300°C

Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro de massas operando na forma *scan*; voltagem do filamento de 70 eV; voltagem do detector de 1,3 KV; analisador do tipo quadrupolo. Os ésteres etílicos foram identificados através de comparação com os espectros de massas das bibliotecas NIST 147 e WILEY 8.

### 5.4.3 Análise cromatográfica

No cromatograma obtido (Figura 1) foram registrados seis picos com diferentes tempos de retenção. Cada um deles originou um espectro de massas cujos respectivos íons moleculares em  $m/z$  282,  $m/z$  284,  $m/z$  310,  $m/z$  312,  $m/z$  340 e  $m/z$  368 são correspondentes ao 9-hexadecenoato de etila, hexadecanoato de etila, 9-octadecenoato de etila, octadecanoato de etila, icosanoato de etila e ao docosanoato de etila respectivamente.



**Figura 20.** Cromatograma do azeite de oliva

Estes resultados sugerem que a maioria dos compostos presentes no azeite de oliva transesterificado, encontram-se esterificados com os seguintes ácidos graxos: ácido 9-hexadecenóico, ácido hexadecanóico, ácido 9-octadecenóico, ácido octadecanóico, ácido icosanóico e ácido docosanóico (Tabela 8).

A identificação dos ésteres etílicos foi realizada através da comparação dos espectros de massas obtidos com os das bibliotecas NIST 147 e WILEY 8 com similaridade maior que 90% para todos os compostos. Assim, admite-se que a provável composição dos triglicerídeos presentes no azeite de oliva sejam da mistura destes ésteres etílicos. Sendo que, o azeite de oliva apresentou como componente majoritário o ácido 9-octadecenóico ( $70,26 \pm 0,69$  %).



**Tabela 8.** Composição química do azeite de oliva

<b>Ácido graxo</b>	<b>Tempo de retenção</b>	<b>% ± DP</b>
Ácido 9-hexadecenóico	8,618	2,85 ± 0,27
Ácido hexadecanóico	8,858	16,54 ± 0,27
Ácido 9-octadecenóico	10,640	70,26 ± 0,69
Ácido octadecanóico	10,880	8,76 ± 0,11
Ácido icosanóico	13,005	1,45 ± 0,08
Ácido docosanóico	14,771	0,51 ± 0,01

DP: desvio padrão

## 5.5. Conclusões

No estudo do perfil de ácidos graxos presentes no óleo de babaçu, foi verificado a presença dos seguintes ácidos graxos: ácido cáprico (ácido decanóico), ácido láurico (ácido tetradecanóico), ácido mirístico (ácido tetradecanóico), ácido palmítico (ácido hexadecanóico), ácido oléico (ácido 9-octadecenóico) e ácido esteárico (ácido octadecanóico). Sendo que, o componente majoritário foi o ácido láurico ( $58,80 \pm 0,39$  %).

No estudo do perfil de ácidos graxos presentes na amostra do azeite de oliva, foi verificado a presença dos seguintes ácidos graxos: ácido 9-hexadecenóico, ácido hexadecanóico, ácido 9-octadecenóico, ácido octadecanóico, ácido icosanóico e ácido docosanóico. Sendo que, o componente majoritário foi o ácido 9-octadecenóico ( $70,26 \pm 0,69$  %).

## 6 REAÇÕES ENZIMÁTICAS

### 6.1 Obtenção dos derivados de ácido 2-metoxicinâmico e oléico utilizando lipases

#### 6.1.1 Fonte de lipase

Os experimentos foram realizados com preparação comercial de lipase Novozyme 435 que é uma lipase produzida por fermentação submersa de um microorganismos *Aspergillus niger* geneticamente modificado e suportada sobre resina acrílica macroporosa numa concentração de 3% massa/massa, consistem de partículas com diâmetro na escala de 0,3-0,9 mm, densidade aproximada de 430 kg/m<sup>3</sup> contendo 1-2% de água massa/massa

A lipase é termoestável e particularmente usada na síntese de ésteres e amidas. Novozyme 435 tem sido empregada na resolução de uma grande escala de álcoois primários e secundários, bem como de ácidos carboxílicos. Nos parâmetros de reação a enzima tem atividade máxima na faixa de 70-80 °C, mas a melhor estabilidade térmica encontra-se na

faixa de 40-60 °C. Quanto ao risco que a enzima apresenta, ela é nociva à pele, olhos e mucosas quando em contato prolongado e neste caso deve-se lavar a região com água por um longo período.

## 6.2 Substratos e Reagentes

Como substratos na síntese dos ésteres foram utilizados: Etanol absoluto PA; ácido 2-metóxicinâmico (Fluka AG), ácido oléico (Riedel). Outros reagentes utilizados foram: ácido sulfúrico PA (Merck), hexano PA (Qhemis), acetona HPLC (Tedia), sulfato de sódio PA (Merck), Acetato de etila PA (Qhemis).

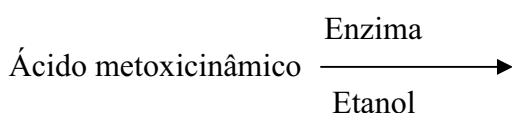
## 6.3 Equipamentos

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9: Tipos de análises e equipamentos utilizados nos ensaios.

Tipo de análise ou ensaio	Equipamento	Modelo/fabricante
Dosagem de ésteres etílicos	Cromatógrafo a gás	Modelo CG Caros 500 PerinElmer.
Pesagem dos materiais	Balança analítica	Analítica
Agitação de reações	Placa de agitação magnética com temperatura controlada	IKA <sup>®</sup> C-MAG HS 7
Remoção do solvente	Rota evaporador	IKA <sup>®</sup> RV10
Reações utilizando campo magnético	Reator de micro-ondas	DISCOVER CEM SP

## 6.4 Reação de esterificação enzimática do ácido 2- metoxinâmico e etanol sob aquecimento convencional

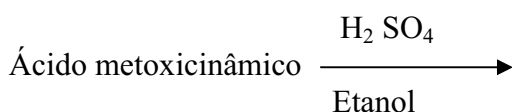


## Reação 1

Reagentes	M. Molar	Massa	volume
Ácido metoxicinâmico	178,79	100 mg	
Etanol	46	-	10 mL
Enzima		20 mg	

As reações de esterificação enzimática do ácido 2- metoxicinâmico foram realizadas em reatores de vidro ( 50 mL) hermeticamente fechados, em banho-maria, utilizando-se agitação magnética (170 rpm) na temperatura de 45° C. As reações foram incubadas com lipase (Novozyme 435), numa proporção fixa de 20% (m/m) em relação à massa total de reagentes e conduzidas por um período de máximo de 72 horas de monitoradas pela retiradas alíquotas do meio reacional para identificação dos ésteres formados por CCDC, usando como sistema hexano:acetato de etila, na proporção de 8:2.

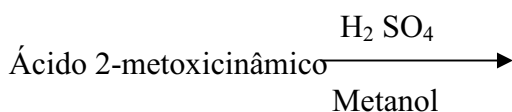
## Reação 2



Reagentes	M. Molar	Massa	volume
Ácido metoxicinâmico	178,79	100 mg	
Etanol	46	-	10 mL
Ácido sulfúrico		-	0,2 mL

As reações de esterificação ácida do ácido metoxicinâmico foram realizadas em reatores de vidro (10 mL) hermeticamente fechados, em banho-maria, utilizando-se agitação magnética (170 rpm) na temperatura de 40° C. As reações foram incubadas com 0,2 mL de ácido sulfúrico. As reações foram conduzidas por um período de máximo de 72 horas e transferida para o rota evaporador para remoção do solvente e feita a partição com acetato de etila e água. O 2-metoxicinamato de etila, ficou retido na fase do acetato. Foi escoada a fase aquosa e a fase de acetato foi levada à capela para secagem. Foi retirada alíquota do meio reacional para identificação dos ésteres formados (URIESTE, 2008) por CCDC, usando como sistema hexano:acetato de etila, na proporção de 8:2, comparando com o padrão (ácido 2-metoxicinâmico).

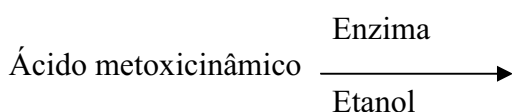
## REAÇÃO 3



Reagentes	M. Molar	Massa	volume
Ácido metoxicinâmico	178,79	100 mg	
Metanol	32,04	-	10 mL
Ácido sulfúrico		-	0,2 mLgt

As reações de esterificação ácida do ácido metoxicinâmico foram realizadas em reatores de vidro (10 mL) hermeticamente fechados, em banho-maria, utilizando-se agitação magnética (170 rpm) na temperatura de 40° C. As reações foram incubadas com 0,2mL de ácido sulfúrico e conduzidas por um período de máximo de 72 horas, levadas a rota evaporador para diminuir o volume e feita a partição com acetato de etila e água. O 2-metoxicinamato de metila ficou na fase do acetato. Foi escoada a fase aquosa e a fase de acetato foi levada à capela para secagem. Foi retirada alíquota do meio reacional para identificação dos ésteres formados (URIOSTE, 2008) por CCDC, usando como sistema hexano:acetato de etila, na proporção de 8:2.

## Reação 4

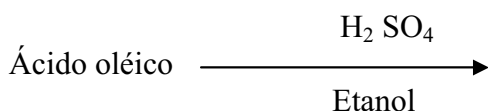


Reagentes	M. Molar	Massa	volume
Ácido metoxicinâmico	178,79	100 mg	
Metanol	46	-	10 mL
Enzima		20 mg	

As reações de esterificação enzimática do ácido metoxicinâmico foram realizadas em reatores de vidro (10 mL) hermeticamente fechados, em banho-maria, utilizando-se agitação magnética (170 rpm) na temperatura de 45° C e razão molar (ácido metoxicinâmico/metanol). Os reagentes foram incubados com lipase numa proporção fixa de 20% (m/m) em relação à massa total de reagentes e foram mantidas por um período de

máximo de 72 horas de monitoradas pela retiradas alíquotas do meio reacional para identificação dos ésteres formados por CCDC, usando como sistema hexano:acetato de etila, na proporção de 8:2.

