



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**PREPARAÇÃO E BIORREDUÇÃO DE CHALCONAS
UTILIZANDO FERMENTO DE PÃO**

FERNANDA DOS REIS ROCHO

Florianópolis
Novembro/2016

Fernanda dos Reis Rocho

**PREPARAÇÃO E BIORREDUÇÃO DE CHALCONAS UTILIZANDO
FERMENTO DE PÃO**

Projeto de Estágio Supervisionado II (QMC 5512)
efetuado no Laboratório de Biocatálise, sob orientação
da Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Nascimento
e apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis
Novembro/2016

Fernanda dos Reis Rocho

**PREPARAÇÃO E BIORREDUÇÃO DE CHALCONAS UTILIZANDO
FEMENTO DE PÃO**

Prof. Dr. Luciano Vitali
Coordenador de Estágio do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Nascimento

Prof. Dr. Miguel Soriano B. Caro

Prof^a Cristine Saibert

Florianópolis
Novembro/2016

AGRADECIMENTOS

- A toda minha família pelo amor, apoio e incentivo incondicional, sem eles eu dificilmente estaria onde estou hoje.
- A minha orientadora, Profa. Graça, pela amizade, por acreditar em mim, e principalmente pela paciência nesses anos de biocatálise.
- Ao César A. Schaefer que me ajudou muito a realizar este trabalho, e pela grande amizade.
- A Rhannanda Copetti por realizar algumas análises de IV, e ao Prof. Ademir Neves por facilitar o uso do Espectrofotômetro Perkin Elmer FT-IR Spectrofotometer Spectrum 100 em seu Laboratório (QMC 213/215).
- Aos colegas e amigos do laboratório 301/306: Jaque, César, Juana, Manu, Douglas, Paulo, Leandro, Pâmela, e Iasmíny, obrigado pelas conversas, cafés e principalmente pela ajuda.
- Aos meus amigos da “Raça 12/2” que com certeza fizeram dos meus dias, melhores, pelo apoio, incentivo e principalmente pela descontração, com certeza essas amizades iram durar muito tempo.
- A Natália, que é minha melhor amiga, e que me ajudou muito durante esse tempo de graduação, assim como em toda a minha vida.
- A todas as pessoas, que de certa forma, me ajudaram muito a crescer no curso, a seguir meus sonhos e a nunca desistir deles.
- A UFSC, ao Departamento de Química, Central de Análises, CAPES, CNPq e INCT-Catálise, por possibilitarem a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1. Reações de redução <i>via</i> química	10
2.2. Enzimas	11
2.2.1. Classificação das enzimas.....	13
2.2.2. Imobilização de enzimas.....	14
2.3. Chalconas	16
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivos Gerais.....	18
3.1.1. Objetivos Específicos.....	18
4. METODOLOGIA.....	19
4.1. Reagentes e solventes.....	19
4.2. Equipamentos	19
4.3. Procedimento Experimental	20
4.3.1. Síntese das Chalconas	20
4.3.2. Redução com NaBH ₄ / SiO ₂	24
4.3.3. Biotransformação com <i>S. cerevisiae</i>	28
4.3.3.1. Redução em sistema bifásico	28
4.3.3.2. Preparação das microesferas de alginato de cálcio	28
4.3.3.3. Redução das chalconas utilizando FP imobilizado	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
5.1- Preparação das chalconas	30
5.2. Preparação dos álcoois.....	35
5.3. Biotransformação com <i>S. cerevisiae</i>	37
5.3.1. Influência do tipo de fermento na biotransformação da chalcona 7a	37
5.3.2. Biorredução das chalconas.....	39
6. CONCLUSÕES	45
7. PERSPECTIVAS.....	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Diagrama de energia para uma reação catalisada e uma não catalisada por enzima. [6]	12
Figura 2- Representação dos modelos que descrevem a ligação substrato/enzima. (a) chave fechadura (b) ajuste induzido (Adaptado da ref. 9).	13
Figura 3- Técnicas de fixação de enzimas em suportes sólidos usando diferentes métodos: (A) aprisionamento, (B) encapsulação, (C) adsorção e (D) reticulação. [26]	15
Figura 4- Representação do sistema bifásico (SB). [6]	15
Figura 5- Biotransformação da (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona com a levedura <i>S. cerevisiae</i> . [27]	16
Figura 6 - Estrutura dos blocos heteropoliméricos que constituem a molécula de alginato. [31].....	16
Figura 7- Chalconas com atividade anti-HIV.	17
Figura 8- Preparação das esferas de alginato de cálcio.....	29
Figura 9- Chalcona 7I	30
Figura 10- Espectro de infravermelho da 1,3-difenil-2-propen-1-ona (7a). [pastilha de KBr]	32
Figura 11- Espectro de RMN- ¹ H da 1,3-difenil-2-propen-1-ona. [CDCl ₃ , 400MHz]	33
Figura 12- Espectro de RMN- ¹ H da chalcona 7I . [CDCl ₃ , 400MHz].....	34
Figura 13- Espectro de RMN- ¹ H do álcool 8a . [CDCl ₃ , 400MHz]	36
Figura 14- Espectro de infravermelho do álcool (8a). [pastilha de KBr].....	37
Figura 15- Sobreposição de cromatogramas de CG-quiral (Agilent 7820A, coluna Restek RT-BetaDEX-sm,30m x 0.32mmID x 0.25mm df).	38
Figura 16- Espectro de RMN- ¹ H de uma alíquota da reação de redução da chalcona 7e , em sistema bifásico [CDCl ₃ , 400MHz] Conversão: 50%	40
Figura 17- Espectro de RMN- ¹ H da alíquota da reação de redução da chalcona 7i em SB [CDCl ₃ , 400 MHz]. Conversão: 32%	42
Figura 18- Esferas de AG após as reações de biorredução.....	43
Figura 19- Espectro de RMN- ¹ H da alíquota da reação de redução da chalcona 7a com FP imobilizado [CDCl ₃ , 400MHz] Conversão: 5%.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação das enzimas segundo a UIBBM.....	13
Tabela 2- Dados analíticos das chalconas sintetizadas.....	32
Tabela 3- Dados analíticos dos álcoois sintetizados 8a-8l	36
Tabela 4- Avaliação do uso de diversas leveduras na biorredução da chalcona 7a	40
Tabela 5- Biorredução das chalconas 7a-l mediada pela levedura <i>S. cerevisiae</i> em sistema bifásico e imobilizada em alginato de cálcio.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

FP – Fermento biológico de pão

SB – Sistema bifásico

AG – Alginato de cálcio

IV – Infravermelho

RMN-¹H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (ou próton)

HG – Hidrogenação Catalítica

CCD – Cromatografia de camada delgada

R_f – Fator de retenção

CG – Cromatografia gasosa

RESUMO

A utilização de catalisadores tradicionais na síntese orgânica tem sido relacionada a problemas de toxicidade e alto custo. Neste sentido, para minimizar custos e toxicidade, novas alternativas estão sendo exploradas, como por exemplo, a utilização de enzimas que são conhecidas como biocatalisadores. Neste trabalho, foram usadas as enzimas presentes na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, conhecida como fermento biológico de pão (**FP**). Esta levedura contém enzimas da família das oxidoredutases. Para aumentar a estabilidade do **FP** frente a solventes orgânicos e/ou altas temperaturas, este pode ser imobilizado em microesferas de alginato de cálcio (**AG**) e estes sistemas serem usados em reações de biorredução de chalconas. As chalconas são flavonóides que representam um grupo importante de compostos naturais com uma variedade de atividades biológicas, incluindo antibactericida e antifúngica.

No presente trabalho foram preparadas 12 chalconas com diversos grupos substituintes (-H, -4,4'-CH₃, -4,4'-NO₂, -4,4'-OCH₃, -4-Br, -4-Br,2',4'-Cl e -4-Br,2',4'-OCH₃) através de condensação aldólica (condensação de Claisen-Schmidt), utilizando 20 mmol de benzaldeídos substituídos (ou não) e 20 mmol de acetofenonas substituídas (ou não) em 20 mL de etanol absoluto em um erlenmeyer de 125 mL sob agitação magnética constante, com adição de 10 gotas de uma solução de KOH 50% (40-93%). As reações de redução para obtenção dos álcoois racêmicos foram feitas utilizando 1 mmol de NaBH₄, 1g de sílica gel, 0,5 mmol das chalconas **7a – I** e 20 mL de etanol. O sistema foi deixado em agitação magnética e a reação acompanhada por ccd (40-88%).

Nas reações de biorredução das chalconas com **FP**, foi utilizado o sistema bifásico (**SB**) e monofásico, com a levedura imobilizada em microesferas de **AG**. Utilizou-se cerca de 1 mmol das chalconas e 6 g de **FP** comercial (Fleischmann) em um sistema contendo *n*-hexano (30 mL), cloreto de metileno (1 mL) e 30 mL de tampão ácido cítrico/K₂HPO₄, 0,1/0,2 M (pH 5,5) sob agitação magnética por 1h à 35 °C (**SB**). Ao usar o **FP** imobilizado em **AG**, as reações foram realizadas usando as mesmas quantidades de reagentes em *n*-hexano (30 mL) e cloreto de metileno (1 mL) por 24h à 35 °C. As maiores conversões (determinadas por RMN-1H) aos produtos de biorredução, foram obtidos ao usar o **SB**.(>50%)

Todos os substratos e produtos das reações de biorredução, foram caracterizados por RMN-¹H e IV, e os resultados obtidos serão apresentados neste trabalho.

Palavras-chave: chalconas, biorredução, fermento de pão

1. INTRODUÇÃO

As reações mediadas por enzimas e microrganismos, reconhecidas como biocatálise ou biotransformação, têm uma longa história. Na Bíblia, os monumentos egípcios e mesopotâmicos já registravam a fermentação alcoólica da uva, produção da cerveja e o preparo do pão. Todos esses processos tem a ação de enzimas presentes em microrganismos, que são responsáveis pelas transformações bioquímicas. Entretanto, a produção de compostos químicos utilizando biocatalisadores começou a ser reportada na segunda metade do século XIX, época em que a associação entre os microrganismos e o fenômeno químico foi comprovada por Pasteur (1862) e posteriormente por Brown (1886), e aceita com o modelo “chave-fechadura” proposto por Fischer (1894).^{1, 2, 3}

As reações biocatalisadas representam uma extensão das rotas clássicas de síntese com reduções significantes nos impactos ambientais gerados pelos processos químicos clássicos. Seu grande atrativo é o fato de que as reações promovidas por enzimas geralmente ocorrem em temperatura e pressão ambiente e podem ocorrer em meio aquoso, permitindo que a biocatálise também seja uma metodologia explorada no desenvolvimento da química verde. A alta régio e estereosseletividade das reações biocatalisadas pode simplificar os processos industriais, aumentando o rendimento e diminuindo a formação de subprodutos.^{1, 4, 5}

As enzimas apresentam alta eficiência catalítica, o que viabiliza o seu uso em diversos tipos de reações. Por exemplo, as lipases (hidrolases) catalisam as reações de esterificação e transesterificação para a preparação de ésteres de cadeias longas (emulsionantes) e de cadeias curtas (ésteres de aroma). As oxidorreduções são usadas em reações de óxido-redução, em especial de compostos carbonílicos.⁶

Ao longo do tempo as enzimas vêm sendo utilizadas com maior frequência, principalmente na indústria devido ao seu baixo custo e ótima especificidade para determinadas reações. Porém, elas estão sujeitas a inativação em meio orgânico quando não imobilizadas, por fatores químicos, físicos ou biológicos. Além destes fatores, às vezes é necessário a adição de cofatores.⁷

A fim de se minimizar estes efeitos, pode-se realizar a imobilização em algum material, o que também permite a recuperação do catalisador para reuso. Um dos métodos usados para o aprisionamento da enzima é em filmes ou microesferas, que podem ser de diversas procedências tais como o amido, gelatina, ágar ou alginato de cálcio (**AG**).⁸

A partir destas considerações, neste trabalho foram preparadas e caracterizadas chalconas com diferentes grupos substituintes (doadores e retiradores de elétrons, e com rendimento de 40-93%, bem como os correspondentes álcoois a partir da redução com NaBH_4 (Rendimento: 40-88%). A seguir, as chalconas foram utilizadas em reações de biorredução com o **FP** imobilizado em microesferas de **AG** e com o **FP** não imobilizado (sistema bifásico- **SB**).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Reações de redução *via* química

Uma reação de adição de H_2 em cadeias de alcenos é conhecida como hidrogenação ou reação de redução. Uma reação de redução é caracterizada pelo aumento do número de ligações C-H e diminuição das ligações C-O, C-N ou C-X (X = halogênio).⁹

Dentre as várias reações disponíveis para redução de compostos orgânicos, a hidrogenação catalítica (**HC**) – reação de um substrato com H_2 na presença de um catalisador – oferece vantagens de larga aplicabilidade e simplicidade experimental única. A **HC** é usualmente efetuada pela agitação da solução do composto a ser reduzido, com um catalisador heterogêneo e sob atmosfera de gás hidrogênio. O processo de redução pode ser seguido pela medida de consumo de hidrogênio, e o produto bruto de redução é usualmente isolado pela simples filtração do catalisador, seguido pela evaporação do solvente. Pode-se citar também a hidrogenação catalítica homogênea, devido à sua importância na síntese enantiosseletiva. Neste caso, são usados complexos de metais de transição coordenados a ligantes contendo um centro

estereogênico capaz de realizar o reconhecimento quiral do reagente para originar produtos com excesso enantiomérico.¹⁰

Pode-se utilizar também agentes redutores tais como o LiAlH_4 e NaBH_4 , que são os mais utilizados em laboratórios de orgânica para reações de reduções de grupos funcionais. O LiAlH_4 é um agente redutor extremamente poderoso, capaz de reduzir praticamente todos os grupos funcionais orgânicos. Conseqüentemente, é bastante difícil de aplicar este reagente para a redução seletiva de moléculas multifuncionais. Por outro lado, o NaBH_4 é um agente redutor relativamente brando, e utilizado principalmente para a redução de grupos funcionais reativos em solventes próticos. Por consequência, a taxa de redução às vezes é baixa assim como a quimiosseletividade.^{11,12}

Devido ao alto custo de suportes como Pd/C, por exemplo, utilizado na hidrogenação catalítica há uma constante busca por novos catalisadores para reações de redução, tal como o uso de enzimas da família das oxidoredutases, que são consideradas como biocatalisadores. Estas são capazes de reduzir compostos insaturados (ativados ou não) de forma eficiente.^{6,13,14}

2.2. Enzimas

Enzimas são catalisadores biológicos que aumentam a velocidade de algumas reações químicas através da diminuição de sua energia de ativação podendo aumentar a velocidade da reação em um fator de $10^6 - 10^{23}$ em relação a uma reação não catalisada (**Figura 1**).^{9,15}

Todas as reações que ocorrem em sistemas biológicos necessitam de catalisador, sendo as enzimas este catalisador biológico.⁹ Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de ácido ribonucleico (RNA) catalíticos, as enzimas são proteínas formadas por longas cadeias de aminoácidos ligados através de ligações peptídicas e especializadas na catálise de reações biológicas.^{3,16,17}

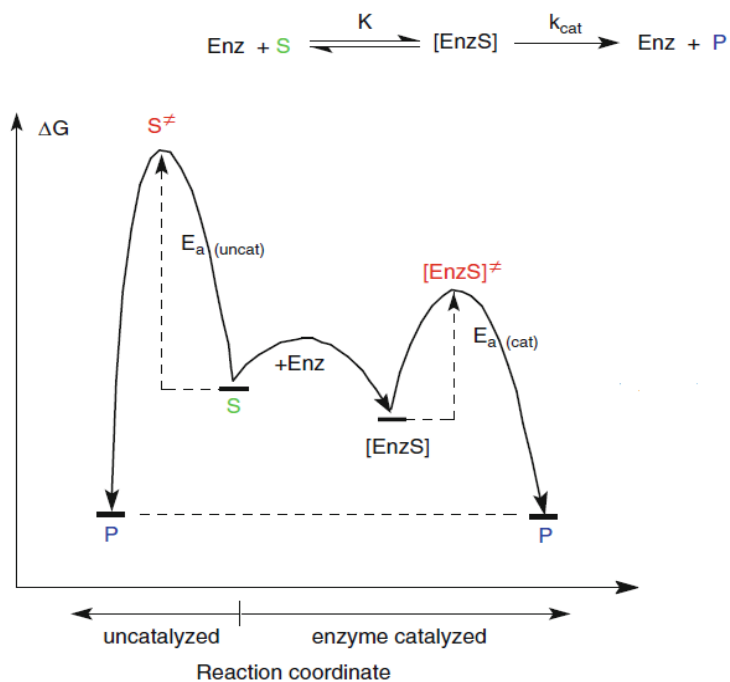


Figura 1- Diagrama de energia para uma reação catalisada e uma não catalisada por enzima.⁶

Todas as enzimas, para atuarem como catalisadores apresentam uma espécie de fenda frequentemente localizada na superfície da estrutura proteica, chamada de sítio ativo. O sítio ativo é uma pequena porção da enzima composta por determinados resíduos de aminoácidos cujas cadeias laterais formam uma superfície tridimensional que pode ser complementar ao substrato e que é essencial para a atividade catalítica. O substrato liga-se às enzimas através do sítio ativo para a formação do complexo enzima-substrato, sendo que esta ligação pode ser por meio de interações eletrostáticas, de Van der Waals e de ligações de hidrogênio.^{17,18}

A formação do complexo "enzima-substrato" pode ser descrita por dois modelos, o modelo chave-fechadura onde o substrato liga-se ao sítio ativo cujo formato complementa o seu, como uma chave na fechadura (**Figura 2a**), e o do ajuste induzido, que considera que o substrato vai induzir uma mudança conformacional na estrutura da enzima, resultando em um encaixe complementar depois que o substrato é ligado (**Figura 2b**).^{9,17,18}

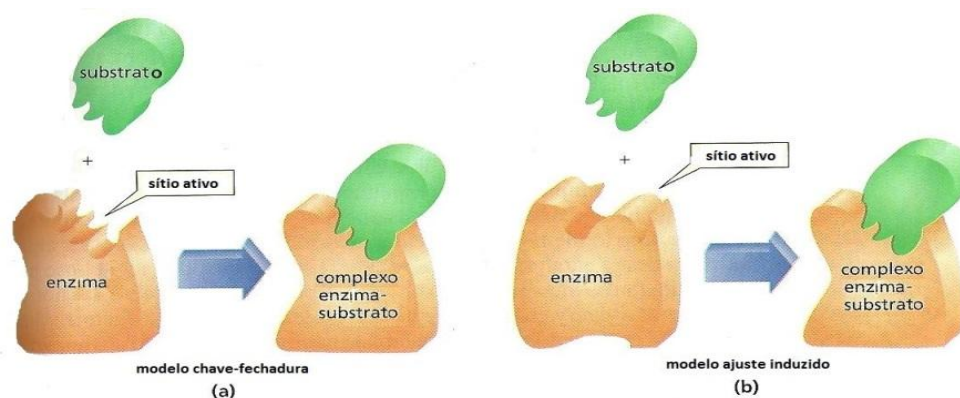


Figura 2- Representação dos modelos que descrevem a ligação substrato/enzima. (a) chave fechadura (b) ajuste induzido (Adaptado da ref. 9).

As enzimas podem ser utilizadas nos processos biocatalíticos tanto na forma isolada como na de células integras, sendo dependentes de alguns fatores tais como o tipo de reação, cofatores e pH. São protagonistas em processos bioquímicos atuando de forma organizada, sendo capazes de transformar precursores simples em macromoléculas biológicas e catalisam centenas de etapas em reações biológicas com geração de energia para o organismo. ^{6,18,19}

2.2.1. Classificação das enzimas

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM) divide as enzimas em seis grupos, e cada uma dessas dividem-se em subgrupos conforme as reações que catalisam, e estão apresentadas na **Tabela 1**.

Tabela 1- Classificação das enzimas segundo a UIBBM. ^{6,17,18}

Classe	Utilização na biocatálise	Reações
1-Oxidoredutases	24 %	Oxidação-redução.
2-Transferases	6 %	Transferência de grupos funcionais.
3-Hidrolases	55 %	Hidrólise de grupos funcionais.
4-Liases	12 %	Adição ou remoção de grupos.
5-Isomerases	2 %	Rearranjo intramolecular.
6-Ligases	1 %	Formação de ligações C-O, C-S, C-N ou C-C.

Com 24 % do total de utilizações, as oxidoredutases são a segunda maior classe de enzimas utilizadas como biocatalisadores em transformações químicas, sendo inferiores às hidrolases (55%).^{3,6}

Na classe das oxidoredutases, há uma subdivisão com três categorias; redutases, oxigenases e oxidases.⁶ Alguns microorganismos como *Sacharomyces cerevisiae*, conhecido como fermento de pão (**FP**) são capazes de produzir pão, vinho, cervejas, fármacos e outros produtos industriais devido à presença de oxirredutases no interior celular.¹⁸

As leveduras *S. cerevisiae* são utilizadas na biocatálise na forma de células íntegras, que são microrganismos provenientes da biodiversidade, ou ainda leveduras geneticamente modificadas, sendo o biocatalisador mais popularmente utilizado na redução de compostos carbonílicos.^{6,20,21} Entretanto, nos processos biocatalíticos também são utilizadas enzimas na forma isolada. A escolha na utilização de enzimas isoladas ou células íntegras depende de alguns fatores, tais como o tipo de reação, reciclagem de cofatores e a escala em que as transformações são realizadas.^{1,6,8,22}

Para utilizar estes biocatalisadores em meios não aquosos, tem-se utilizado as técnicas de imobilização.

2.2.2. Imobilização de enzimas

As enzimas e os microrganismos estão sujeitos a inativação por fatores físicos, químicos ou biológicos, devido a estocagem ou mesmo durante o uso. O desenvolvimento de técnicas de imobilização de enzimas e/ou microrganismos, visa minimizar os efeitos causados pelo seu uso em ambientes adversos, tais como solventes orgânicos, variações no pH e/ou altas temperaturas, e ao mesmo tempo melhorar as propriedades das enzimas como a seletividade e especificidade.^{6,23}

As enzimas podem ser imobilizadas por vários métodos, baseados no tipo de interação entre a enzima e o suporte, podendo ser física, onde há uma interação mais fraca, como uma adsorção, e química onde há a formação de ligação covalente. Dentre os métodos físicos destacam-se o aprisionamento em gel (inclusão), microencapsulação em membrana sólida e adsorção física ou iônica. Dentre os métodos químicos, cita-se a reticulação (ou crosslinking),

com a utilização de um reagente multifuncional de baixa massa molar (por ex. glutaraldeído) e co-reticulação com outro componente neutro, como uma proteína. A **Figura 3** mostra alguns dos principais métodos de imobilização de enzimas.^{23,24,25}

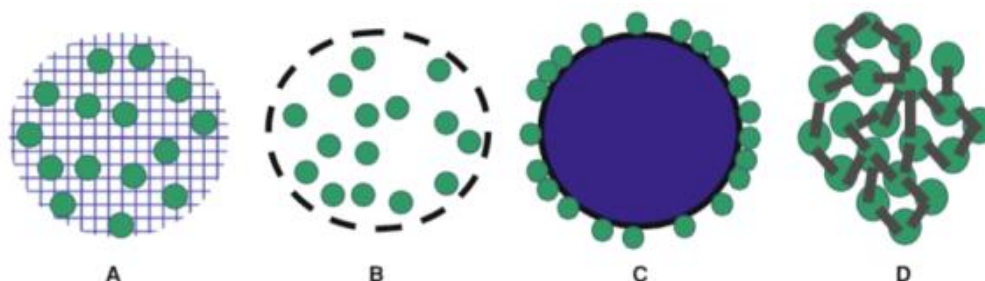


Figura 3- Técnicas de fixação de enzimas em suportes sólidos usando diferentes métodos: (A) aprisionamento, (B) encapsulação, (C) adsorção e (D) reticulação.²⁶

Dentre alguns materiais que podem ser utilizados como suportes na imobilização de enzimas cita-se a bucha vegetal, filmes de amido ou de polímeros sintéticos, gel de ágar, alginato de cálcio e o sistema bifásico (**SB**).

O sistema bifásico (**SB**) também pode ser considerado um método de imobilização, apesar de não apresentar uma barreira física entre o catalisador e o meio reacional. Esse sistema é formado por uma fase aquosa onde se encontra o biocatalisador e uma fase orgânica onde está o substrato de interesse. Entretanto, este sistema necessita de agitação mecânica contínua para possibilitar que a reação ocorra^{6,20,27,28} (**Figura 4**).

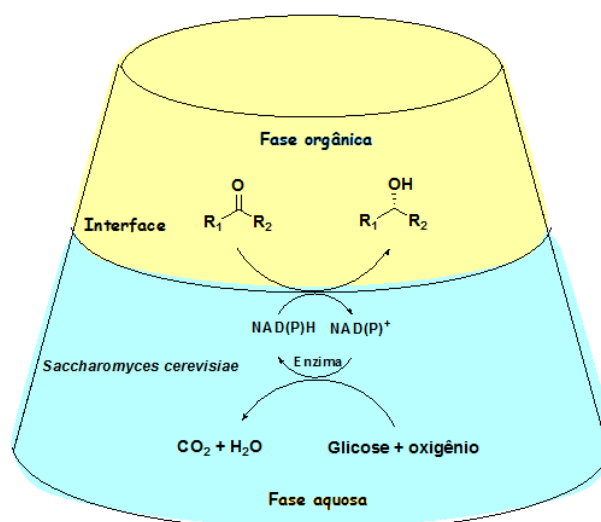


Figura 4- Representação do sistema bifásico (**SB**).⁶

Zampieri *et al.* realizaram a biotransformação da (*Z*)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona utilizando a levedura *S. cerevisiae* em **SB** (**Figura 5**).²⁷

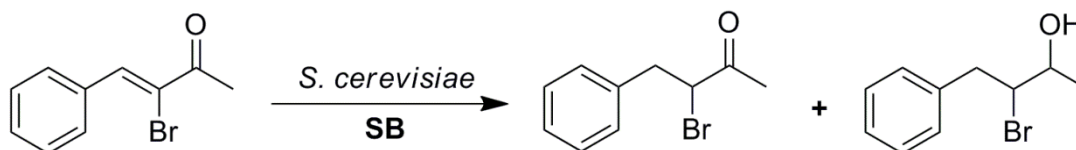


Figura 5- Biotransformação da (*Z*)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona com a levedura *S. cerevisiae*.²⁷