#### 6.5 Reação padrão do ácido oléico

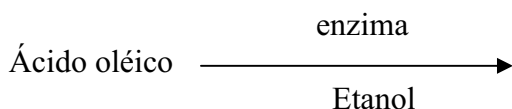


#### Reação do ácido oléico

Reagentes	M. Molar	Massa	volume
Ácido oléico	282,47		5 mL
Etanol	46	-	20 mL
Ácido sulfúrico		-	0,2 mL

O processo de esterificação ácida do ácido oléico foram realizadas em reatores de vidro (10 mL) hermeticamente fechados, em banho-maria, utilizando-se agitação magnética (170 rpm) na temperatura de 40° C. As reações foram incubadas com 0,2 mL de ácido sulfúrico e conduzidas por um período de máximo de 72 horas, levadas a rota evaporador para diminuir o volume e feita a partição com acetato de etila e água. O oleato de etila, ficou na fase do acetato. Foi escoada a fase aquosa e a fase de acetato foi lavada com água adicionada de sulfato de sódio para tirar a turvação, filtrou-se em papel de filtro, e levou-se à capela para secagem. Foi retirada alíquota do meio reacional para identificação dos ésteres formados por CCDC, usando como sistema hexano:acetato de etila, na proporção de 8:2.

#### Reação enzimática do ácido oléico



Reagentes	M. Molar	Massa	volume
Ácido oléico	282,47		5 mL
Etanol	46	-	20 mL
Enzima		20 mg	

Os procedimentos de esterificação do ácido oléico foram realizadas em reatores de vidro (10 mL) hermeticamente fechados, em banho-maria, utilizando-se agitação magnética (170 rpm) na temperatura de 40° C. As reações foram incubadas com 20 mg de enzima e conduzidas por um período de máximo de 72 horas, levadas a rotaevaporador para diminuir o volume e feita a partição com acetato de etila e água. O oleato de etila, ficou na fase do acetato. Foi escoada a fase aquosa e a fase de acetato foi lavada com água adicionada de sulfato de sódio para tirar a turvação, filtrou-se em papel de filtro, e levou-se à capela para secagem. Foi retirada alíquota do meio reacional para identificação dos ésteres formados (URIOSTE, 2008) por CCDC, usando como sistema hexano:acetato de etila, na proporção de 8:2.

#### 6.6 Reação de esterificação enzimática de ácido oléico e etanol sob irradiação de microondas (reator Discover).

A otimização das condições reacionais da reação de esterificação do ácido oléico visando à obtenção de ésteres de etila foi efetuada, considerando como variáveis independentes: razão molar (ácido-etanol) e temperatura. As sínteses foram realizadas no reator de microondas Discover. Um reator de vidro esférico (20 mL), contendo o ácido oléico e etanol numa razão molar adequada para o experimento correspondente, foi inserido na câmara de microondas do reator, sendo irradiada determinada potência de microondas para manter a temperatura adequada do meio reacional praticamente constante durante todo o experimento (Figura 14). As misturas foram incubadas com lipase Novozyme 435 e conduzidas por um período máximo de 30 minutos, com agitação magnética no nível alto para todos os experimentos. O progresso da síntese foi acompanhado pela retiradas de alíquotas, ao longo da reação, para quantificação da formação de ésteres de etila por cromatografia de fase gasosa.

Reações enzimáticas do ácido oléico e etanol sob irradiação de microondas, foram realizadas, variando a temperatura, conforme as tabelas abaixo:

Reação A						
Ácido Oléico	Etanol	Enzima	Tempo	Potencia	Temperatura	Agitação
2 mL	5 mL	10 mg	30 min	300 w	55°C	máxima

## Reação B

Ácido Oléico	Etanol	Enzima	Tempo	Potencia	Temperatura	Agitação
2 mL	5 mL	10 mg	30 min	300 w	50°C	máxima

## Reação C

Ácido Oléico	Etanol	Enzima	Tempo	Potencia	Temperatura	Agitação
2 mL	5 mL	10 mg	30 min	300 w	45°C	máxima

## Reação D

Ácido Oléico	Etanol	Enzima	Tempo	Potencia	Temperatura	Agitação
2 mL	5 mL	10 mg	30 min	300 w	40°C	máxima

## Reação E

Ácido Oléico	Etanol	Enzima	Tempo	Potencia	Temperatura	Agitação
2 mL	5 mL	10 mg	30 min	300 w	35°C	máxima

Na determinação dos ésteres formados foi utilizado um Cromatógrafo a gás Claros 500 PerkinElmer equipado com coluna Elite-5 (5% de dimetil e 95% de difenilsiloxano), comprimento de 30 m, diâmetro interno de 0,25 mm, espessura do filme igual a 0,25 $\mu$ m e nitrogênio como gás de arraste. O programa de temperatura foi 150°C/1min, 150 a 240°C (10°C/min) e 240°C por 2min; de 240 a 300°C (15°C/min e 300°C por 5 min.; detector de ionização em chama (FID), temperatura do detector foi fixada em 230°C; o fluxo de gás de 1 mL/min; temperatura do injetor igual 250°C e volume injetado: 1 $\mu$ L.

Fixando-se a concentração em 1 mg/mL (em n-hexano) como concentração das amostras, pôde-se fazer uma relação direta entre as áreas do pico em 9,5 min (correspondente ao oleanato de etila) das amostras provenientes da catálise enzimática, com e sem ação de micro-ondas, com a área do oleanato obtido do modo convencional (esterificação catalisada por ácido sulfúrico). Os rendimentos foram calculados tomando como referência a catálise com o referido ácido inorgânico.

## 6.7 Resultados e discussão

Para se identificar os picos correspondentes ao ácido oleico e ao oleanato de etila, foram injetadas alíquotas do referido ácido e do ácido esterificado com etanol, respectivamente. Os cromatogramas mostraram que o oleanato de etila elui em 9,5 min e o ácido oleico em 11,5 min (FIGURA 21). Essa ordem de tempo de retenção está de acordo com o previsto pelas volatilidades relativas de ácidos carboxílicos e seus ésteres análogos. Os outros picos que aparecem no cromatograma são referentes a ésteres etílicos dos ácidos graxos residuais do ácido oléico empregado.

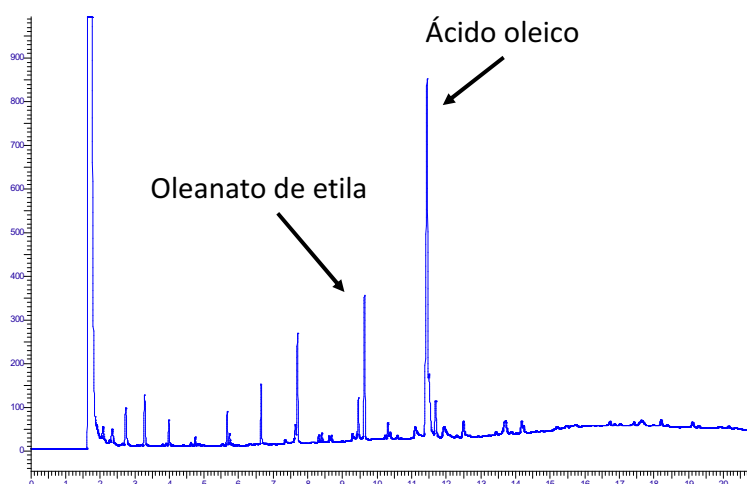


Figura 21: Cromatograma do ácido oleico esterificado sob catálise enzimática

A esterificação utilizando-se a enzima como catalisador, sem ação de micro-ondas, mostrou rendimento de 95,9%.

No entanto, sob ação de micro-ondas, as análises cromatográficas mostraram que a 55 e 50°C não houve formação do éster desejado. Entretanto, o pico referente ao ácido oléico em 11,5 min também não aparece nos cromatogramas, indicando que o mesmo foi consumido em algum processo mais favorecido que a sua esterificação.

A reação a 45°C, no micro-ondas, parece ser a melhor temperatura sob efeito das micro-ondas, uma vez que o rendimento alcança 32,4%. As temperaturas inferiores a 40°C não mostram mais o pico referente ao oleanato de etila, mas indicam a presença de ácido oleico, mostrando que não ocorreram transformações químicas mensuráveis. Apesar do rendimento, utilizando a enzima, ser menor que o rendimento da esterificação convencional, o tempo utilizando no microondas foi de 30 min enquanto que na esterificação convencional foram de 72 horas.



## 7 REFERÊNCIAS

### REFERÊNCIAS

ABLIZ, P. L.; CONG, Y.; MUSA, M.; ZHU, Y.; KASIMU, R. Chemical composition of the essential oil of *Hyssopus cuspidatus* from Xinjiang, China, **Chem. Nat. Comp.**, v.45 p. 445, 2009.

ABOISSA ÓLEOS VEGETAIS. Disponível em: [www.aboissa.com.br](http://www.aboissa.com.br). acesso em 10 jan. 2012.

ADER, U. ; ANDERSCH, P. ; BERGER, M. ; GOERGENS, U. ; HAASE, B. ; HERMANN, J. ; LAUMEN, K. ; SEEMAYER, R. ; WALDINGER, C. & SCHNEIDER, M. P. “Screening techniques for lipase catalyst selection”. **Meth. Enzymol.** v. 286, p.351, 1997.

AIRES-BARROS, M. R.; Biocatálise em solventes orgânicos. **B. Biotecnol.**, Lisboa, n.72, 2002.

AL SAADI, A. N.; JEFFREYS, G. V. Esterification of butanol in a two phase liquid-liquid system. **Aiche Journal**, v. 27, 1981.

AL-MAYMAN, S. I.; AL-ZAHRANI, S. M. Catalytic cracking of gas oils in electromagnetic fields: reactor design and performance, *Fuel Processing Technology*, 80, p. 169, 2003.

ALTUN, M. L.; SALTAN, C.G.; SEVER, Y. B.; OZBEK, H. **Pharm. Biol.**, v. 47, p. 653, 2009.

ANVISA: Dispõe sobre o registro de medicamento fitoterápico. Resolução **RDC nº48**, de 16 de março de 2004.

ARAYA, J. J.; KINDSCHER, K.; TIMMERMANN, B. N.. Cytotoxic cardiac glycosides and other compounds from *Asclepias syriaca*. **J. Nat. Prod.**, v. 75, p. 400, 2012.

BALCÃO, V. M., PAIVA, A. L & MALCATA, F. X. “Bioreactors with immobilized lipases: State of the art”. **J. Enzyme Microb. Technol.**, v..18, p. 392, 1996.

BARBOZA, A. C. R. N.; CRUZ, C. V. M. S.; GRAZIANI, M.,B. & LORENZETTI, M. C. F. Aquecimento em forno de micro-ondas / desenvolvimento de alguns conceitos fundamentais. **Quím. Nova**, v.24, p. 901, 2001.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, v. 29, 2006.