Neste projeto, o alginato de cálcio foi escolhido como agente de imobilização do **FP** devido ao seu baixo custo, alta afinidade com água e capacidade de formar géis estáveis sob condições amenas.^{13,29} O alginato de cálcio, é um polissacarídeo obtido de algas marinhas e compostos dos derivados dos açúcares D-manuronato e o L-guluronato, sendo estas as unidades dos ácidos manurônico e gulurônico (**Figura 6**).^{30,31}

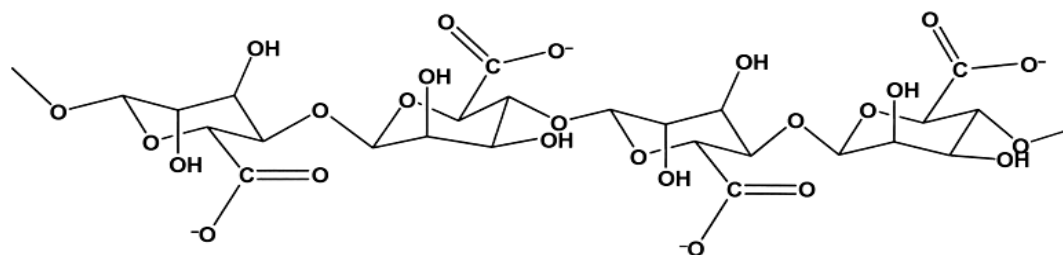


Figura 6 - Estrutura dos blocos heteropoliméricos que constituem a molécula de alginato.³¹

As microesferas de alginato de cálcio com fermento de pão imobilizado podem ser utilizadas em reações de biorredução de chalconas e bis-chalconas.^{13,29,32}

2.3. Chalconas

As chalconas (**1**) são definidas como cetonas α,β -insaturadas em que tanto a carbonila quanto o fragmento olefínico estão ligados ao anél aromático, apresentam o esqueleto $C_6C_3C_6$ considerado privilegiado no desenho de fármacos.³³ São compostos precursores da via de biossíntese dos flavonóides, encontrados largamente nos vegetais, principalmente nas pétalas das flores.³⁴

Na natureza estão presentes na maioria das vezes como agliconas (a parte não-açúcar de glicosídeos) e são comumente encontradas em plantas e como outros flavonóides, fazem parte da dieta humana. As chalconas

apresentam inúmeras aplicações, como em pesticidas, fotoprotetores em plásticos, protetor solar, aditivos alimentares, bem como agentes anti-inflamatório, anti-HIV e anti-cancêr.^{35,36,37}

Cole e col., realizaram estudos com várias chalconas, sendo avaliada a influência de diferentes grupos substituintes no anel aromático. Os compostos **i** e **ii** apresentaram atividades anti-HIV (**Figura 7**).³⁷

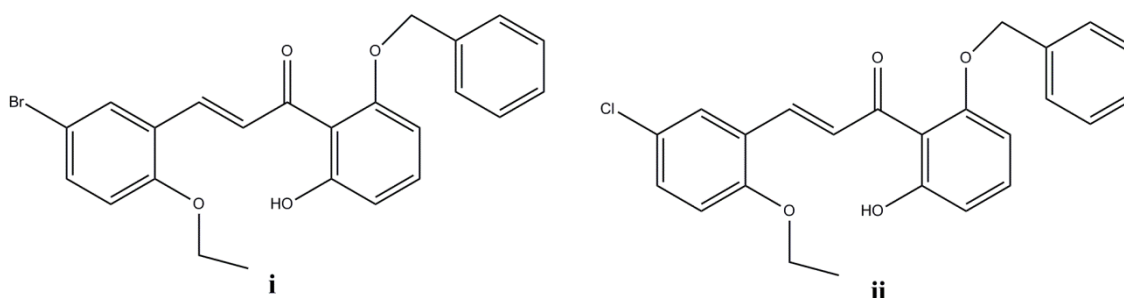
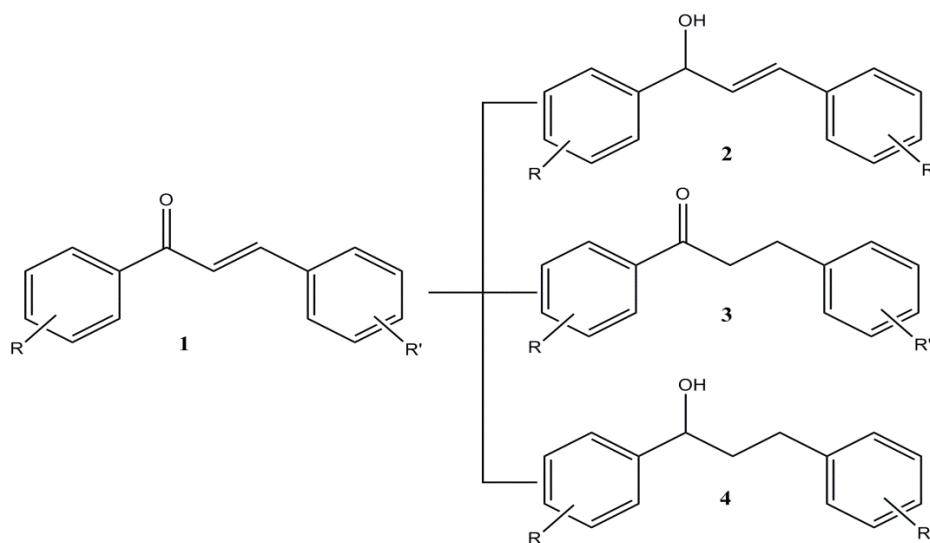


Figura 7- Chalconas com atividade anti-HIV.

A partir da chalcona **1**, pode-se obter diversos produtos de reações de redução, podendo ocorrer a redução da carbonila, da C=C ou dos dois grupos funcionais formando os compostos **2**, **3** e **4**, respectivamente.¹²



Trabalhos disponíveis na literatura, mostraram que com o uso da levedura *S. cerevisiae* ocorre a redução seletiva da ligação C=C.^{20,32,38}

Neste trabalho, será explorada a técnica de imobilização de **FP** em alginato de cálcio, para seu posterior uso em reações de biorredução de chalconas. Para fins comparativos, as reações serão também realizadas em sistema bifásico (**SB**).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Preparar, purificar e caracterizar chalconas e os correspondentes alcoóis racêmicos, com diferentes grupos substituintes. Utilizar estes substratos em reações de biorredução mediada por fermento de pão comercial (levedura *S. cerevisiae*) livre ou imobilizado em microesferas de alginato de cálcio.

3.1.1. Objetivos Específicos

- Preparar, purificar e caracterizar as diferentes chalconas (**7a - I**) por técnicas espectroscópicas de infravermelho (IV) e de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H), e determinar o ponto de fusão.
- Preparar, purificar e caracterizar os alcoóis racêmicos (**8a - I**) por técnicas espectroscópicas de infravermelho (IV) e de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H), e determinar o ponto de fusão.
- Imobilizar o **FP** em microesferas de alginato de cálcio.
- Utilizar os derivados das chalconas **7a - I** nas reações de biorredução mediada por **FP** em **SB** ou imobilizado em alginato de cálcio.
- Caracterizar e quantificar os produtos obtidos nas reações de biorredução mediadas por **FP** utilizando RMN-1H, e nos estudos iniciais por CG.
- Comparar os métodos de biorredução em sistema bifásico e com o **FP** imobilizado.
- Avaliar o efeito dos grupos substituintes utilizando as melhores condições de reação obtidas com a chalcona **7a**. (por comparação com trabalho da literatura).²⁰
- Comparar os resultados obtidos com outros reportados na literatura.

4. METODOLOGIA

4.1. Reagentes e solventes

Os reagentes que foram usados neste trabalho são:

- Álcool etílico absoluto P.A.: Synth
- Álcool metílico: Cromoline
- Acetato de etila: Reagen
- Diclorometano P.A.: Vetec
- *n*-hexano: Synth
- Boro hidreto de sódio: Aldrich
- Alginato de sódio: Sigma-Aldrich
- Cloreto de cálcio anidro: Vetec
- Sílica gel para cromatografia em camada fina 60G - Vetec (700-800 mesh)
- Fermento biológico de pão: Marca comercial Fleischmann
- Benzaldeído P.S.: Vetec
- Acetofenona: Riedel
- Hidróxido de potássio P.A.: Biotec
- 4-Nitrobenzaldeído 98%: Aldrich
- 4-Metilbenzaldeído: Merck
- 4-Metoxibenzaldeído 98%: Aldrich
- 4-Nitroacetofenona 98%: Aldrich
- 4-Metilacetofenona 95%: Aldrich
- 4-Metoxiacetofenona: Merck
- 4-Bromoacetofenona 98%: Aldrich
- 2,4-Diclorobenzaldeído 98%: Merck
- 2,4-Dimetóxi-benzaldeído 98%: Aldrich

4.2. Equipamentos

Os equipamentos que foram utilizados neste trabalho são:

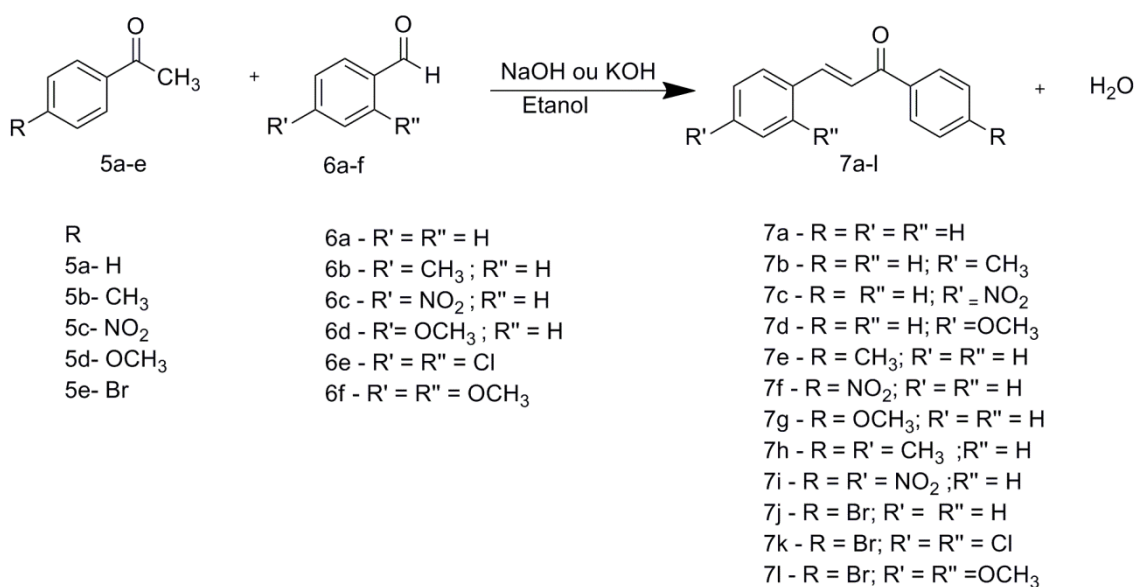
- Espectrômetro de RMN-1H: Varian AC 400F, 400MHz usando tetrametilsilano como referência interna (TMS, $\delta =$ ppm)
- Espectrofotômetro de infravermelho: Bruker ALPHA FT-IR spectrometer
- Espectrofotômetro Perkin Elmer FT-IR Spectrofotometer Spectrum 100

- Polarímetro Polatronic E: Schimidt – Haensch
- Cromatógrafo a gás (CG Agilent Tecnologia 7820A), equipado com coluna quiral Restek RT-BetaDEX-sm, 30m x 0.32mmID x 0.25mm df)
- Aparelho de ponto de fusão: Micro Química – APF301
- Agitadores magnéticos: Dist e/ou Micro Química
- Rotaevaporador: R II Buchi
- Balanças analíticas: Adventurer Ohaus-AR2140 e AND-EK200i

4.3. Procedimento Experimental

4.3.1. Síntese das Chalconas

As chalconas (**7a-l**) foram preparadas por condensação aldólica, utilizando aldeídos e cetonas aromáticos contendo grupos doadores e/ou retiradores de elétrons, tais como metóxi, nitro, metil, bromo e cloro. As reações foram efetuadas na presença de solução de hidróxido de sódio (NaOH) ou hidróxido de potássio (KOH). Os procedimentos experimentais basearam-se em trabalhos clássicos reportados na literatura, com algumas adaptações.^{12,39}



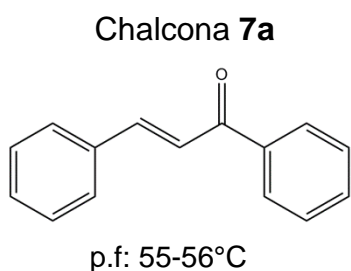
Esquema 1- Preparação das chalconas **7a-7l**.

As reações foram feitas utilizando 20 mmol de benzaldeídos (**6a – f**) substituídos ou não, e 20 mmol de acetofenonas (**5a – e**) substituídas em 20 mL de etanol absoluto em um erlenmeyer de 125 mL sob agitação magnética constante. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur foram adicionadas algumas gotas de uma solução 50 % de KOH. As reações foram monitoradas por cromatografia de camada delgada (**CCD**), utilizando diferentes proporções de misturas *n*-hexano:acetato de etila (7:3 e 6:4) como eluente.