**BCC RESEARCH**. Disponível em<<http://www.bccresearch.com/report/BIO030E.html>>  
Acesso em 25 fev. 2010.

BORMAN, S.; Improving Efficiency: to eliminate R&D bottlenecks, drug companies are evaluating all phases of phases of Discovery and development and are using novel approaches to speed them up. **Chem. & Eng. News.**, v. 84, p. 56, 2006.

BOSSI, L. K. F. Aplicação da lipase de *Rhizopus oryzae* na síntese de ésteres com propriedades de aromas, derivados do ácido butírico – Blumenau, Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Química, Universidade Regional de Blumenau, . 2004.

BOUDET, A. M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, v. 68, p. 22, 2007.

BRIAN, S.T.; CROCKETT, S.; BEDIR, E.; KHAN, I. A. The role of chemical fingerprinting: application to Ephedra, **Phytochemistry**, v. 67, p. 911, 2003.

CALIXTO, J. B.; Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência & cultura**, v. 55, p. 36, 2003.

CANAES, L. S.; FILHO, F. O. Determinação turbidimétrica de metilbrometo de hemotropina em formulações farmacêuticas empregando um sistema de análise por injeção em fluxo. **Quím. Nova**, v. 29, p. 1237, 2006.

CANDEIA, R. A. Biodiesel de soja: síntese, degradação e misturas binárias. p.132 Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

CAPASSO, R.; ANGELO A. I; LUISA Pintob,; Teresa. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v.71, p. S58, 2000.

CARRILLO-MUNOZ, J. R.; BOUVET, D.; GUIDE-JAMPEL, E.; LOUPY, A.; PETIT, A.; Microwave-promoted lipase-catalyzed reactions: Resolution of (+)-1-phneylethanol. **J. Org. Chem.**, v.61, p. 774, 1996.

CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, Brasil: Tecmed Editora,2004.

CASTILHO, P.; LIU, K.; RODRIGUES, A.I.; FEIO, S.; TOMI, F.; CASANOVA, J. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Clinopodium ascendens* (Jordan) Sampaio from Madeira, **Flavour and Fragrance Journal**, v.22, p. 139, 2006.

CASTRO, H. F. DE; ANDERSON, Fine Chemicals by Biotransformation Using Lipases. **Quím. nova**, v. 18, 1995.

CHATTERJEE, A.; PAKRASHI, S. C. The treatise on indian medicinal plants. v. III. New Delhi. Publication and Information Directorate. **Council of Scientific and Industrial Research**. p. 564, 1994.

CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A. **Nat. Prod. Rep.**, v. 26, 1321, 2009.

CONNOLLY, J.D.; HILL, R.A. **Nat. Prod. Rep.**, v. 19, 494, 2002.

CORREIA, S. de J. **Flavanóides, terpenóides e novos hidrobenzofuranóides bioativos das folhas de *Tapirira guianensis***. p. 308 . Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.

COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. de. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: Aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Quím. Nova**, v.22, p.120, 1999.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. & SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. **J. Nat. Prod.**, v.60, p.52, 1997.

CUNHA, A. P. da. Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes activos e fitoterapia. <http://antoniopcunha.com.sapo.pt/ahspmscaf.htm>

DAGANI, R.; **Chem. Eng. News**, v.75, 26, 1997.

DALL'OGGIO, E. L.; RIBEIRO, F.; VASCONCELOS, L. G.; SOUSA Jr, P. T. Uso da radiação de micro-ondas para a produção de biodiesel, 2006, disponível em [www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/producao/Micro-ondas06.pdf](http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/producao/Micro-ondas06.pdf), acessado em 02/01/2009.

DALL'OGGIO, E. L. Reações da hexacloroacetona com nucleófilos de nitrogénio, enxofre e oxigénio: efeitos de ultra-som e microondas. Universidade de Santa Catarina, Brasil, 2002.

DAVID, J. M.; SILVA, E. F.; DAVID, de MOURA, D. L. Lignanás e Triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. **Quím. Nova**, v.24, 2001.

DE PASCUAL-TERESA, S.; SANCHEZ-BALLESTA, M. T. **Phytochem. Rev.**, v. 7, p.281, 2008.

DEWICK, P.M. 2002. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. (2.Ed.) **Baffins Lane, England: John Wiley & Sons Ltd.**

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. **New York: John-Willey & Sons**, p. 466, 2000.

DIAS, M. O. S.; TSUKAMOTO, J. ; FRANCO, T. T. Síntese de acrilatos de açúcares por biocatálise VI Congresso de Engenharia Química em iniciação Científica. Unicamp. 2007.

DONGMO, A. B.; BEPPE, J. G.; NOLE, T.; KAMANYI, A.; **PharmacologyOnLine**, v.2, p.171, 2006.

DORDICK, J. S. **Enzime microb. Technol.**, v.11, p.194, 1989.

ELIZABETSKY, E. Etnofarmacologia como fundamento na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A., 2000.

PETROVICK, P. R. (org.) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2000.

ENCYCLOPEDIA BRITANNICA, MAGNETRON. Fonte:<http://www.britannica.com> acessado 5/11/2008 .FABER, K., ed. Em Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook 3rd ed.; Springer Produktions-Gesellschaft: Berlin, 1997, cap. 2.

FACHINETTO, J.M.; TEDESCO, S. B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. **Revista brasileira de plantas medicinais**. v. 11 n.4, Botucatu, 200

FAURÉ, M.; LESSA, E.; VIDELA, L. A.. **Phytochemistry**, v. 29, 37773, 1990.

GHISALBERTI, E. L. (2000) *Lantana camara* L. Verbenaceae. **Fitoterapia**, v.71, p. 467.

GOSELL-WILLIAMS, M; SIMON, O. R; WEST, M.E. **O uso passado e presente de plantas para medicamentos**. **West Indian Med J** v.55 (4) p.217, 200

GRAEBIN, C. S.; EIFLER-L., V. L.; O uso do forno de microondas na síntese orgânica em fase sólida. **Quim. Nova**, v. 28, 2007.

GUNDUZ, A.; TUREDI, S.; UZUN, H.; TOPBAS, M. **Am. J. Emerg. Med.** v.24, p. 595, 2006.

GUPTA, M. N.; ROY, I. Enzymes in organic media: forms, functions and applications. **European Journal Biochemistry**, v. 271, p. 2575, 2004.

HALLIWELL, [B.](#); GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. **3<sup>a</sup> Ed**, **Oxford University press, Oxford**, 2000.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, 2006

HAYES, B. Microwave synthesis – Chemistry at the speed of light, CEM Publishing, Matthews, 2002.

HILEMAN, B. Drug discovery and development to succeed in the pharmaceutical industry: chemists must have special skills and work across disciplines. **Chemical & Engineering News**. V. 84, p. 97, 2006.

HIPPEL, V. A. R., Dielectric materials and applications. **MIT press and John Wiley & Sons**, New York, 1954.

HO, C. T.; FERRARO, T.; CHEN, Q.; HOSEN, R. T.; HUANG, M. T. Em Food Phytochemicals for Cancer Prevention II; Ho, C. T.; Osawa, T.; Huang, M. T.; Hosen, R. T., eds.; American Chemical Society: Washington DC, p. 4, 1994.

HONDA, T.; HONDA, Y.; FAFALORO, JR. F. G.; GRIBBLE, G. W.; SUH, N.; PLCE, A. F.; RENDI, M. H; HUANG, M. T.; CONNEY, A. H. **Cancer Res.**, v. 54, p.701, 1994.

HUANG, M. T.; CONNEY, A. H. **Cancer Res.** v. 54, p.701, 1994.

ISHIDA, M.; OKUBO, T.; KOSHIMIZU, K.; DAITO, H.; TOKUDA, H.; KIN, T.; YAMAMOTO, T.; YAMAZAKI, N. Tropical preparations containing ursolic acid/or oleanolic acid for prevention of skin cancer. **Chemical Abstract**, v.113, p.2173y, 1990.

**IUPAC**. Commission, Pure & Appl. Chem. v. 62, p.753, 1990.

**IUPAC**. Nomenclature of Organic Chemistry. Oxford, Pergamon Press 1979.

IZQUIERDO, F. J.; ALLI, I.; GOMES, R.; RAMASWAMY, H. S.; YAYLAYAN, V. Effect of high pressure and microwave on pronase and  $\alpha$ -chymotrypsin hydrolysis of  $\beta$ -lactoglobulin. **Food Chemistry**. v. 92, p.713, 2005.

JAEGER, K. E. & REETZ, M. T. "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology". **Trends Biotechnol.** v.16, p. 396, 1998.

JESUS, P. C. Enzimas imobilizadas em crisotila e organo-gel: aplicação na resolução de ácidos racêmicos. Florianópolis. Tese (Doutorado em Química) Faculdade de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 1998.

JIANG, J. G.; HUANG, X. J.; CHEN, J.. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 59, p. 1175, 2007.

JOSHI, H.; KAPOOR, V.P. **Carbohydr. Res.**, v.338, p. 1907, 2003.

KABZA, K.G.; GESTWICKI, J. E.; MCGRATH, J. L.; PETRASSI, H.M. Effect of microwave radiation on copper(II) 2,2'-bipyridyl-mediated hydrolysis of bis(p-nitrophenyl) phosphodiester and enzymatic hydrolysis of carbohydrates. **J. Org. Chem.**, v.61, p. 9599, 1996.

KATSUO, M. Hiroki, T.; Norio, F.; Yasutomo, N.; Yukiko, Y. Photoaging inhibitor and dermal agent for external use. Patente japonesa nº 09143050. 1997.

KENNEDY, J. F. & ROIG, M. G. "Principles of immobilization of enzymes". In: Handbook of enzyme biotechnology. 2nd ed. Alan Wiseman, 1995.

KEYSON, D. ; LONGO, E.; VASCONCELOS, J. S.; VARELA, J. A ; ÉBER, S.; DERMADEROSIAN, A. Síntese e processamento de cerâmicas em forno de microondas doméstico, 2006.

KISE, H.; HAYAKAWA, A.; NORITON, H. **J. Biochem. Int.** v.19, p.1125, 1989.

KISE, H.; HAYAKAWA, A.; NORITON, H. **J. Biotechnol.** v.4, p.239, 1991.

KIU, H.X.; MICHAEL, G. G. **Flora of China**, **5**, p. 240, 2003.

KLIBANOV, A. M., “Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents”, **Trends Biochem. Sci.**, v.14, p. 141, 1989.

KO, H.-H.; Yen MH, Lin CN, Yang SZ, Tsao LT, Wang J. **Nat. Prod.** v.68, p.1692, 2005.

KUETE, V.; Kanga, J. Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). **J. Ethnopharmacol** v.120, p.17, 2008.

KUMURA, M; TODA, S; OHNISHI M. Effects of phenolcarboxylic acids on superoxide anion and lipid peroxidation induced by superoxide anion. **Planta Med.**, 57, p. 8, 1991.

KURITA-WATER. **Patente japonesa no . 06246295**, 1994.

LAILER, K, J. Introduction to the chemistry of enzymes. New York: **McGraw-Hill Book Company Inc.**, 1954.

LANG, D. A.; HOWARD Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. **Eur. J. Biochem.**, v.254, p. 333, 1998.

LEADBEATER, N. E.; STENCEL, L. M.; WOOD, E. C. Probing the effects of microwave irradiation on enzyme-catalysed organic transformations: the case of lipase-catalysed transesterifications reactions. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 5, p. 1052, 2007.



LEDUC, C.; COONISHISH, J.; HADDAD, P.; Cuerrier, A. **J. Ethnopharmacol.** v. 105, p.55, 2006.

LIN, G.; LIN, W.-Y. Microwave-promoted lipase-catalyzed reactions. **Tetrahedron letters** v. 39, p. 4333, 1998.

LIMA, J. P, SILVA, R. B. da ; SILVA, C. C. M. da,; SANTOS, L. S. S.;SANTOS Jr, J. R. dos.; MOURA, E. M. Biodiesel de babaçu (*Orbignya* sp.) obtido por via etanólica. **Química Nova**, v. 30, p.600, 2007

MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C.; **Biotechnol. Genetic Eng. Rev.** V.3, p.193, 1985.

MAHATO, S. B.; KUNDO, A. P.; <sup>13</sup>C-NMR of pentacyclic triterpenoids. **Phytochemistry**, v.37, p.1517, 1994.

MARTINKO; PARKER; MADIGRAN. **Brock Biology Microorganisms**, 2000.

MAUGARD, L. T.; GAUNT, D.; LEGOY, M. D.; BESSON, T. Microwave-assisted synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose with immobilized b-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biotechnology Letters**, v.25, p. 623, 2003.

MELO JÚNIOR, C. A. R. de. Universidade Tiradentes – UNIT programa de pós-graduação em engenharia de processos – Esterificação catalítica e não-catalítica para síntese de biodiesel em reator microondas. 2008

MENEGATTI, R.; FRAGA, C. C. M.; BARREIROSE. J. A importância da síntese de fármacos. **Cadernos temáticos de química nova na escola**, n. 3, 2001

MIGLIATO, K. F. “*Syzygium cumini* (L.) Skeels - jambolão: estudo farmacognóstico, otimização do processo extrativo, determinação da atividade antimicrobiana do extrato e avaliação da atividade anti-séptica de um sabonete líquido contendo o referido extrato” Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Araraquara, p. 1 2005.

MONTANARI, C. A.; BAZANI V. S.; Planejamento de novos fármacos baseados em produtos naturais. **Quim. nova**, v. 24, p. 105, 2001

MULLIN, R. B. D. B. drugmakers are paving the way to more streamllined manufacturing via culture change in R&D. **Chemical & Engineering News**. V. 85, n. 04, p. 11, 2007.

MUTO, Y.; NINOMIYA, M.; FUJIK, H. Presentstatus research on câncer chemoprevention in Japan. **Japanese J. of clinical Oncology**. v. 64, p. 370, 1998.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADES, K. M. **J. Nat. Prod.** 66, 1022, 2003.

NIERO, R.; MALHEIROS, A; BITTENCOURT, C.M.S.; BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.N.; CECHINEL F. V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: Bresolin TMB, Cechinel Filho V. (org.) Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: Ed. Univali, p.10, 2003.

OKAHATA, Y. & MORI, T. Lipid-coated enzymes as efficient catalysts in organic media. **Trends Biotechnol.**, v.15, p. 50, 1997.

OLIVEIRA, A. L. A.; GIOIELLI, L. A.; OLIVEIRA, M. N. Hidrólise enzimática da gordura de babaçu. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, v. 19, p. 270 , 1999.

OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, 2009.

PAIVA, A. L., BALCÃO, V. M. & MALCATA F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalised by immobilized lipases. **J. Enzyme Microb. Technol.** v.27, p. 187, 2000.

PALOMO, J. M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G, Mateo Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: hydrolytic resolution of mandelic acid esters. **Enzyme Microb. Technol.** v. 31, p. 775, 2002.

PANDEY, A., BENJAMIM, S., SOCCOL, C. R., NIGAM, P., KRIEGER, N. & SOCCOL, V. T. "The realm of microbial lipases in biotechnology". **Biotechnol Appl. Biochem.** v. 29, p.119, 1999.

PAPER, D. H. **Planta Med.** v.64, p. 686, 1998.

PARKER, M. C.; BESSON, T.; LAMARE, S.; LEGOY, M. D. Microwave radiation can increase the rate of enzyme-catalyzed reactions in organic media. *Tetrahedron*, v. 37 p. 8383, 1996.

PATEL, R. N. Stereoselective biocatalysis. New York: **Marcel Dekker**; 2000.

PATOCKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. **Journal of Applied Biomedicine** v.1, p. 7, 2003.

PEREIRA, M. M.; GUILHON-SIMPLICIO, F. Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (Malpighiaceae). **Quimica Nova**, V. 34, n. 6, p.1032, 2011.

PEZZUTO, **Patente Americana**, nº 5 862 527, 1999.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFÂNIO, R. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quim Nova** 25( Supl.1) 45. 2002.

**PLACTEC-PLACAS & ASSISTÊNCIA TÉCNICA, MICROONDAS.** Fonte: <http://plactec.com.br/data> / acedido no dia 12/10/2008.

POTTIE, M.; EYCKEN, J. V.; VANDEWALLE, M. **Tetrahedron Lett.** v. 30, p.319, 1995.

POWEL, LAWRIE WILLIAM. Immobilized enzymes. In: *Industrial enzymology*. 2nd ed. Tony Godfrey & Stuart West, 1996.

QIU, H. X.; Huang, S. M.; Zhang, Y. T. *Flora of china: Euphorbiaceae*; Qiu, H. X., Ed.; **Science Press: Beijing**, V. 44, Chapter 1, p. 178, 1996.

RAMOS, C.; VECCHIA, R. D; RODRIGUES, C. A. Esterificação do ácido láurico catalisado por diferentes lipases frente à variação de temperatura, utilizando dois sistemas diferentes de proteção da enzima. **Livro de Resumos da 22<sup>a</sup>**. Reunião Anual da SBQ, QO-016. Poços de Caldas (MG), 1999.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon** v. 39, p. 603, 2000.

REETZ, MANFRED T.; Lipases as practical biocatalysts. **Curr. Opin. Chem. Biol.** 2002.

RÉJASSE, B. ;LAMARE,S.; LEGOY,M. D.; BESSON, T. Stability improvement of immobilized *Candida antarctica* lipase B in an medium under microwave radiation. *Organic & Biomolecular chemistry*. v. 2, p.1086, 2004.

RIBEIRO, F. O uso de radiação de microondas na transesterificação/esterificação de óleos vegetais/gordura animal para a produção de biodiesel. Universidade Federal de Mato Grosso, 2004.

RIBEIRO, JR, W.A. Aspectos reais e lendários da biografia de Hipócrates, o pai da medicina. **Jornal Brasileiro de Historia da Medicina**, v. 6, n.2, p. 8, 2003

RINHBOM, T.; Segura, L.; Noreen Y.; Perera P.; Bohlin, L. **Nat. Prod.** v.61, p.1212, 1998.

ROGALSKA, E.; CUDREY, C.; FERRATO, F. & VERGER, R. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases. **Chirality** v.5, 24, 1993.

ROY, I.; GUPTA, M. N. Non-thermal effects of microwaves on protease-catalyzed esterification and transesterification. **Tetrahedron**, v. 59 p. 5431, 2003.

**SABINSA CORPORATION**, 2000. Acesso em 08.04.12.

SADICOFF, B.; AMORIM, M. C. V.; de MATTOS, M. C. S. Uma demonstração simples e visual do efeito do aquecimento com microondas em reações de poli adição. **Química. Nova**, vol.23, n.4, p.557, 2000.

[SAGRERA, G. J.](#); [SEOANE, G. A.](#) Microwave accelerated solvent-free synthesis of flavanones. **Jornoul Brazil Chemistry Society**, v.16, n. 4, p.851, 2005.

SALMÓRIA, G. V. O uso da energia de microondas em reações orgânicas. Universidade Federal de Santa Catarina, 1996.

SANSEVERINO, A. M. Micro-ondas em síntese orgânica. **Quim. Nova**, v.25, p 660, 2002.

SANTANIELLO, E.; FERRABOSCHI, P.; GRISENTI, P. A. (An efficient chemo-enzymatic approach to the enantioselective synthesis of 2-methyl-1,3-propanediol derivatives'', **Tetrahedron Letters**. v. 31. Issue 39, p. 5657, 1990.

SAXENA, R. K.; ISAR, J.; SARAN, S.; KAUSHIK, R.; DAVIDSON, W. S. Efficient microwave-assisted hydrolysis of triolein and synthesis of bioester, bio-surfactant and glycerides using aspergillus lipase. **Current Science**, v. 89, n.6, p.1000, 2005.

SCHMID, R. D. & VERGER, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** V.7, p.1608, 1998.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61. p. 1053, 1998.

SIH, C. J.; WU, S. H. Resolution of enantiomers via biocatalysis. **Topics Stereochem.**, v.19, p. 63, 1989.

SILVA, F. C. da; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. de. Adaptação de forno de microondas doméstico para realização de reações de transesterificação sob refluxo e catálise por argilas. **Química. Nova**, v.29, n.2, p.376, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2001.

SIMPSON, M. G., **Plant systematics**. Burlington, MA, Elsevier Academic press, Boston, p. 256, 2006.

SOEJARTO, D. D.,\*† Hong Jie Zhang,† Harry H. S. Fong,† Ghee . **Nat. Prod.** 2006, 69, 473– 481. Plantas medicinais são pouco exploradas pelos dentistas. **Cienc. Cult.** [online]. v. 59, n. 1, p. 12, 2007.