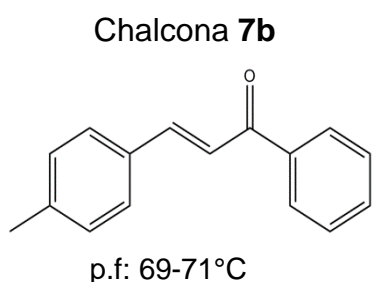
Após o término das reações, estas foram mantidas sob refrigeração por aproximadamente 24 h para total precipitação e, posteriormente filtradas em um funil de Büchner, lavando o filtrado com pequenas quantidades de etanol absoluto gelado.^{12,39}

Depois de filtrar, os compostos são colocados em um dessecador, e após estarem devidamente secos, foram pesados para se determinar o rendimento. As caracterizações foram feitas pela determinação dos pontos de fusão, IV e RMN-¹H e através de comparações com trabalhos reportados na literatura.

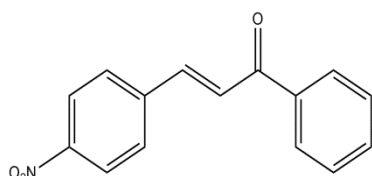
Os espectros de RMN-¹H e IV das chalconas **7a - I** encontram-se no **ANEXO**. Os dados espectroscópicos são apresentados a seguir.



IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3083 (f), 3053 (f), 3024 (f), 1664 (F), 1607 (F), 1574 (F), 750 (mF), 687 (F); RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,31 (d, 2H), 7,41 (m, 3H), 7,54 (d, 1H, H α , J = 15.7 Hz), 7,64 (m, 3H), 7,81 (d, 1H, H β , J = 15.7 Hz), 7,94 (d, 2H).

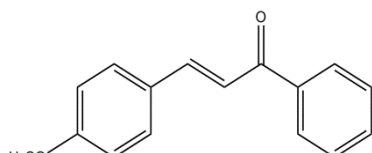


IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3057 (f), 3026 (f), 1656 (F), 1594 (F), 1570 (F), 707 (F), 687 (F); RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2,44 (s, 3H), 7,31 (d, 2H), 7,42 (m, 3H), 7,54 (d, 1H, H α , J = 15.7 Hz), 7,65 (dd, 2H), 7,81 (d, 1H, H β , J = 15.7 Hz), 7,94 (d, 2H).

Chalcona **7c**

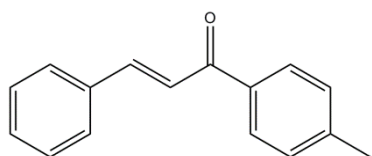
p.f: 145-147°C

IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3106 (f), 3075 (f), 1660 (F), 1609 (F), 1597 (F), 1513 (F), 1340 (F), 783 (f), 746 (F);
 RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,54 (t, 2H), 7,61(m, 2H), 7,65 (d, 1H, H_α , $J = 15.5$ Hz), 7.82 (m, 2H, H_β , $J = 16.1$ Hz), 8,04 (d, 2H), 8,28 (d, 2H).

Chalcona **7d**

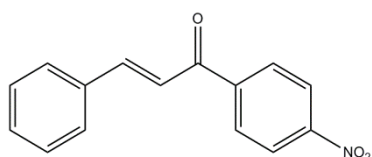
p.f: 68-69°C

IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3057 (f), 3014 (f), 2953 (f), 2839 (f), 1658 (F), 1599 (mF), 1576 (F), 779 (F), 722 (F);
 RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3,84 (s, 3H, OCH_3), 6,94 (d, 2H), 7.42 (d, 1H, H_α , $J = 15.6$ Hz), 7,50 (t, 2H), 7,58 (m, 3H), 7.79 (d, 1H, H_β , $J = 15.7$ Hz), 8,01(d, 2H).

Chalcona **7e**

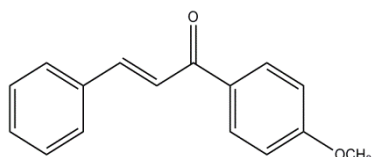
p.f: 104-105°C

IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3049 (f), 3022 (f), 3000 (f), 1656 (F), 1599 (mF), 1566 (f), 775 (f), 693 (f); RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2,40 (s, 3H, CH_3), 7,23 (d, 2H), 7,52-7,45 (m, 4H), 7.56 (d, 1H, H_α , $J = 15.8$ Hz), 7.80 (d, 1H, H_β , $J = 15.7$ Hz), 8,02 (d, 2H).

Chalcona **7f**

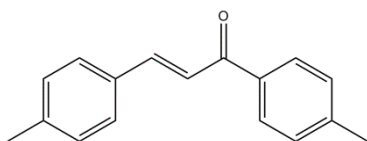
p.f: 135-137°C

IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3106 (f), 3075 (f), 1660 (m), 1609 (m), 1597 (f), 1513 (F), 1340 (F), 783 (m), 776 (m); RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,46 (d, 2H), 7,49 (d, 1H, H_α , $J = 15.9$ Hz), 7,73-7,59 (m, 3H), 7.85 (d, 1H, H_β , $J = 15.7$ Hz), 8,15 (d, 2H), 8,36 (d, 2H).

Chalcona **7g**

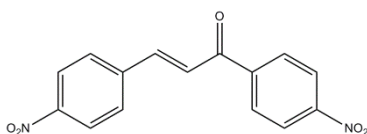
p.f: 89-91°C

IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3075 (f), 3055 (f), 2973 (f), 2935 (f), 2841 (f), 1659 (F), 1601 (F), 1572 (F), 792 (F), 730 (F); RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3,87 (s, 3H, OCH_3), 6,98 (d, 2H), 7,40-7,41 (m, 3H), 7.55 (d, 1H, H_α , $J = 15.7$ Hz), 7,62-7,64 (m, 2H), 7.80 (d, 1H, H_β , $J = 15.7$ Hz), 8,04 (d, 2H).

Chalcona **7h**

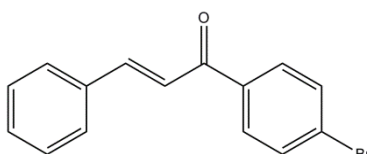
p.f: 90-91°C

IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3030 (f), 2973 (f), 1654 (F), 1592 (mF), 1566 (F) 734 (F), 677 (f); RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2,39 (s, 3H, CH_3), 2,44 (s, 3H, CH_3), 7,23 (d, 2H), 7,30 (d, 2H), 7,50 (d, 1H, H_α , $J = 15.7$ Hz), 7,55 (d, 2H), 7,79 (d, 1H, H_β , $J = 15.7$ Hz), 7,93 (d, 2H).

Chalcona **7i**

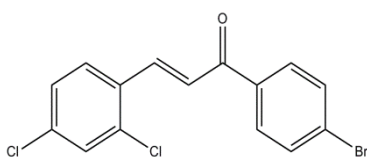
p.f: 160-162°C

IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3112 (f), 3081 (f), 2935 (f), 2853 (f), 1696 (F), 1672 (F), 1601 (F), 1519 (mF), 1346 (mF), 787 (F), 744 (f); RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.54 (d, 1H, H_α , $J = 15.7$ Hz), 7,75 (d, 2H), 7.81 (d, 1H, H_β , $J = 15.7$ Hz), 8,04 (d, 1H), 8,11 (d, 1H), 8,27-8,22 (m, 3H), 8,32 (d, 2H).

Chalcona **7j**

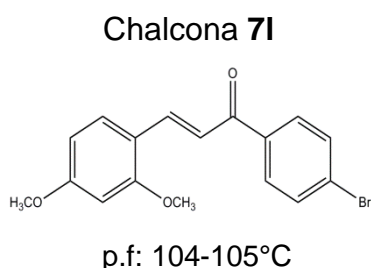
p.f: 99-100°C

IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3079 (f), 3054 (f), 3030 (f), 3021 (f), 1655 (F), 1598 (mF), 1579 (F), 754 (F), 719 (F); RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,45-7,40 (m, 3H), 7.48 (d, 1H, H_α , $J = 15.7$ Hz), 7,65 (dd, 4H), 7.82 (d, 1H, H_β , $J = 15.7$ Hz), 7,90 (dd, 2H).

Chalcona **7k**

p.f: 92-93°C

IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3091 (f), 3055 (f), 3027 (f), 2925 (f), 1654 (F), 1597 (F), 1583 (F), 744 (f), 731 (m); RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,31 (dd, 1H), 7.42 (d, 1H, H_α , $J = 15.7$ Hz), 7,48 (d, 1H), 7,65 (d, 2H), 7,68 (d, 1H), 7,88 (d, 2H), 8.11 (d, 1H, H_β , $J = 15.7$ Hz).

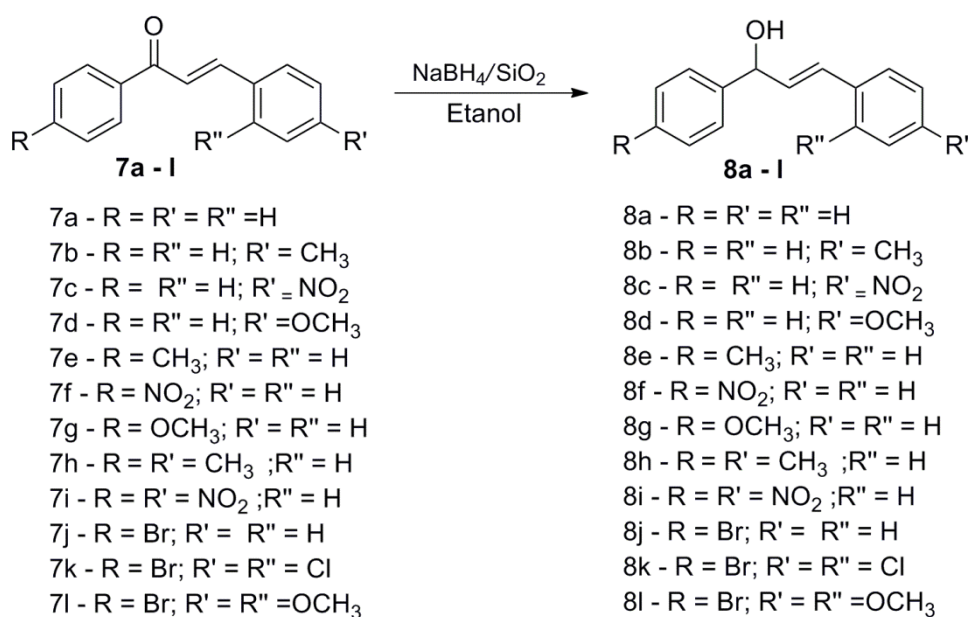


IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3016 (f), 2999 (f), 2956 (f), 2939 (f), 2885 (f), 2834 (f), 1651 (F), 1588 (mF), 1575 (mF), 783 (F), 744 (m); RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3,86 (s, 3H, OCH_3), 3,90 (s, 3H, OCH_3), 6,46 (d, 1H), 6,54 (dd, 1H), 7,48 (d, 1H, H_α , $J = 15.7$ Hz), 7,57 (d, 1H), 7,62 (d, 2H), 7,87 (d, 2H), 8,05 (d, 1H, H_β , $J = 15.7$ Hz).

4.3.2. Redução com $\text{NaBH}_4/\text{SiO}_2$

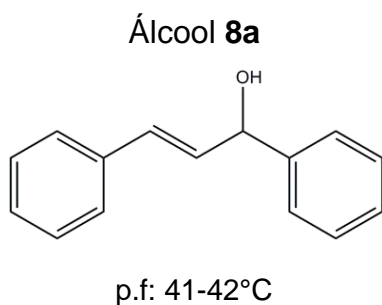
Em um erlenmeyer adicionou-se 1 mmol (32 g) de NaBH_4 , 1,0 g de sílica gel (700-800 mesh) ; 0,5 mmol (1,2 g) das chalconas **7a – l** e 20,0 mL de etanol absoluto. O sistema foi colocado sob agitação magnética e a reação acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando etanol absoluto como eluente. Após a formação do produto, a solução foi filtrada em funil simples e lavou-se com pequenas quantidades (2 x 20m L) de cloreto de metileno (CH_2Cl_2). A fase orgânica foi rota-evaporada, e as diferentes chalconas reduzidas foram separadas e analisadas posteriormente por IV e RMN- ^1H .

Algumas reações de redução foram realizadas na ausência de sílica.

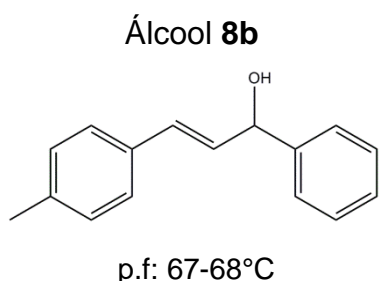


Esquema 2: Reação de redução *via* química das chalconas **7a - l**.

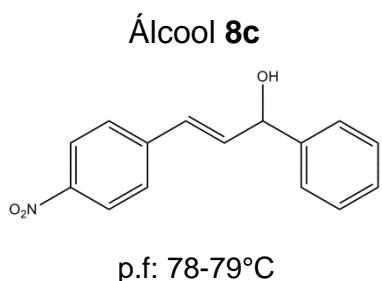
Os espectros de RMN-¹H e IV dos álcoois **8a - I** encontram-se no **ANEXO**. Os dados espectroscópicos são apresentados a seguir.



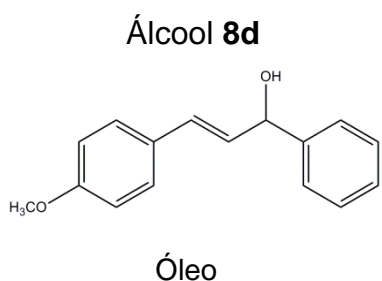
IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3355 (m), 3081 (f), 3057 (f), 3026 (f), 2924 (f), 2855 (f), 1599 (f), 1576 (f), 744 (F), 693 (F); RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2,12 (s, 1H, OH), 5,40 (d, 1H, J = 6,3 Hz), 6,39 (dd, 1H, H α , J = 15,8, 6,5 Hz), 6,70 (d, 1H, H β , J = 15,8 Hz), 7,48 – 7,16 (m, 10H).



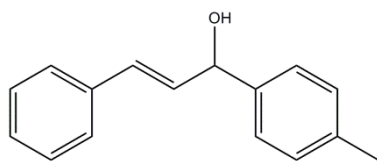
IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3327 (F), 3021 (f), 2899 (f), 2862 (f), 1502 (F), 1490 (m), 828 (m), 743 (F); RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2,35 (s, 3H, CH₃), 5,35 (d, 1H, J = 6,2 Hz), 6,38 (dd, 1H, H α , J = 15,8, 6,4 Hz), 6,68 (d, 1H, H β , J = 15,8 Hz), 7,54 – 7,08 (m, 9H).



IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3334 (F), 3108 (f), 3081 (f), 1597 (F), 1509 (F), 1342 (F), 764 (F), 744 (F); RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5,45 (d, 1H, J = 5,2 Hz), 6,57 (dd, 1H, H α , J = 15,9, 5,8 Hz), 6,79 (d, 1H, H β , J = 15,8 Hz), 7,46 – 7,28 (m, 5H), 7,52 (d, 2H), 8,17 (d, 2H).

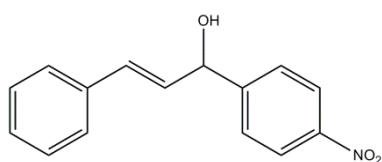


IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3471 (m), 3031 (f), 2947 (f), 2825 (f), 1606 (F), 1578 (m), 837 (F), 743 (m); RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3,74 (s, 3H, OCH₃), 5,28 (d, 1H, J = 6,7 Hz), 6,20 (dd, 1H, H α , J = 15,8, 6,8 Hz), 6,55 (d, 1H, H β , J = 15,8 Hz), 6,80 (d, 2H), 7,06 (d, 1H), 7,46 – 7,15 (m, 6H).

Álcool **8e**

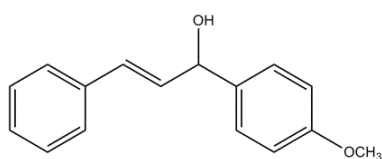
Óleo

IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3462 (m), 3033 (F), 2923 (f), 2862 (f), 1612 (F), 1575 (f), 816 (F), 755 (F); RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2,32 (s, 3H, CH_3), 5,35 (d, 1H, $J = 6.6$ Hz), 6,32 (dd, 1H, H_α , $J = 15,8, 6,7$ Hz), 6,63 (d, 1H, H_β , $J = 15.8$ Hz), 7,57 – 6,97 (m, 9H).

Álcool **8f**

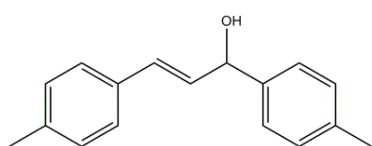
p.f: 56-58°C

IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3481 (F), 3078 (f), 3040 (f), 2872 (f), 2834 (f), 1596 (F), 1569 (m), 1512 (F), 1334 (F), 790 (m), 734 (m); RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2,25 (s, 1H, OH), 5,50 (d, 1H, $J = 7.1$ Hz), 6,30 (dd, 1H, H_α , $J = 15.8, 7.1$ Hz), 6,73 (d, 1H, H_β , $J = 15.8$ Hz), 7,45 – 7,15 (m, 5H), 7,62 (d, 2H), 8,23 (d, 2H).

Álcool **8g**

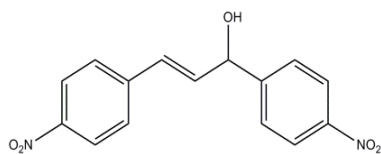
Óleo

IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3397 (F), 3021 (f), 2947 (f), 2909 (f), 2834 (f), 1606 (F), 1587 (m), 771 (F), 753 (F); RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3,77 (s, 3H, CH_3), 5,28 (d, 1H, $J = 5.3$ Hz), 6,36 (dd, 1H, H_α , $J = 15.8, 6.4$ Hz), 6,62 (d, 1H, H_β , $J = 15,8$ Hz), 6,95 – 6,77 (m, 3H), 7,47 – 7,02 (m, 6H).

Álcool **8h**

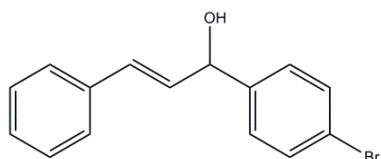
p.f: 45-46°C

IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3021 (f), 2928 (f), 2852 (f), 800 (F), 715 (f); RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2,32 (s, 3H, CH_3), 2,35 (s, 3H, CH_3), 5,34 (d, 1H, $J = 6.5$ Hz), 6,33 (dd, 1H, H_α , $J = 15.8, 6.5$ Hz), 6,64 (d, 1H, H_β , $J = 15.8$ Hz), 7,11 (d, 2H), 7,18 (d, 2H), 7,35 – 7,25 (m, 4H).

Álcool 8i

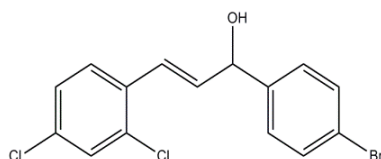
p.f: 40-42°C

IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3437 (F), 3106 (f), 3058 (f), 2935 (f), 1600 (m), 1514 (F), 1343 (F), 841 (F), 743 (m); RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.56 (d, 1H, J = 5.6 Hz), 6.48 (dd, 1H, H α , J = 15.9, 6.4 Hz), 6.82 (d, 1H, H β , J = 15.9 Hz), 7.70 – 7.45 (m, 4H), 8.36 – 8.12 (m, 4H).

Álcool 7j

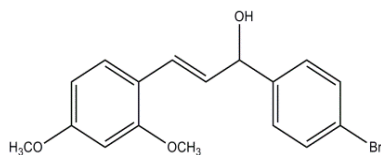
p.f: 51-52°C

IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3313 (F), 3060 (f), 3032 (f), 1579 (m), 1570 (m), 755 (F), 679 (F); RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2,13 (s, 1H, OH), 5.37 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 6.34 (dd, 1H, H α , J = 15.8, 6.7 Hz), 6.69 (d, 1H, H β , J = 15.8 Hz), 7.36 – 7.19 (m, 5H), 7.40 (d, 2H), 7.51 (d, 2H). α = 0,01 [0,05 g/mL, CH₂Cl₂].

Álcool 8k

p.f: 61-63°C

IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3313 (F), 2929 (f), 2854 (f), 1579 (F), 1551 (m), 801 (F), 736 (F); RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2,18 (s, 1H, OH), 5.38 (d, 1H, J = 5.8 Hz), 6.28 (dd, 1H, H α , J = 15.8, 6.5 Hz), 7.02 (d, 1H, H β , J = 15.8 Hz), 7.18 (dd, 1H), 7.31 (d, 2H), 7.40 (m, 2H), 7.50 (d, 2H). α = 0,00 [0,05 g/mL, CH₂Cl₂].

Álcool 8l

p.f: 102-103°C

IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3341 (F), 2967 (f), 2929 (f), 2826 (f), 1617 (F), 1589 (F), 801 (F), 764 (m); RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2,07 (s, 1H, OH), 3,81 (s, 3H, OCH₃), 3,82 (s, 3H, OCH₃), 5.32 (d, 1H), 6.22 (dd, 1H, H α , J = 15.9, 7.3 Hz), 6.44 (d, 2H), 6.91 (d, 1H, H β , J = 15.9 Hz), 7.32 (d, 3H), 7.47 (d, 2H). α = 0,05 [0,05 g/mL, CH₂Cl₂].

4.3.3. Biotransformação com *S. cerevisiae*

Nas reações de biotransformação com **FP** (*S. cerevisiae*), foram testados dois métodos distintos, sendo primeiro o **SB**, que foi amplamente estudado pelo grupo anteriormente.²⁰ Alguns resultados serão comparados com os obtidos neste trabalho. No segundo método, foi utilizado o **FP** imobilizado em microesferas de alginato de cálcio.

4.3.3.1. Redução em sistema bifásico

Em um erlenmeyer de 125 mL, solubilizou-se 1 mmol das chalconas **7a - I** em 30 mL de *n*-hexano e 1 mL de diclorometano, e a seguir adicionou-se 30 mL de solução tampão K₂HPO₄/ácido cítrico (pH 5,5) e 6 g de **FP** (Fleischmann).²⁰ O sistema foi submetido à agitação magnética intensa com temperatura controlada (35 °C) por cerca de 1h.

Foram retiradas alíquotas periodicamente do meio reacional para controle da reação por **CCD** e feita a extração final com diclorometano (2 X 15 mL). A formação ou não dos produtos foi analisada posteriormente por IV e RMN-¹H, e nos estudos iniciais por cromatografia gasosa (**CG**)

4.3.3.2. Preparação das microesferas de alginato de cálcio

Para a preparação das microesferas, foram preparadas duas soluções distintas, sendo umas delas a solução de 2% de alginato de sódio com volume total de 100 mL e a outra, uma solução de cloreto de cálcio 2% com volume total de 50 mL. Na primeira solução, foi adicionado 6 g de **FP** e a mistura foi solubilizada após 1 h com agitação magnética constante. Esta solução foi então gotejada na de cloreto de cálcio usando uma bureta de 10 mL. As microesferas foram separadas da solução com o auxílio de uma peneira e enxugadas com papel toalha.^{29,32} (**Figura 8**)

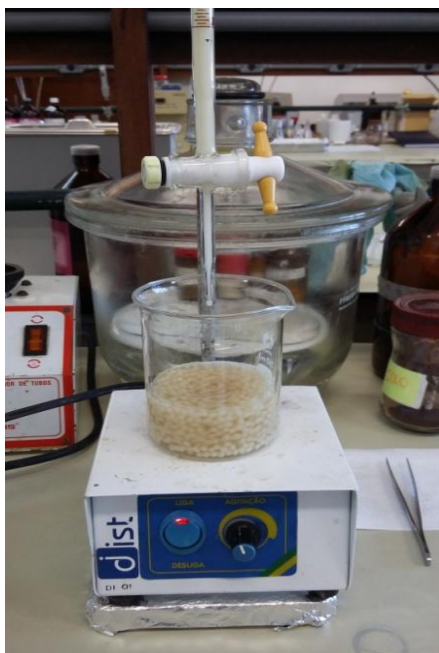
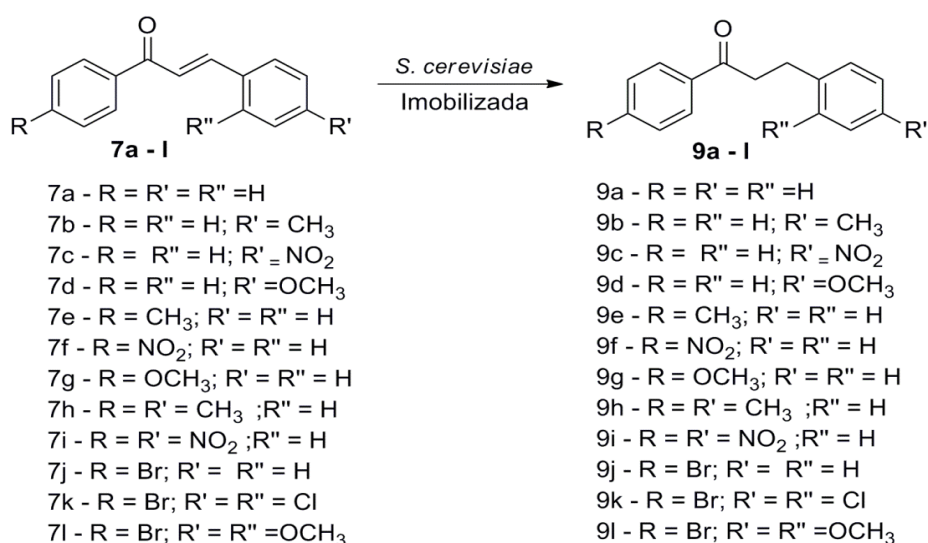


Figura 8 - Preparação das esferas de alginato de cálcio.

4.3.3.3.- Redução das chalconas utilizando FP imobilizado

Em um erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 1 mmol das chalconas **7a-l** juntamente com 30 mL de *n*-hexano e o sistema foi deixado em agitação magnética por cerca de 24 h a 35 °C. As microesferas foram retiradas com a ajuda de uma peneira e lavadas com água destilada. A fase do *n*-hexano foi rota-evaporada para possível obtenção do produto (**Esquema 3**).

A caracterização e quantificação dos produtos foi feita por análises de RMN-¹H.



Esquema 3: Produtos formados nas reações de biorredução das chalconas **7a -7l**.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste item, inicialmente serão apresentados os resultados referentes à preparação e caracterização das chalconas e dos correspondentes alcoóis racêmicos. A seguir, serão discutidos os dados obtidos nas reações de biorredução das chalconas **7a – I** com fermento de pão.