SPORN, Michael B. SUH, **Nanjoo. Carcinogenesis**, v. 21, p.525, 2000.

STECHER, HARTMUT; FABER, KURT. Biocatalytic deracemization techniques: dynamic resolutions and stereoinversions. *synthesis*, 1997.

STUERGA, D.; DEMOTTE, M. A.; LOUPY, A. *Microwaves in organic synthesis*, **Wiley-VCH: Weinheim**, p.1, 2002.

SUGIHARA, A., SHIMADA, Y. & TOMINAGA, Y. “A novel *Geotrichum candidum* lipase with some preference for the second position of a triglyceride molecule (short contribution)”. **Appl. Microbiol Biotechnol.**, v. 35, p. 738, 1991.

SUH, N.; WANG, Y.; HONDA, T.; GRIBBLE, G.W.; DMITROVSKY, E. A novel synthetic oleanane triterpenoid, 2-Cyano-3,12-dioxolean-1,9-dien-28-oic acid, with potent differentiating, antiproliferative, and anti-inflammatory activity **Cancer Res January** v.15, p.336, 1999.

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P; MENEGHETTI, M. R.; WOLF, C. R.

Transformação de triglicérides em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: Algumas aplicações da catálise na oleoquímica. **Quim. Nova**, v. 30, n. 3, p. 667, 2007

SZTAJER, H.; LUNSDORF, H.; ERDMANN, H.; MENGE, U. & SCHMID, R. “Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*”. **Biochim. Biophys Acta** 1124, p. 253, 1992.

TANGMOUO, J. G.; MELI, A. L.; KOMGUEM, J.; KUETE, V.; NGOUNOU, F.N.; Lontsi, D. et al. **Tetrahedron Lett**, 47 p. 3067. 2006. The electronic version of this article is the complete one and can be found online at: <http://www.malariajournal.com/content/10/1/167>.

THIEL, F. Lipase-supported synthesis of biologically active compounds. **Chem. Rev.**, p. 2203, 1995.

THOMAS, G. 2000 **Química Medicinal** - Uma Introdução. ed Guanabara, Rio de Janeiro R.J.

TICOM, T. T. da S. – UFRJ, Centro de Ciências da Saúde Faculdade de Farmácia; Otimização de parâmetros para obtenção de ácido mandélico a partir de mandelato de etila utilizando lípases. 2003.

TISCHER, W. & KASCHE, V. Immobilized enzymes: crystals or carriers? **Trends Biotechnol.** 1999.

TOLEDO, A. C.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 7, 2003

UHLIG, H. Carrier-bound enzymes: methods of immobilization. In: Industrial enzymes and their applications. **John Wiley & Sons**, 1998.

UMEHARA, K.; TAKAGI, M.; UENO, A.; TAKI, T.; CHEN, T. J. **Chem. Pharm. Bull.** n. 41, p.401, 1992.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V.S; BARREIRO, E. J.; Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova** v.29 n.2, 2006.

VIEIRA, R. F. Conservation of medicinal and aromatic plants in Brazil. Reprinted from: Perspectives on new crops and new uses. J. Janick (ed.), **ASHS Press**, Alexandria, VA. p. 152, 1999.

VULFSON, E. N. "Industrial applications of lipases". In: Lipases: Their structure, biochemistry and application. Wolley, P. e Pettersen, S. B., p.271, Cambridge: Cambridge University Press, 1994.

WANG, Z. Y.; AGARWAL, R.; ZHOU, Z. C; BICKERS, D. R.; AND MUKHTAR, H. Inhibition of mutagenicity in Salmonella typhimurium and skin tumor initiating and tumor promoting activities in Sencar mice by oleanane triterpenoids: comparison of glycyrrhizin and its aglycone 18 $\alpha$ - and 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid stereoisomers. **Carcinogenesis** (Lond.), v.12, p. 187, 1991.

XUE, P. F.; ZHAO, Y. Y.; WANG, B; LIANG, H. Secondary metabolites from *Potentilla discolor* Bunge (Rosaceae). **Biochem Syst Ecol** v.34, p.825, 2006.

YADAV, G. D.; LATHI, P. S. Intensification of enzymatic synthesis of propylene glycol monooleate from 1,2-propanediol and lauric acid under microwave irradiation: Kinetics of forward and reverse reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p. 814, 2006.

YADAV, R. P.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. & DAVIDSON, W. S. "Purification and characterization of a regioespecific lipase from *Aspergillus terreus*". **Biotechnol. Appl. Biochem.** 28: 243-249, 1998.

YANG, RUSSEL. Fundamentals of non-aqueous enzymology In: Enzymatic reactions in organic media, Eds: Koskinen e Klivanov, Ed.Blackie academic & professional, Great Britain, 1996.

YANG, X. Z.; YANG, L.; YANG, Y. **Central South Pharmacy**, v.7, p.11, 2009.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó. p. 46, 2001.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica: obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó. P. 46, 2001.



ZANATTA, C.F.; CUEVAS, E.; BOBBIO, F.O.; WINTERHALTER, P.; MERCADANTE, A.Z.. Determination of anthocyanins from camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. **J Agric Food Chem** v.53, p. 9531, 2005.

ZLOTORZYNSKI, A. **Crit. Rev. Anal. Chem.** v.25, p.43, 1995.

ZOFOU, D.; KOWA, T. K.; WABO, H. K.; NGEMENYA, M. N.; TANE, P; TITANJI, V. P.K.. *Hypericum lanceolatum* (Hypericaceae) as a potential source of new anti-malarial agents: a bioassay-guided fractionation of the stem bark. **Malaria Journal** 10:167 doi:10.1186/1475, 2011.

8 ARTIGO

## Bioactive oleanane, lupane and ursane triterpene acid derivatives

*Maria de L. e Silva<sup>a</sup>, Rauldenis A. F. Santos<sup>b</sup>*

*Jorge M. David<sup>b</sup>, Luciano S. Lima<sup>c</sup>, Pedro S. Reis<sup>d</sup>*

<sup>a</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Geremoabo, s/n,  
41810-290, Salvador, BA, Brazil

<sup>b</sup>Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Geremoabo, s/n, 41810-  
290, Salvador, BA, Brazil

<sup>c</sup>Instituto Federal da Bahia, Campus Porto Seguro, Br 367, km 57,5 Fontana I - Porto Seguro,  
BA, Brazil

<sup>d</sup>Universidade Federal do Piauí, Campus Parnaíba. Piauí Brazil.

### RESUMO

Os ácidos betulínico, ursólico e oleanólico, isolados das partes aéreas de *Eriope blanchetii* (Lamiaceae), foram submetidos a diferentes reações de esterificação obtendo-se assim 12 derivados esterificados na posição C-3. Tanto as substâncias isoladas quanto os derivados triterpênicos foram caracterizados por técnicas espectroscópicas no IV, RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e EM. Os derivados foram submetidos a testes de atividade antioxidante, letalidade frente *Artemia salina* e atividade antimicrobiana.

Palavras chave: *Eriope blanchetii*, Lamiaceae, derivados triterpenos, letalidade *Artemia salina*, atividades antimicrobianas.1

## ABSTRACT

The betulinic, ursolic and oleanolic acids isolated from the aerial parts of *Eriope blanchetii* (Lamiaceae) were submitted to different esterification reactions obtained 12 ester derivatives at C-3 positions. All compounds were identified by spectroscopic techniques such as IR and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR and MS. The derivatives were submitted to antioxidant tests, lethality of *Artemia salina* and determination of antimicrobial activities.

**Keywords:** *Eriope blanchetii*, Lamiaceae, triterpenes derivatives, *Artemia salina* lethality, antimicrobial activities.

## INTRODUCTION

Triterpenes are a natural product class present in all organisms, especially in plants.<sup>1</sup> The acid triterpenes show different and important biological and pharmacological activities, such as anti-inflammatory, antimicrobial, antiviral, cytotoxic and cardiovascular effects<sup>1,2</sup>. Synthesis of triterpenes derivatives is a strategy to obtain compounds with enhancement of bioactivity for example by the introduction of electron withdrawn/ donor groups.<sup>3</sup>

The betulinic, ursolic and oleanolic acids are the main triterpenes present in *Eriope blanchetii*, a shrub belonging to Lamiaceae family which is an endemic plant occurring in the sand soil of Bahia's coast.<sup>4</sup> To date, there are a few chemical studies dealing with this species. From the organic extracts were isolated triterpenes and bioactive lignans.<sup>5</sup>

Previous studies demonstrated triterpenes acids esterified with cinnamic acid derivatives presented activity against *Mycobacterium tuberculosis*<sup>6</sup>, phthalic ester of betulinic acid showed cytotoxicity<sup>7</sup>, anti HIV activity of ester dimethylsuccinic of betulinic acid<sup>8</sup> besides a number of other ester derivatives of ursolic and oleanolic acids with anti-inflammatory activities.<sup>9</sup> So, this work describes the synthesis of ester derivatives of betulinic, ursolic and oleanolic acids

and the determination of the cytotoxicity of these compounds by the lethality of *Artemia salina* (brine shrimp test) and antimicrobial activities against xxxxxx.

## **Experimental**

### *General procedures*

<sup>1</sup>H (300 MHz); <sup>13</sup>C NMR and DEPT (75 MHz) experiments were carried out in a Varian mod. Gemini 2000 or a Bruker AMX400: chemical shifts were recorded in  $\delta$  (ppm) from the solvent peak relative to TMS; APCI and ESIMS were obtained on Shimadzu LCMS-2010 and IR spectra were taken on a Varian mod. 640-IR spectrophotometer.

Column chromatography was carried out on silica gel 60 (Akros 0.04-0.073 mm) and, silica gel TLC plates were used to monitor the chromatographic purification employing iodine fumes, Libermann-Burchard spray reagent, and UV light (254/366 nm).

### *Plant material*

Botanical material of *Eriope blanchetti* (Lamiaceae) was collected in May 2008 at Parque Metropolitano do Abaeté, Salvador, Bahia State, a region where "restinga" vegetation is prevalent. The species was identified by Prof. Maria L. S. Guedes and a voucher is deposited at Herbário Prof. Alexandre Leal Costa, Instituto de Biologia da UFBA, under number 045599.