5.1- Preparação das chalconas

As chalconas **7a – I** foram obtidas na forma sólida, com coloração amarela em diferentes tonalidades. Os rendimentos obtidos foram moderados. As chalconas sintetizadas apresentaram boa solubilidade frente à solventes orgânicos, tais como etanol, diclorometano, clorofórmio, acetona e *n*-hexano. A

Figura 9 mostra o sólido correspondente a chalcona **7I**.



Figura 9- Chalcona **7I**.

O tempo de reação foi dependente de cada composto sintetizado, variando entre 1 a 6 h, sendo que para as chalconas com grupos retiradores de elétrons a reação foi mais rápida e para grupos doadores de elétrons a reação mais lenta. Os pontos de fusão obtidos experimentalmente apresentaram-se um pouco diferentes em algumas unidades em °C quando comparados aos dados obtidos na literatura, possivelmente devido a impurezas e/ou método de análise. Algumas chalconas foram recristalizadas utilizando etanol, que é o caso das chalconas com o grupo substituinte NO₂. Somente estas chalconas foram recristalizadas devido a grande quantidade de impureza nestes compostos. As demais foram analisadas por CCD onde apresentaram apenas uma mancha, indicando assim a sua pureza.

A **Tabela 2** apresenta alguns dados obtidos para caracterização das chalconas, bem como os rendimentos e valores de Rf.

Tabela 2- Dados analíticos das chalconas sintetizadas.

Chalcona	Rendimento(%)	Rf ^(a)	Pf (°C) (exp)	Pf (°C) (lit)
7a	64	0,88 ^(a)	55-56	56-57°C ⁴¹
7b	40	0,75 ^(a)	69-71	92-96 ⁴²
7c	64	0,74 ^(b)	145-147	160-163 ⁴¹
7d	66	0,82 ^(b)	68-69	75-77 ⁴¹
7e	50	0,68 ^(a)	104-105	-
7f	45	0,94 ^(b)	135-137	145-147 ⁴³
7g	45	0,84 ^(b)	89-91	104-105 ⁴⁴
7h	64	0,64 ^(a)	89-91	-
7i	44	0,69 ^(b)	160-162	-
7j	78	0,94 ^(b)	99-100	-
7k	81	0,88 ^(b)	92-93	-
7l	93	0,81 ^(b)	104-105	-

(a) *n*-hexano:acetato de etila 7:3 (v:v) (b) *n*-hexano:acetato de etila 6:4 (v:v)

Para todas as chalconas, substituídas ou não, foram realizadas análises de IV, RMN-¹H (400 MHz) e de ponto de fusão como citado na parte experimental.

Na **Figura 10**, é apresentado o espectro de infravermelho da 1,3-difenil-2-propen-1-ona (**7a**).

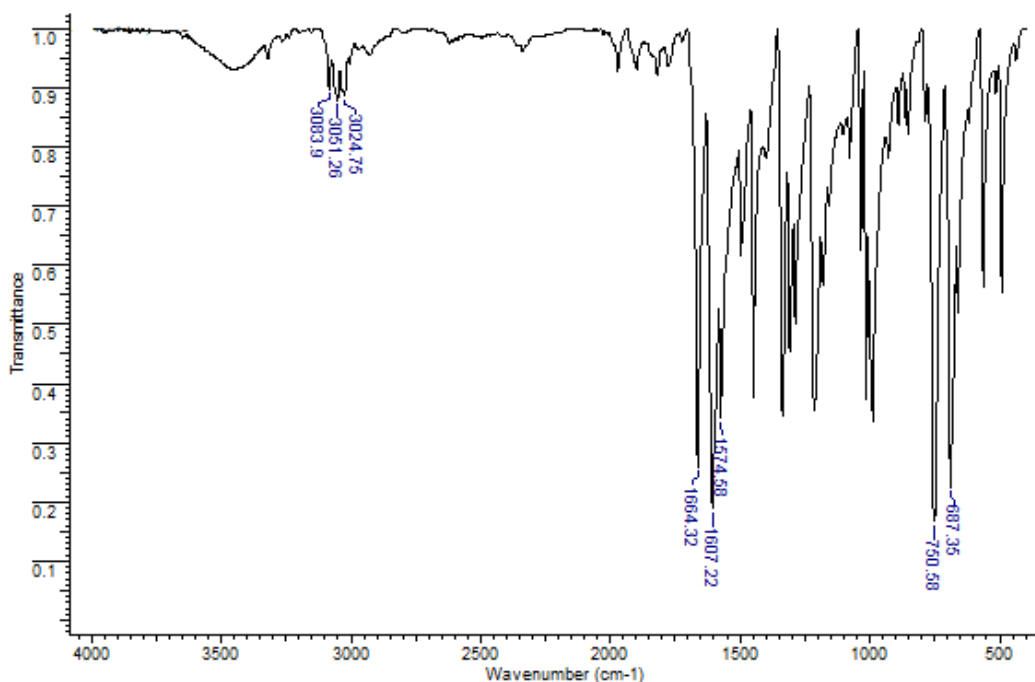


Figura 10- Espectro de infravermelho da 1,3-difenil-2-propen-1-ona (**7a**). [pastilha de KBr]

No espectro de IV do composto **7a**, são observadas as bandas características em 3024 a 3084 cm^{-1} referentes às ligações C-H da ligação dupla. Em 1664 cm^{-1} , observam-se as vibrações de deformação axial da ligação carbono oxigênio da carbonila (C=O) de compostos α,β - insaturados, e em 1607 cm^{-1} e 1574 cm^{-1} as bandas referentes as vibrações de deformação axial da ligação dos carbonos olefínicos conjugados com o grupo carbonila, e que geralmente apresenta duas bandas. De 750 a 687 cm^{-1} , são observadas as bandas características das vibrações de deformação angular fora do plano das ligações carbono hidrogênio do anel aromático, para benzeno monosubstituído. Estes dados são concordantes com os citados na literatura.⁴⁵

Na **Figura 11**, está apresentado o espectro de RMN- ^1H para a 1,3-difenil-2-propen-1-ona (**7a**).

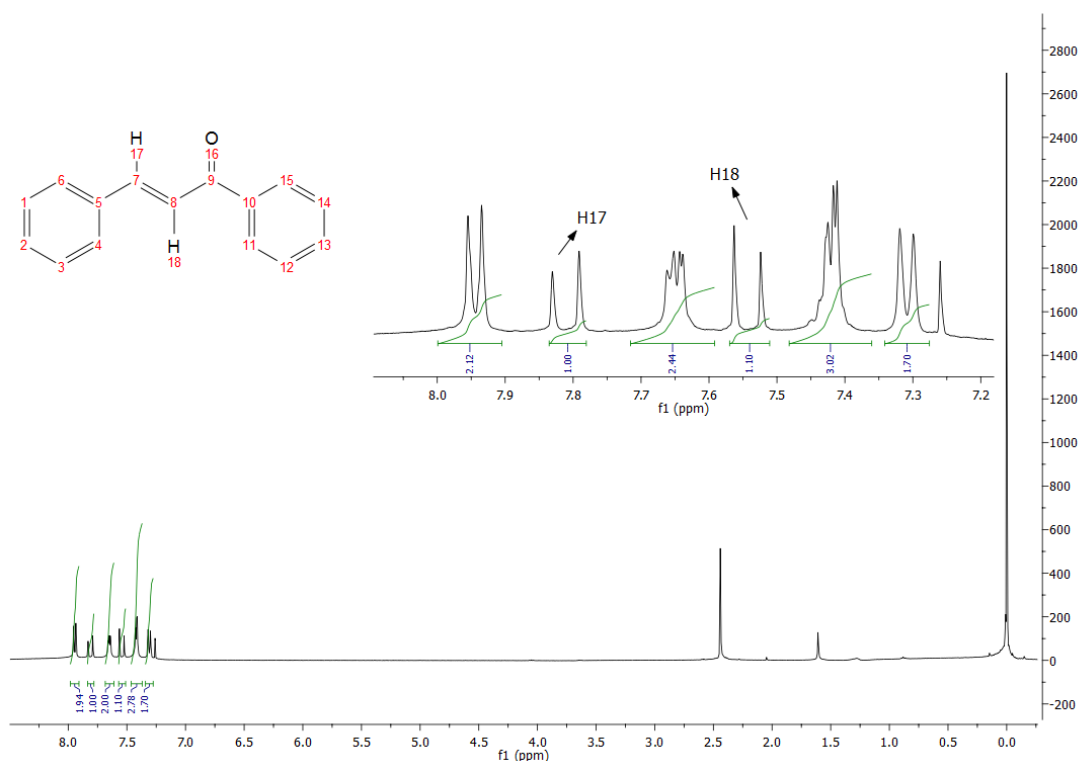


Figura 11- Espectro de RMN-¹H da 1,3-difenil-2-propen-1-ona. [CDCl₃, 400MHz]

Para o composto **7a**, os sinais dos hidrogênios aromáticos se encontram em 7,30 ppm (2H, H4 e H6), 7,43 ppm (3H, H1, H2 e H3), 7,64-7,66 ppm (3H, H12, H13 e H14) e em 7,95 ppm (2H, H11 e H15). Os dubletos centrados em 7,81 (J = 15.7 Hz) e 7,54 (J = 15.7 Hz) ppm são referentes aos hidrogênios H β e H α respectivamente, tendo constantes de acoplamento de aproximadamente 16 Hz, o que é característico de chalconas com isomeria *E* para o grupo funcional alceno deste composto. Pela constante de acoplamento dos hidrogênios olefínicos pode-se afirmar que o composto majoritário (99%), cujo dublete apresenta uma constante de acoplamento de 16,0 Hz é o isômero (*E*)-**7a**. Através das análises realizadas foi possível observar os picos e bandas característicos para a confirmação da estrutura da chalcona sintetizada.

Para as demais chalconas com diferentes grupos substituintes no anel aromático foi observada as mesmas bandas e picos característicos da estrutura, sendo a α,β -insaturação (IV e RMN-¹H) e a presença da carbonila (C=O) no espectro de infravermelho. Para os compostos com grupos substituintes retiradores ou doadores de elétrons, o deslocamento dos picos no espectro de RMN-¹H, se apresentam diferentes dos da chalcona sem substituintes no anel aromático (**7a**). Para as chalconas **7k** e **7l** que

apresentam substituintes na posição R' e R'' como 2,4-Cl e 2,4-OCH₃ respectivamente, o espectro de RMN-¹H se mostra diferente em relação às demais chalconas **7a- j**, pela presença do anel aromático dissustituído, como mostrado na **Figura 12**, para a chalcona **7I**.

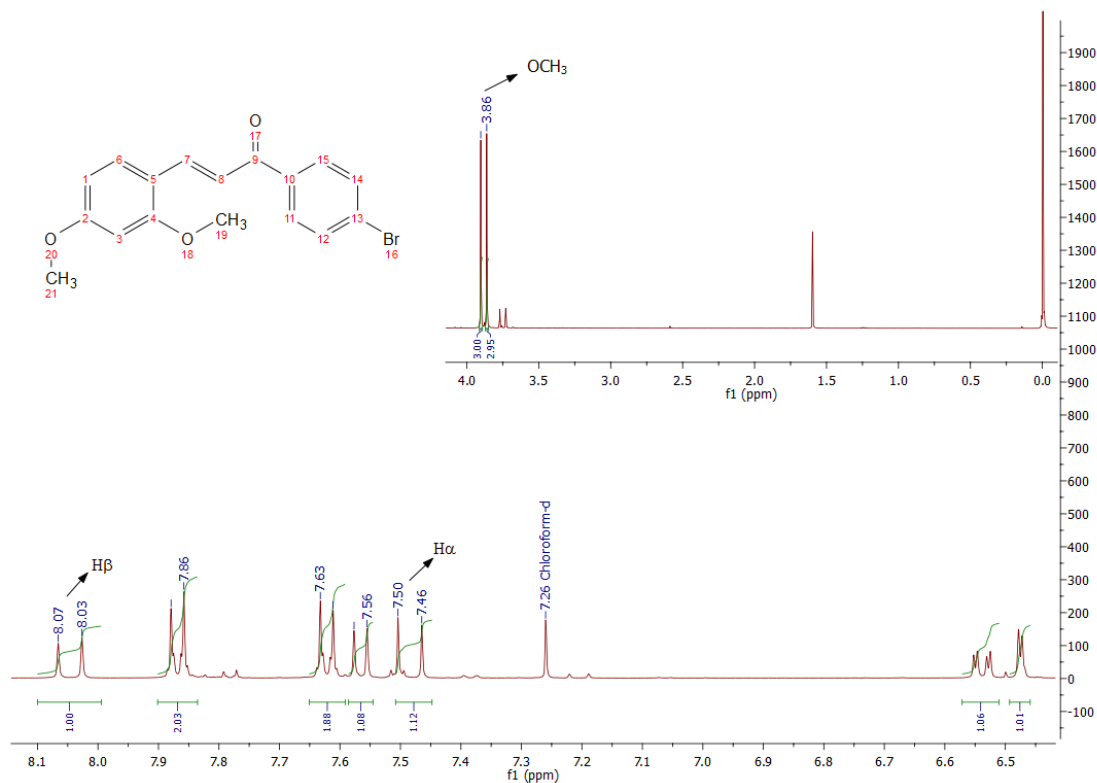


Figura 12- Espectro de RMN-¹H da chalcona **7I**. [CDCl₃, 400MHz]

Observa-se que o hidrogênio β (8,05 ppm) está mais deslocado em relação aos das demais chalconas sintetizadas, provavelmente devido ao grupo bromo ligado ao anel (anel A), que desblinda mais o Hβ. Devido a presença dos dois grupos metóxi no outro anel (anel B), o hidrogênio ligado ao carbono 3 esta mais blindado, e encontra-se na região de 6,46 ppm como um dublete. O mesmo efeito é observado para o hidrogênio ligado ao carbono 1, que encontra-se na região de 6,54 ppm como um duplo-dublete, diferente das chalconas **7a – j**, que apresentam os picos referentes à estes hidrogênios na região de 7,30 ppm.