### *Extraction and isolation*

The dried and powdered aerial parts of *E. blanchetii* (1.7 Kg) were repeatedly extracted with MeOH at room temperature and the crude extract was immediately partitioned hexane:MeOH/H<sub>2</sub>O (9:1) and in sequence by CHCl<sub>3</sub>:MeOH/H<sub>2</sub>O (6:4). After the evaporation of CHCl<sub>3</sub> under vacuum, the extract obtained (47.2 g) was submitted to CC using Silica gel as

adsorbent and eluted with mixtures  $\text{CHCl}_3$ :MeOH with gradient of polarity (95:5  $\rightarrow$ 3:2). The fractions rich in triterpenes were monitored by TLC employing Liebermann-Buchard spray reagent. These fractions were submitted to Sephadex LH-20 CC eluted with  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (2:3) and to a Silica gel CC eluted with mixtures of hexane:EtOAc. These procedures permitted to obtain pure betulinic (2.5g), oleanolic (903 mg) and ursolic (570 mg) acids.

#### *Synthesis of the ester derivatives*

*Ester derivatives of triterpene acids with anhydrides.* In a 50 ml flask were added 20 mg of the triterpene acids, 2 ml pyridine and 2.0 mg of 2,4-dimethylaminepyridine (DMAP). Sequentially, 0.4 ml of propionic and butyric anhydrides and, 10 mg of benzoic anhydride were added in each flask. The mixtures were kept stirring during 24 h at 45 °C. Thus the solvent were removed and the products were dissolved in  $\text{CHCl}_3$  and twice treated with  $\text{H}_2\text{O}$  and dried with  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and the solvent removed under vacuum. The product were purified by silica gel CC employing mixtures of hexane:EtOAc (9:1) as eluent. This procedure permitted to obtain the esters of the triterpene acids in yields described in Table 1 (Fig. 1 and 2).

#### **Figure 2:** Synthesis of the ester derivatives from oleanolic and ursolic acids

*Ester derivatives of triterpene acids with 3-chlorobenzoyl chloride.* In a 50 ml flask were separately added 20 mg of the three triterpene acids and 2 ml pyridine. Sequentially, 23  $\mu\text{l}$  of 3-chlorobenzoyl chloride was added and the mixtures were kept stirring in an ice bath during 24 h. Thus the solvent were removed and the products were purified by silica gel CC employing mixtures of hexane:EtOAc (8:2) as eluent. This procedure permitted to obtain the esters of the triterpene acids in yields described in Table 1 (Fig. 1 and 2).

*3β-Propanoyl betulinic acid (1a)* APCIMS *m/z* 511 [M-H]; <sup>1</sup>H NMR (300 M Hz, CDCl<sub>3</sub>), δ ppm: 5.1 e 5.0 (1H, *s*, H-29); 4.48 (1H, *J*= 7.7 Hz, *t*, H-3); 2,02 (1H, *J*= 11 Hz, *d*, H-18)

*3β-Butanoyl betulinic acid (1b)* APCIMS *m/z* 525 [M-H]; <sup>1</sup>H NMR (300 M Hz, CDCl<sub>3</sub>), δ ppm: 5,1 e 5,0 (2H, *s*, H-29); 4,48 (1H, *J*= 7,7 Hz, *t*, H-3); 2,02 (1H, *J*= 11 Hz, *d*, H-18)

*3β-Benzoyl betulinic acid (1c)* APCIMS *m/z* 559 [M-H]; <sup>1</sup>H NMR (300 M Hz, CDCl<sub>3</sub>), δ ppm: 8,15 (2H, *J*= 1,7 e 8,3 Hz, *dt*, H-3', 7'); 7,65 (1H, *J*= 1,3 e 7,5 Hz, *tt*, H-5'); 7,5 (2H, *J*= 1,5 e 8 Hz, *td*, H-4' e 6'); 4,62 e 4,72 (1H, *s*, H-29); 3,9 (1H, *J*= 7,7 Hz, *t*, H-3); 2,07 (1H, *J*= 11 Hz, *d*, H-18)

*3β-3-Chlorobenzoyl betulinic acid (1d)*. White power. Mp. 165.9-166.4 °C. APCIMS *m/z* 593 [M-H]; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3522-3281 (νOH), 2925-2852 (νC-H), 1689 (νC=O), 1684 (νC=O), 1575 (νC=C), 1303-1263 (νC-O), 847 (νC-Cl). <sup>1</sup>H NMR (300 M Hz, acetone-*d*<sub>6</sub>), δ ppm: 4,72 e 4,62 (1H, *s*, H-29); 3,7(1H, *J*= 7 Hz, *t*, H-3); 2,04 (1H, *J*= 11 Hz, *d*, H-18).

*3β-Propanoil oleanolic acid (2a)*: APCIMS *m/z* 511 [M-H]; H NMR (300 M Hz, CDCl<sub>3</sub>), δ: 5,25 (1H, *s*, H-12); 4,51 (1H, *J*= 7,7 Hz, *t*, H-3); 2,34 (2H, *J*= 7,5 Hz, *q*, H-2'); 2,2 (1H, *J*= 11 Hz, *d*, H-18)

*3β-Butanoyl oleanolic acid (2b)* APCIMS *m/z* 525 [M-H]; <sup>1</sup>H NMR (300 M Hz, acetone-*d*<sub>6</sub>), δ ppm: 4,49 (1H, *J*= 7,7 Hz, *m*, H-3).

*3β-Benzoyl oleanolic acid (2c)* APCIMS *m/z* 525 [M-H]; <sup>1</sup>H NMR (300 M Hz, acetone-*d*<sub>6</sub>), δ ppm: 8,15 (2H, *J*= 1,7 e 8,3 Hz, *dt*, H-3', 7'); 7,65 (1H, *J*= 1,3 e 7,5 Hz, *tt*, H-5'); 7,5 (2H, *J*= 1,5 e 8 Hz, *td*, H-4' e 6'); 5,23 (1H, *s*, H-12); 4,7 (1H, *J*= 7,7 Hz, *t*, H-3)

*3β-3-Chlorobenzoyl oleanolic acid (2d)*. White power. M.p. 152.9-154.1°C APCIMS *m/z* 593 [M-H]; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3511-3312 (νOH), 2925-2852 (νC-H), 1712 and 1690 (νC=O), 1457 (νC=C), 1303-1263 (νC-O), 894 (νC-Cl). <sup>1</sup>H NMR (300 M Hz, acetone-*d*<sub>6</sub>), δ ppm: 7,99 (1H, *s*, H-3'); 7,99- 7,96 (1H, *d*, H-7'); 7,6 (1H, *d*, H-5'); 7,5 (1H, *t*, H-6'); 4,35 (1H, J= 7,7 Hz, *t*, H-3); 2,3 (1H, J= 11 Hz, *d*, H-18). **Rf**: (hex.: AcOEt 8:2 v/v).

*3β-Propanoyl ursolic acid (3a)*. White power. M.p. 266.5-267.3°C. IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3006-2879 (νC-H), 1734 and 1712 (νC=O), 1222 (νC-O). <sup>1</sup>H NMR (300 M Hz, CDCl<sub>3</sub>), δ ppm: 5,2 (1H, J= 3,3 Hz, *t*, H-12); 4,51 (1H, J= 6 e 8,6 Hz, *dd*, H-3); 2,3-2,4 (2H, J= 7,5 Hz, *q*, H-2'); 2,2 (1H, J= 11 Hz, *d*, H-18). **Rf**: 0,71(hex.: AcOEt 9:1 v/v).

*3β-Butanoyl ursolic acid (3b)*. White power. M.p. 265,0-265,1°C. IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3006-2927 (νC-H), 1734 and 1714 (νC=O), 1222 (νC-O). <sup>1</sup>H NMR (300 M Hz, CDCl<sub>3</sub>), δ ppm: 5,2 (1H, J= 3,3 Hz, *t*, H-12); 4,51 (1H, J= 5,6 e 8,9 Hz, *dd*, H-3); 2,3-2,4 (2H, J= 7,2 Hz, *t*, H-2'); 2,2 (1H, J= 11 Hz, *d*, H-18). **Rf**: 0,71(hex.: AcOEt 9:1 v/v).

*3β-Benzoyl ursolic acid (3c)*. White power. M.p. 97,3 - 99,5°C. IR (film, cm<sup>-1</sup>): 3006-2926 (νC-H), 1714 (νC=O), 1222 (νC-O). <sup>1</sup>H NMR (300 M Hz, CDCl<sub>3</sub>), δ ppm: 8,15 (2H, J= 1,7 e 8,3 Hz, *dt*, H-3', 7'); 7,65 (1H, J= 1,3 e 7,5 Hz, *tt*, H-5'); 7,5 (2H, J= 1,5 e 8 Hz, *td*, H-4' e 6'); 5,3 (1H, *s*, H-12); 4,76 (1H, J= 5,6 e 8,9 Hz, *dd*, H-3); 2,25 (1H, J= 11 Hz, *d*, H-18). **Rf**: 0,57 (hex.: AcOEt 9:1 v/v).

*3β-3-Chlorobenzoyl ursolic acid (3d)*. White power. M.p. 155,2-157,9°C.

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):3084-2867 (νOH), 3005-2925 (νC-H), 1721 (νC=O), 1693 (νC=O), 1572 (νC=C), 1291-1256 (νC-O), 846 (νC-Cl). <sup>1</sup>H NMR (300 M Hz, CDCl<sub>3</sub>), 8,1 (1H, J= 1,7 e 2,5 Hz, *dd*, H-3'); 8,0 (1H, J= 1 e 7,5 Hz, *dt*, H-7'); 7,5 (1H, J= 1 e 8 Hz, *td*, H-5'); 7,4 (1H, J= 7,8

Hz, *t*, H-6'); 5,2 (1H, J= 3,3 Hz, *t*, H-12); 4,75 (1H, J= 8,9 Hz, *t*, H-3); 2,2 (1H, J= 11 Hz, *d*, H-18). **Rf**: 0,54 (hex.: AcOEt 8:2 v/v).

#### *Biological Tests.*

Brine shrimp lethality test was performed according to Serrano et al.<sup>10</sup> with minor modifications.<sup>5</sup> Radical scavenging activities of plant extracts were determined through spectrophotometry using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging radical assay.<sup>11</sup> The radical scavenging ability was calculated by the formula % I = [(AbsB - AbsA) / AbsB] x 100 and the IC50 was established by the linear decreasing of inhibition percentage.

#### *Statistical analysis*

All assays were developed in triplicate and the test results were analyzed using the two-tailed Student's t-test at a significance level of P < 0.05 and DPPH IC50 values with 95% confidence intervals were determined using the regression method with the Analyse-it software. BST LC50 values with a 95% confidence interval were determined using the probit analysis method of Stats Direct statistical software. When required the results were found by extrapolation of the straight line.

### **Results and Discussion**

*Eriope blanchetti* is an endemic brazilian plant which produces considerable amounts of betulinic acid as well as oleanolic and ursolic acids. These compounds were re-isolated from the aerial parts of this plant by chromatographic techniques. The structural identifications of these acids were based on the data comparison of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR with the literature for methyl esters derivatives.<sup>12</sup>

The tree triterpene acids were submitted to esterification reactions with different anhydrides e/or acyl chloride. These procedures permitted to obtain twelve triterpene acyl derivatives (**1a-1d**, **2a-2d**, **3a-3d**). The compounds **1d**, **2d** and **3d** are new. The structures of these



compounds were easily identified by MS, IR and NMR data analyses comparing with previously spectrometric data of betulinic, oleanolic and ursolic acids. The presence of additional and characteristic  $\nu_{C=O}$  and  $\nu_{C-O}$  stretchings observed in the IR spectra indicate presence of an ester function. In the  $^1H$  NMR spectra of these compounds, the esterified products can be analyzed by the signal of the deshielded H-3 ( $\delta$  3.7-4.7) when compared with the free H-3 ( $\delta$  3.1-3.4) triterpene acids (Table 2)

The prepared compounds were submitted to the Brine Shrimp Test and the CL<sub>50</sub> of each compound was determined. Compounds with CL<sub>50</sub>>1000 $\mu$ g/mL can be considered inactive, those with CL<sub>50</sub><100 $\mu$ g/mL are very active and CL<sub>50</sub> >100 and < 900  $\mu$ g/mL are moderate.<sup>13</sup> Table 3 shows the results observed for the derivatives. Most of the prepared compounds are inactive but 3 $\beta$ -(3-chlorobenzoyl) betulinic acid (**1d**) showed a remarkable activity (CL<sub>50</sub>= 117.1 $\mu$ g/mL). Betulinic acid is known by its antitumor activities, so this characteristic can explain the **1d** higher activity comparing with **2d** and **3d**. Aliphatic compounds with no conjugated double bonds usually do not show considerable antioxidant activities.<sup>14</sup> However triterpenes esterified with cinnamic acid derivatives present scavenging activity employing DPPH reagent.<sup>15</sup> All the derivatives were submitted to this test and, as expected, the majority of compounds were unable to quenching the free radical. However,  $\beta$ -(3-chlorobenzoyl) betulinic acid showed IC<sub>50</sub> similar than quercetin, the positive control employed.

### Acknowledgements

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Brazil), PRONEM (FAPESB/CNPq), and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for fellowship support and grants.

### Supplementary Information

Supplementary informations for compounds 1d, 2d and 3d are available free of charge at <http://jbcs.sbq.org.br>, as a PDF file.

## REFERENCES

1. Patočka, J. *J. of Appl. Biomed.* **2003**, *1*, 7; Connolly, J.; Hill, R., *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 794.
2. Mahato, S. B.; Sen, S. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 1185; Honda, T.; Honda, Y. Fafaloro, Jr, F. G. ; Gribble, G. W. ; Suh, N. ; Pice, A. F. ; Rendi, M. H. ; Huang, M. T.; Conney, A. H.. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 701; Vechia, L. D.; Gnoatto, S. C. B. *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1245; Maia, J. L.; Lima-Junior, R. C. P.; David, J. P.; David, J. M.; Santos, F. A.; Rao, V. S. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 82; Maia, J. L.; Lima-Junior, R. C. P.; Melo, C. M.; David, J. P.; David, J. M.; Campos, A. R.; Santos, F. A.; Rao, V. S. *Pharmacol. Res.* **2006**, *54*, 282.
3. Cechinel-Filho, V.; Yunes, R. A. *Quim. Nova* **1998**, *21*, 99; Kapoor, V. K., Chawla, A. S. *J. Scien. Ind. Res.* **1986**, *45*, 503.
4. Harley, R. M. Kew, Royal Botanic Gardens 1976, 38, 3. 107p.; Da Silva, F.O.; Viana, B.F.; Pigozzo, C.M. *Iheringia, Sér. Zool.* 2007, 97, 1, 87.
5. David, J. P.; da Silva, E. F.; de Moura, D. L.; Guedes, M. L. Da S.; Assunção, R. De J.; David, J. M. *Quim. Nova* **2001**, *24*, 730; Santos, E. O.; Lima, L. S.; David, J. M.; Martins, L. C.; Guedes, M. L. S.; David, J. P. *Nat. Prod. Res.* **2011**, *25*, 1450.
6. Tanachatchairatana, T.; Bremner J. B. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 194.
7. Miroslav Kvasnica, Jan Sarek, Eva Klinotova, Petr Dzubakb And Marian Hajduchb. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3447.
8. Qiana, K.; Nakagawa-Gotoa, K.; Yua, D.; Morris-Natschkea, S. L.; Nitzb, T. J.; Kilgoreb, N.; Allawayb, G. P.; Leea, K.-H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6553.

9. Honda, T.; Finlay, H. J.; Gribble, G. W.; Suh, N.; Sporn, M. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1623.
10. Serrano, C.; Ortega, T.; Villar, A. *Phytother. Res.* **1996**, *10*, 118.
11. Alves, C. Q.; David, J. M.; David, J. P.; Bahia, M. V.; Aguiar, R. M.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 2202; Aguiar, R. M.; Alves, C. Q.; David, J. M.; Rezende, L. C. de; Lima, L. S.; David, J. P.; Queiroz, L. P. *Quim. Nova* **2012**, *35*, 567.
12. Mahato, S.B.; Kundu, A. P. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1517.
13. Anderson, J. E.; Goetz, A. *Phytochem. Analysis* **1991**, *2*, 107; Meyer, B. N; Ferrigni, N. R; Putnam, J. E; Jacobsen, L. B; Nichols, D. E.; Mclaughlin, J. L. *Planta Med.* **1982**, *45*, 31.
14. Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P. *Quim. Nova* **2006**, *29*, 113.
15. Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P. *Pharm. Biol.* **2004**, *42*, 62.

Table 1: Yields of purified ester triterpene acid derivatives

Triterpene acid derivative	m (mg)	Yield (%)
<b>1a</b>	1.7	10.5
<b>1b</b>	1.7	10.8
<b>1c</b>	13.5	56.0
<b>1d</b>	8.1	33.0
<b>2a</b>	1.4	8.8
<b>2b</b>	1.3	7.5
<b>2c</b>	8.1	33.0
<b>2d</b>	17.1	66.0
<b>3a</b>	12.7	55.3
<b>3b</b>	13.8	59.8
<b>3c</b>	7.3	37.1
<b>3d</b>	19.1	69.0

**Table 2:** H-3  $^1\text{H}$  NMR data of betulinic, oleanolic and ursolic acids and their ester derivatives [300 MHz,  $\delta(\text{ppm})$  J(Hz)].

Substância	Solvente	H-3
<b>1</b>	Py	3.5 ( <i>t</i> , 7.0 Hz)
<b>1a</b>	Cd	4.48 ( <i>t</i> , 7.7 Hz)
<b>1b</b>	Cd	4.48 ( <i>t</i> , 7.7 Hz)
<b>1c</b>	Ac	3.9 ( <i>t</i> , 7.7 Hz)
<b>1d</b>	Ac	3.7 ( <i>t</i> , 7.1 Hz)
<b>2</b>	Py	3.5 ( <i>t</i> , 8.0 Hz)
<b>2a</b>	Cd	4.51 ( <i>t</i> , 7.7 Hz)
<b>2b</b>	Ac	4.49 ( <i>m</i> , 7.7 Hz)
<b>2c</b>	Ac	4.7 ( <i>t</i> , 7.7 Hz)
<b>2d</b>	Ac	4.35 ( <i>t</i> , 7.7 Hz)
<b>3</b>	Py	-
<b>3a</b>	Cd	4.51 ( <i>dd</i> , 6.0 and 8.6 Hz)
<b>3b</b>	Cd	4.51 ( <i>dd</i> , 5.6 e 8.9 Hz)
<b>3c</b>	Cd	4.76 ( <i>dd</i> , 5.6 e 8.9 Hz)
<b>3d</b>	Cd	4.75 ( <i>t</i> , 8.9 Hz)

Py= piridine- $d_5$ , Ac=acetone - $d_6$ , Cd= $\text{CDCl}_3$

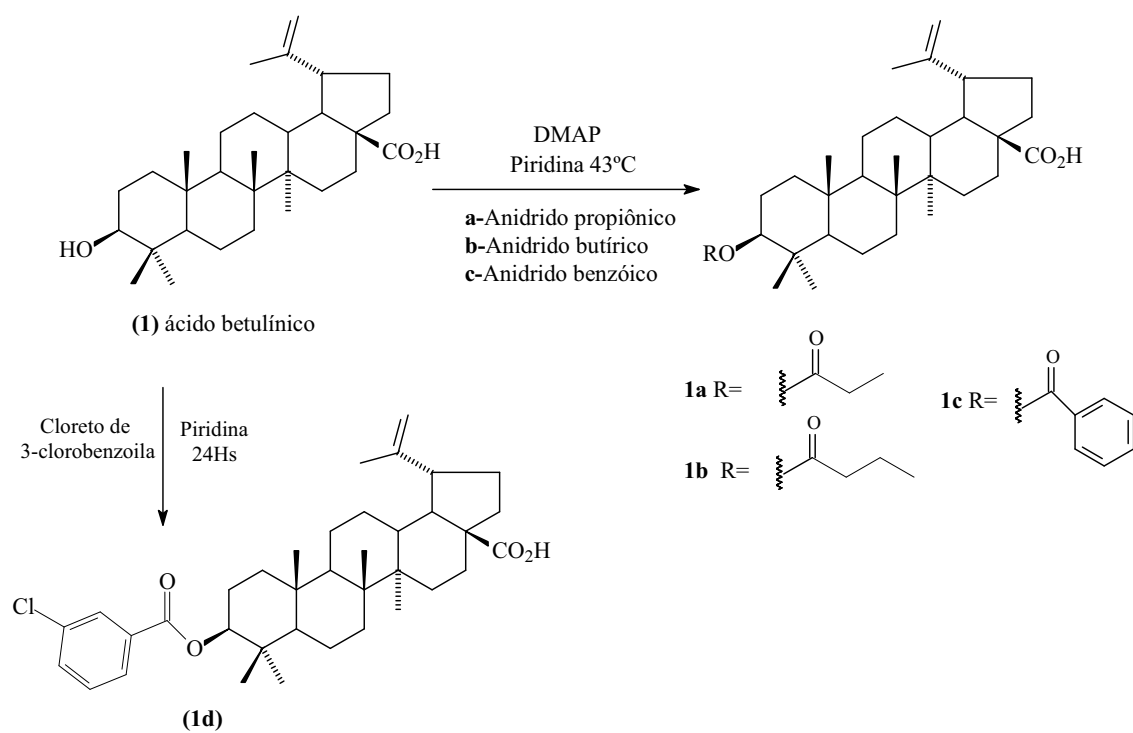
**Table 3:** Citotoxicity evaluation by Brine shrimp test of triterpene acid derivatives