A partir das análises feitas, foi possível confirmar as estruturas das chalconas sintetizadas.

5.2. Preparação dos álcoois

Para a reação de redução com NaBH₄, foram testados dois métodos em MeOH. A redução das chalconas **7a - i** foi realizada na presença de SiO₂, e das **7j - l** na ausência da fase sólida. Ambos os métodos se mostraram eficientes para a redução das chalconas, onde o tempo de reação variou dependendo do grupo substituinte no anel aromático (1-24 h). Os rendimentos foram bons, variando de 40 – 88%. O produto reduzido possui, em sua maioria, coloração branca devido à quebra de conjugação entre os anéis aromáticos, ligações duplas e carbonila.

Na **Tabela 3**, são apresentados alguns dados analíticos obtidos para caracterização destes álcoois, como ponto de fusão, valores de R_f e os rendimentos obtidos.

Tabela 3- Dados analíticos dos álcoois sintetizados **8a - l**.

Álcool	Rendimento(%)	R _f ^(a)	Pf. exp (°C)	Pf. lit (°C)
8a	40	0,73 ^(a)	41-42	56-57 ⁴⁰
8b	60	0,77 ^(a)	67-68	-
8c	78	0,35 ^(a)	78-79	83-84 ⁴⁶
8d	55	0,82 ^(b)	Óleo	-
8e	74	0,89 ^(b)	Óleo	-
8f	74	0,61 ^(a)	56-58	85-86 ⁴⁶
8g	72	0,84 ^(b)	Óleo ⁴⁷	-
8h	58	0,61 ^(a)	45-46	-
8i	67	0,34 ^(a)	40-42	-
8j	82	0,75 ^(b)	51-52	-
8k	68	0,66 ^(b)	61-63	-
8l	88	0,70 ^(b)	102-103	-

(a) *n*-hexano:acetato de etila 7:3 (v:v) (b) *n*-hexano:acetato de etila 6:4 (v:v)

Foram realizadas medidas da rotação óptica (alfa (α)) para alguns dos álcoois sintetizados, onde se obteve valores entre 0,00 - 0,05, confirmando a formação dos álcoois racêmicos. Observa-se que para as reações de redução em que foi utilizada a SiO₂, os rendimentos foram relativamente menores em relação ao outro método. Este resultado pode ser explicado devido a perda do

produto, que pode acontecer no processo de filtragem para retirada da sílica, já que o produto, assim como a sílica, possuem coloração branca.

Os álcoois racêmicos obtidos foram analisados e caracterizados por RMN- ^1H (400 MHz), infravermelho e ponto de fusão quando possível.

Na **Figura 13** está apresentado o espectro de RMN- ^1H do álcool **8a**.

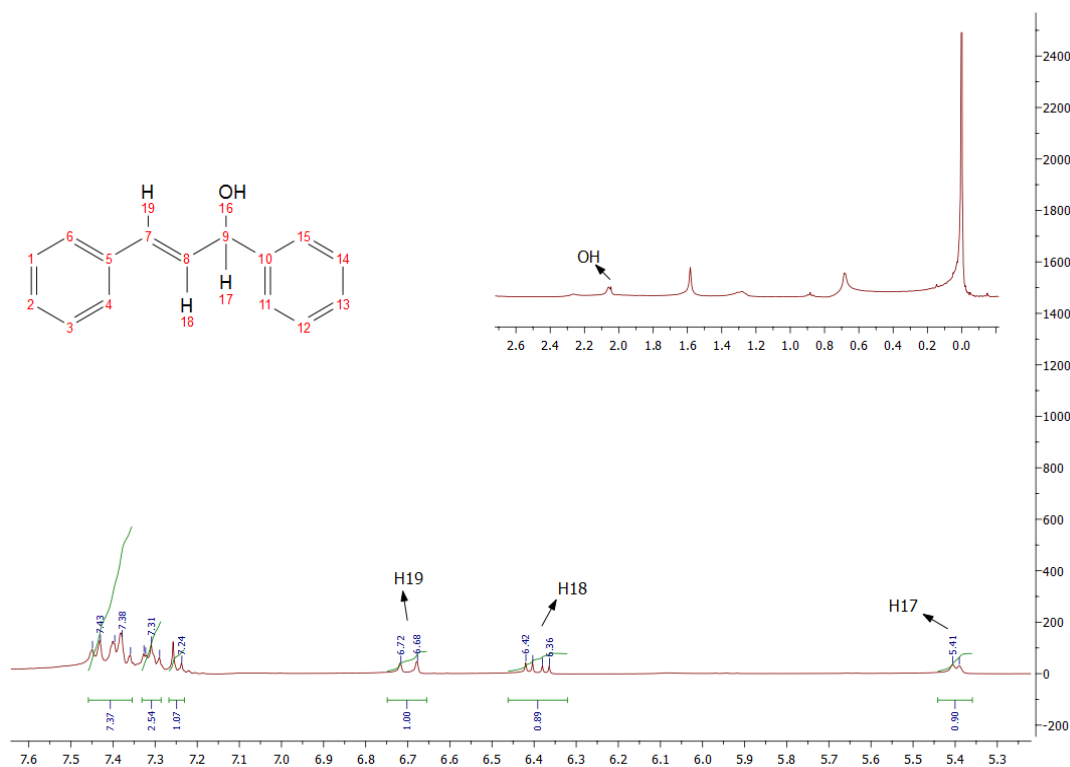


Figura 13- Espectro de RMN- ^1H do álcool **8a**. [CDCl_3 , 400MHz]

É possível observar os sinais característicos da formação dos álcoois, tais como um dublete em 5,40 ppm ($J = 6.3$ Hz) referente ao hidrogênio 17, um duplo dublete referente ao hidrogênio 18, que agora se encontra acoplado com o hidrogênio 17 na região de 6,38 ppm ($J = 15.8, 6.4$ Hz), e um dublete em 6,68 ($J = 15.8$ Hz) referente ao hidrogênio 19.

No espectro de IV mostrado na **Figura 14**, é possível observar as bandas características em 3355 cm^{-1} referente a presença do grupo $-\text{OH}$ e a diminuição da banda da carbonila em aproximadamente 1660 cm^{-1} , restando apenas uma banda em 1599 , e em 1576 referente a ligação $\text{C}=\text{C}$ de um composto carbonílico α,β - insaturado. Estes dados são concordantes com os da literatura.⁴⁵

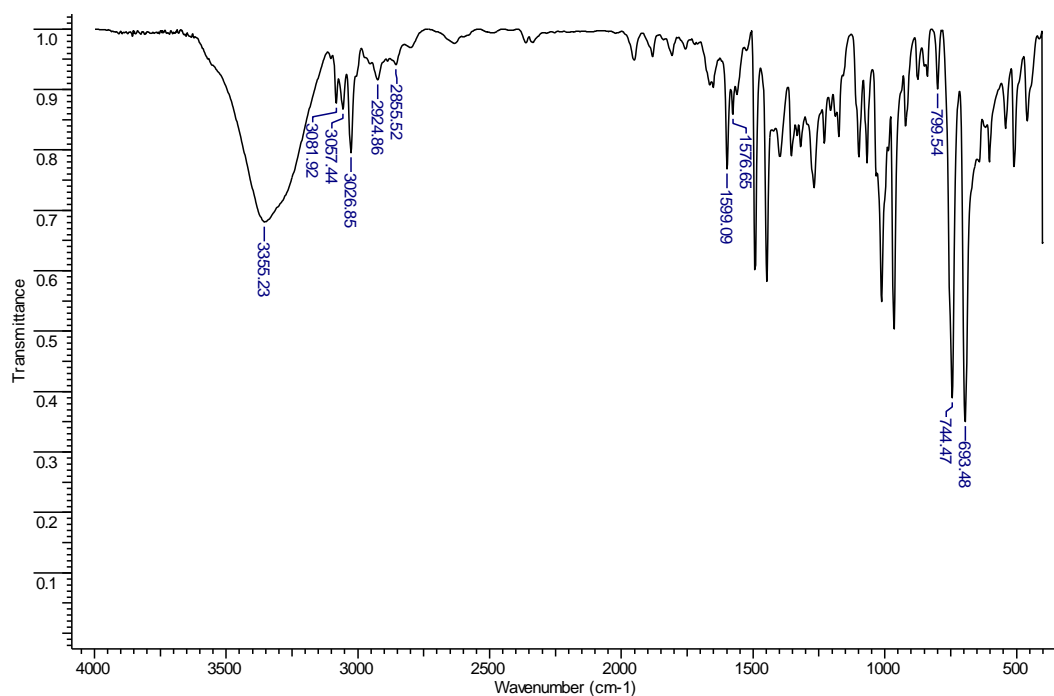


Figura 14- Espectro de infravermelho do álcool (**8a**). [pastilha de KBr]

Para os demais álcoois foram observadas as bandas (IV) e picos (RMN- ^1H) característicos de cada composto, sendo assim possível confirmar a formação destes álcoois.

Após preparar e caracterizar todas as chalconas (**7a - I**) e os álcoois (**8a - I**) realizaram-se as reações de bio-hidrogenação de **7a - I** mediadas pela levedura *S. cerevisiae* em sistema bifásico (**SB**) e imobilizada em esferas de alginato de cálcio (**AG**).

5.3. Biotransformação com *S. cerevisiae*

5.3.1. Influência do tipo de fermento na biotransformação da chalcona **7a**

Devido a grande variedade de fermentos de pão biológicos disponíveis comercialmente, foi avaliada a sua influência na reação de biotransformação da chalcona sem grupos substituintes ligados ao anel aromático (**7a**). Foram utilizados os fermentos das marcas Fleischmann, Nordeste, Dona Benta e Mauri.

As reações foram feitas em **SB** durante 24 h, os resultados obtidos estão presentes na **Tabela 4**.

Tabela 4- Avaliação do uso de diversas leveduras na biorredução da chalcona **7a**.^(a)

Levedura	Conversão (%) ^(b)					
	30min	1 hr	2 hrs	4 hrs	8 hrs	24 hrs
Dona Benta	11	34	53	80	93	>99
Fleischmann	38	62-68	98	>99	-	-
Nordeste	40	75	95	>99	-	-
Mauri	14	50	79	93	>99	-

(a) **Condições de reação:** 208,8 mg substrato (1mmol), 4 g da levedura, 30 mL de hexano, 30 mL de solução tampão K₂HPO₄/ ácido cítrico (0,2 M/ 0,1 M, pH 6,0), temperatura 35 C; (b) conversão determinada por CG.

Através deste estudo, verificou-se que ao usar a levedura da marca Fleischmann, as conversões ao produto foram maiores. Porém, em geral, todas as leveduras comerciais foram eficientes. As conversões foram determinadas pela área relativa da chalcona **7a** com a do produto de redução. Não foi observada a formação do álcool, como observado na **Figura 15**.

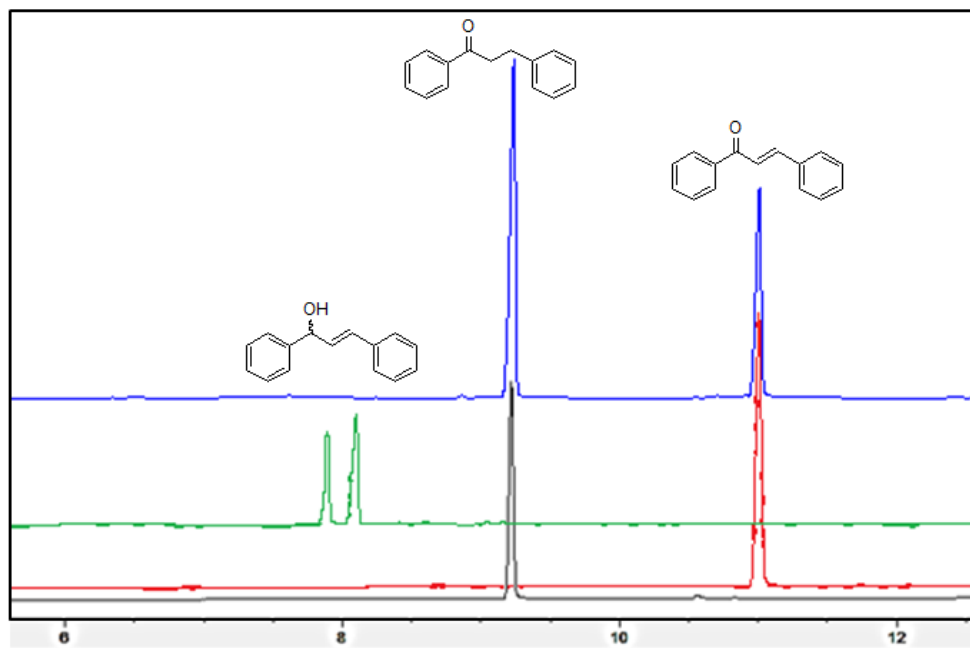


Figura 15- Sobreposição de cromatogramas de CG-quiral (Agilent 7820A, coluna Restek RT-BetaDEX-sm,30m x 0.32mmID x 0.25mm df).