Compound	Lethality of <i>Artemia salina</i>	
	CL <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	SD
<b>1a</b>	>1000 $\mu\text{g/mL}$	-
<b>1b</b>	>1000 $\mu\text{g/mL}$	-
<b>1c</b>	>1000 $\mu\text{g/mL}$	-
<b>1d</b>	117.1 $\mu\text{g/mL}$	0.418
<b>2a</b>	>1000 $\mu\text{g/mL}$	
<b>2b</b>	>1000 $\mu\text{g/mL}$	-
<b>2c</b>	>1000 $\mu\text{g/mL}$	-
<b>2d</b>	477.2 $\mu\text{g/mL}$	0.304
<b>3a</b>	>1000 $\mu\text{g/mL}$	-
<b>3b</b>	>1000 $\mu\text{g/mL}$	-
<b>3c</b>	>1000 $\mu\text{g/mL}$	-
<b>3d</b>	>1000 $\mu\text{g/mL}$	-

SD with 95% confidence interval ( $\mu\text{g/mL}$ )

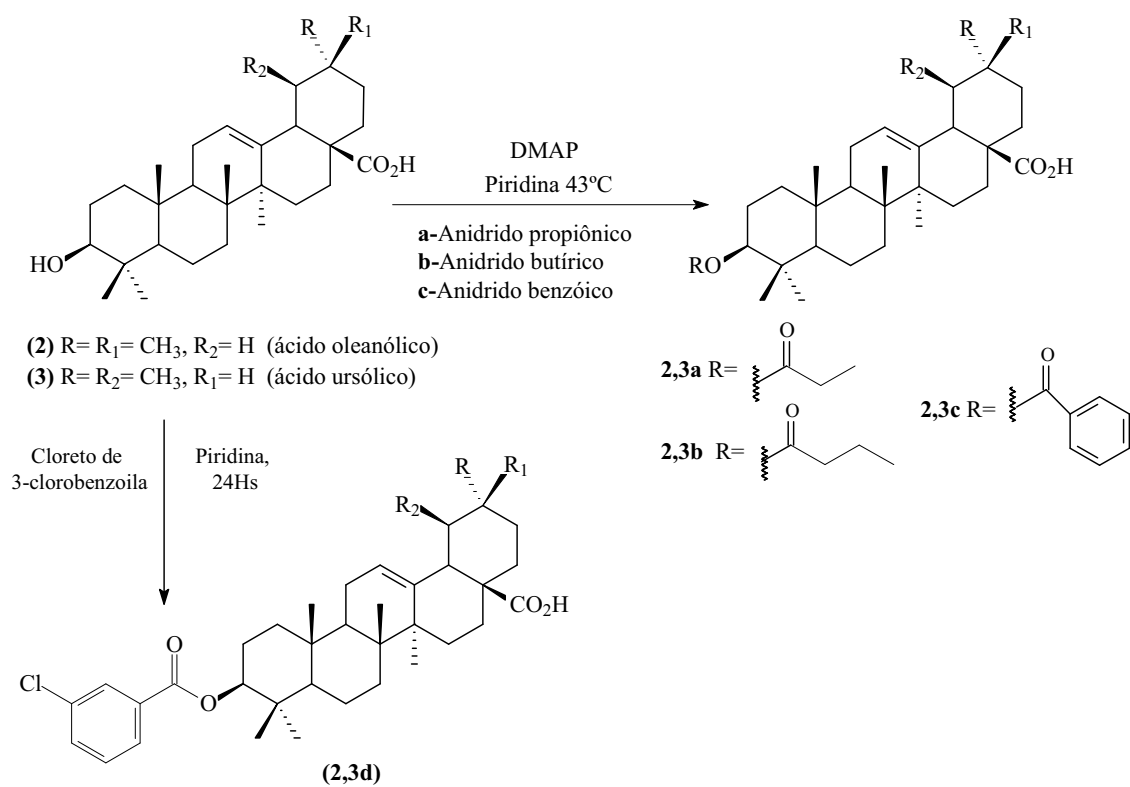
**Table 4:** Scavenging activity observed by 1d, 2a and 2d in the DPPH test

Compounds	IC <sub>50</sub> ±RSD (µg/mL)
2d	1444 ± 2,0
1d	23,41 ± 0,9
2a	44,58 ± 0,7
Quercetin (positive control)	23,18 ± 1,4



**Figure 1:** Synthesis of the ester derivatives from betulinic acid





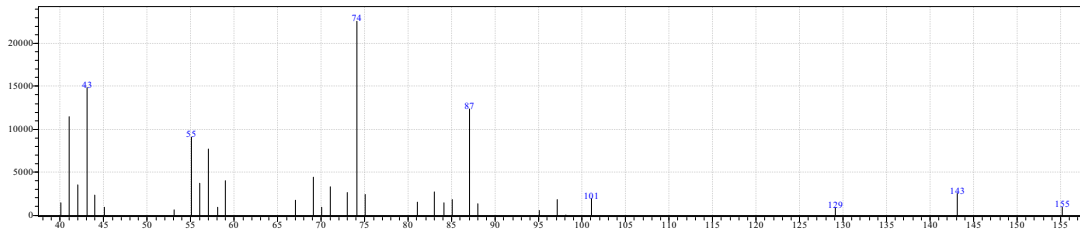
**Figure 2:** Synthesis of the ester derivatives from oleanolic and ursolic acids

## 9 Anexos

### Espectro de massas

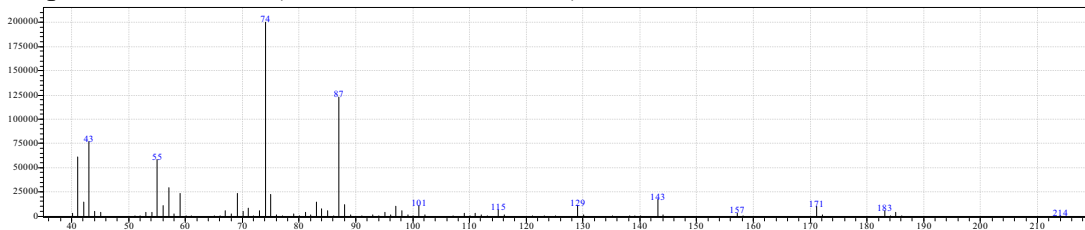
Pico 1 (Tempo de retenção: 2,925 )

Espectro de massas (decanoato de metila)



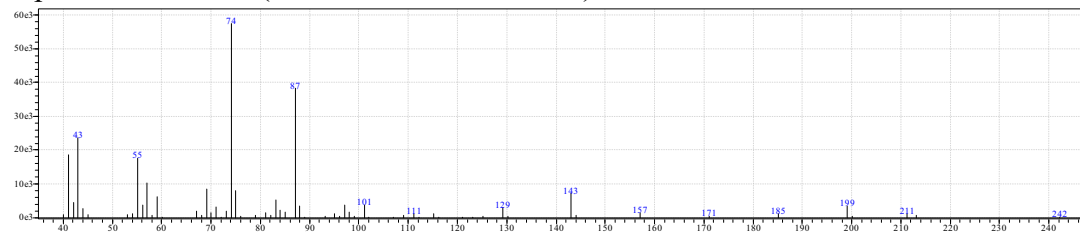
Pico 2 (Tempo de retenção: 4,350):

Espectro de massas (dodecanoato de metila)



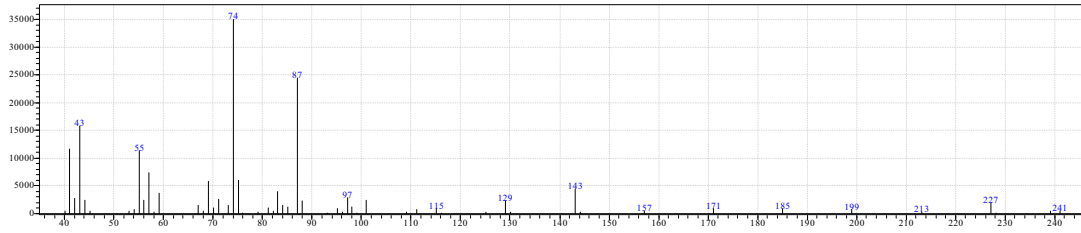
Pico 3 (Tempo de retenção: 6,242)

Espectro de massas (tetradecanoato de metila)



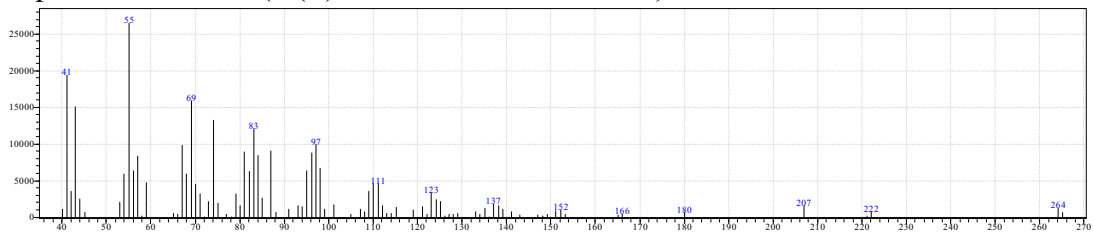
Pico 4 (Tempo de retenção: 8,208)

Espectro de massas (hexadecanoato de metila)



Pico 5: (Tempo de retenção: 9,850)

Espectro de massas (9 (Z)-octadecenoato de metila)



Pico 6: (Tempo de retenção: 10,092)

Espectro de massas (octadecanoato de metila)