A conversão ao produto foi também dependente do tempo de reação. Salienta-se que ocorreu redução seletiva da ligação dupla C=C, formando a correspondente cetona saturada. Nos espectros de RMN-¹H, foram observados

2 tripletes nas regiões de 3,0 e 3,5 ppm, que correspondem aos hidrogênios metilênicos oriundos da redução da ligação C=C. Não foram observados os sinais correspondentes ao álcool, na região de 2,0 e 3,5 ppm.

A partir destes resultados, utilizou-se a levedura da marca comercial Fleischmann para a biorredução das chalconas **7a - I** em sistema bifásico e com a levedura imobilizada em alginato de cálcio.

5.3.2. Biorredução das chalconas 7a-I

A seguir, foram realizadas as reações de biorredução das chalconas **7a-I** através de sistema bifásico e com o **FP** imobilizado em alginato de cálcio. Os dados de conversão obtidos estão apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5: Biorredução das chalconas **7a-I** mediada pela levedura *S. cerevisiae* em sistema bifásico e imobilizada em alginato de cálcio.



Chalcona	R	R'	R''	Sistema bifásico (%) ^(b)	FP imobilizado (%) ^(c)
7a	H	H	H	79 ^(d)	5
7b	H	CH ₃	H	28	<5
7c	H	NO ₂	H	94 ^(d)	<5
7d	H	OCH ₃	H	97 ^(d)	<5
7e	CH ₃	H	H	50	5
7f	NO ₂	H	H	62 ^(d)	<5
7g	OCH ₃	H	H	49 ^(d)	<5
7h	CH ₃	CH ₃	H	12	<5
7i	NO ₂	NO ₂	H	31	>5<10 ^(e)
7j	Br	H	H	24	<5
7k	Br	Cl	Cl	10	18
7l	Br	OCH ₃	OCH ₃	< 5	<5

(a) Conversão determinada por RMN-¹H

(b) 1 mmol substrato, 6 g de FP, 30 mL de *n*-hexano, 1 mL de diclorometano, 30 mL de solução tampão K₂HPO₄/ ácido cítrico (0,2 M/0,1 M, pH 5,5), agitação magnética, 35 °C, 1h.

(c) 1 mmol substrato, 6 g de FP, 30 mL de *n*-hexano, 1 mL de diclorometano, agitação magnética, 35 °C, 24 h.

(d) Referência 20.

(e) Cálculo impreciso devido a baixa solubilidade do composto.

Neste estudo todas as conversões aos produtos, foram determinadas por RMN ^1H . Inicialmente, serão apresentados os resultados de redução obtidos em **SB**.

Na **Figura 16**, é apresentado o espectro de RMN- ^1H de uma alíquota da reação de redução da chalcona **7e** obtida em **SB** em 1h.

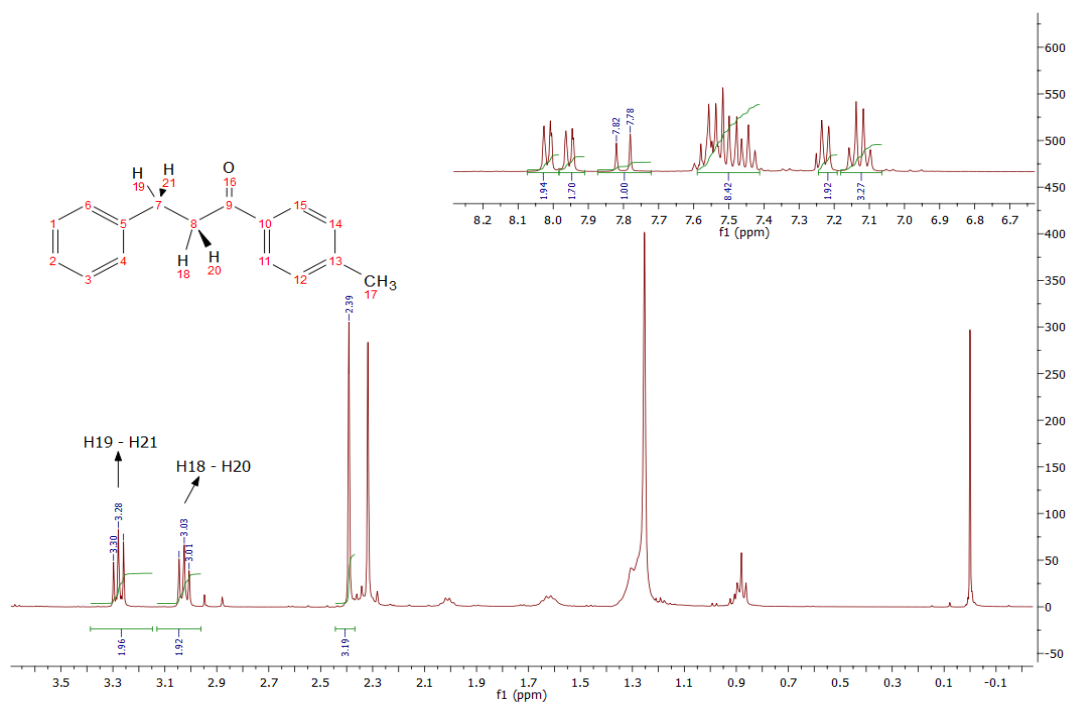


Figura 16 - Espectro de RMN- ^1H de uma alíquota da reação de redução da chalcona **7e**, em sistema bifásico [CDCl_3 , 400MHz] Conversão: 50%

Observam-se os sinais na região de 7,13 – 8,02 ppm referentes aos hidrogênios dos anéis aromáticos, bem como os hidrogênios alfa e beta da chalcona que não foi totalmente reduzida. Os tripletos centrados em 3,03 e 3,28 ppm são atribuídos aos 4 hidrogênios metilênicos do produto de hidrogenação da ligação dupla carbono-carbono. O singlete em 2,39 ppm é referente à metila ligada ao anel aromático.

Os tripletos na região de 3 – 3,5 ppm foram observados para todos os compostos, porém com diferentes intensidades. Não foram observados os singletes correspondentes ao álcool, na região de 2,0 à 3,5 ppm.

A conversão ao produto foi calculada através da comparação das áreas obtidas no espectro para os hidrogênios da ligação dupla C=C com os da ligação saturada (prótons metilênicos).

Para a redução deste composto e nestas condições reacionais, obteve-se uma conversão de 50% ao produto.

Devido a conjugação apresentada, espera-se que grupos retiradores no anel B deixem o carbono β a carbonila mais reativo, e que os doadores de elétrons deixem menos reativo frente à adição de hidretos. É esperado também que grupos retiradores ou doadores de elétrons do anel A não interfiram muito na reatividade da ligação C=C frente a adição de hidreto.

Como observado na **Tabela 5** para as reações em **SB**, na biorredução das chalconas com grupos substituintes doadores e retiradores de elétrons no anel aromático A, as conversões em produto foram menores quando comparadas com as obtidas na reação da chalcona sem substituinte (**7a**). Para as chalconas que contém os grupos metóxi e nitro, as conversões foram de 49 e 62 %, respectivamente.

Nas reações das chalconas com substituintes doadores e retiradores de elétrons no anel aromático B, as conversões em produto foram maiores com a chalcona **7c** (grupo retirador na posição *para*) e com a chalcona **7d** (grupo doador na posição *para*), quando comparadas com a conversão da chalcona **7a**. Para as chalconas com dois grupos doadores (**7k**) e retiradores de elétrons (**7l**) as conversões foram bem menores, sendo de 10 % e <5 %. Salienta-se que a presença de dois grupos Cl (chalcona **7k**) facilitou a reação (conversão :10%) e que a presença de dois grupos doadores (chalcona **7l**), dificultou a adição do hidreto (conversão: <5%).

A presença de dois grupos CH₃ e NO₂ (chalconas **7h** e **7i**) na posição *para* nos anéis A e B dificultou a redução da ligação C=C, e as conversões foram de 12 % e 31 % respectivamente. A **Figura 17** mostra o espectro de RMN ¹H da alíquota da reação de redução da chalcona **7i** em sistema bifásico.

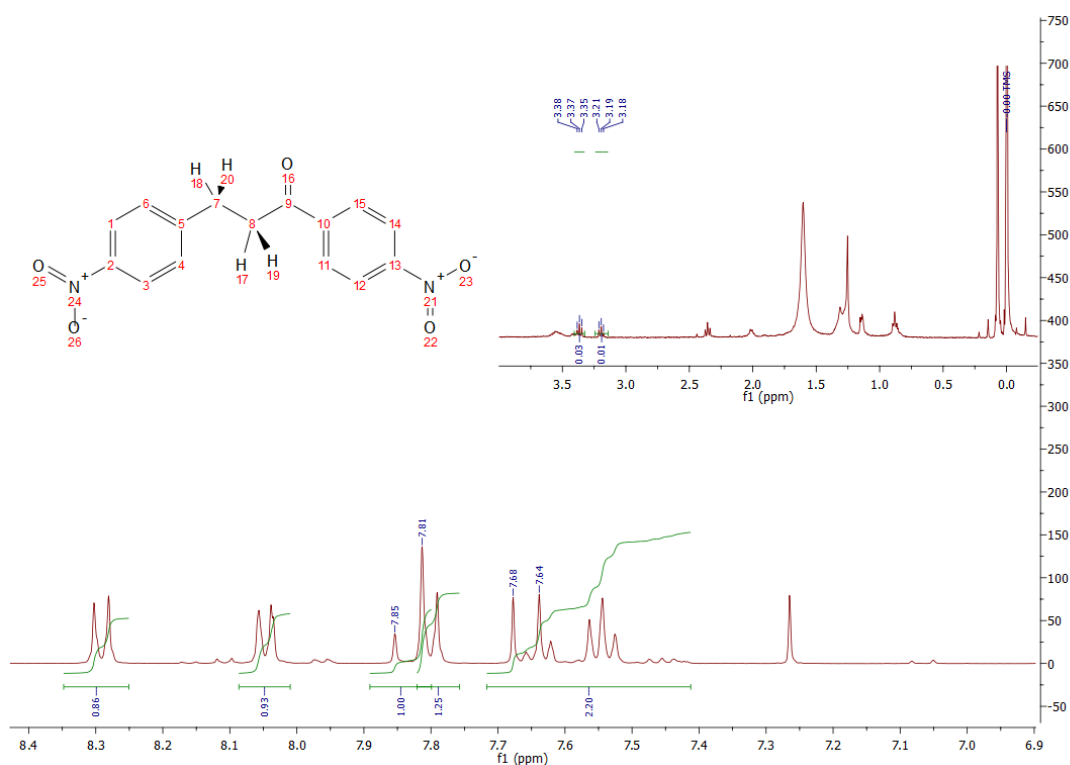


Figura 17 - Espectro de RMN-¹H da alíquota da reação de redução da chalcona **7i** em **SB** [CDCl₃, 400 MHz]. Conversão: 32%

Observam-se a presença dos hidrogênios metilênicos na região de 3,2 e 3,4 ppm, porém com uma baixa intensidade, obtendo-se uma conversão de 32 %.

É importante mencionar que algumas das chalconas utilizadas não possuem boa solubilidade em *n*-hexano, que foi o solvente utilizado nas reações. Sendo assim, foi necessária a adição de 1 - 2 mL de diclorometano para auxiliar na solubilidade dos substratos no meio reacional. O diclorometano por ser um solvente orgânico clorado e tóxico, pode diminuir a atividade catalítica das enzimas presentes na levedura, diminuindo a conversão aos produtos.

Como mostrado na **Tabela 5**, as conversões aos produtos obtidas para as reações com a levedura imobilizada em **AG**, foram bem menores quando comparadas com as reações em sistema bifásico (**SB**). Portanto, neste trabalho não constam os espectros de RMN-¹H de todas as reações realizadas com a levedura imobilizada, pois para alguns compostos não foi possível observar a formação do produto. Como esperado, a maior conversão foi obtida na redução da chalcona **7k**, que contém dois cloros ligados no anel B e o bromo no anel A, sendo de 18%.

A influência dos grupos substituintes foi discutida anteriormente, porém neste sistema temos que a quantidade de fermento de pão utilizada nas reações é menor. Foi utilizado 6g de fermento de pão na preparação das esferas uma grande quantidade das mesmas foi formada, impedindo a utilização de todas as esferas em uma única reação, devido à impossibilidade de agitação magnética por haver uma grande quantidade de massa. Sendo assim, as esferas preparadas foram divididas em quantidades iguais de massa (22 g - 23g) em três erlenmeyer distintos.

Devido à agitação magnética, as esferas perderam uma grande quantidade de água (**Figura 18**), que é fundamental para manter a atividade da levedura. Esta perda de água pode diminuir a eficiência das enzimas presentes no **FP**, diminuindo a conversão aos produtos. Através da determinação da massa das esferas antes e depois das reações, verificou-se a perda de $11,2 \pm 1,4$ g de água (média de 7 determinações).



Figura 18- Esferas de **AG** após as reações de biorredução.

Outra explicação para as baixas conversões pode ser devido à difusão, que é um processo lento e deve ocorrer para que o substrato reaja com a levedura e possa assim formar o produto desejado. A solubilidade dos substratos frente ao solvente orgânico utilizado na reação também deve ter influenciado, como mencionado anteriormente.

Na **Figura 19** é apresentado o espectro de RMN-¹H de uma alíquota da reação de redução da chalcona **7a**, usando o **FP** imobilizado.

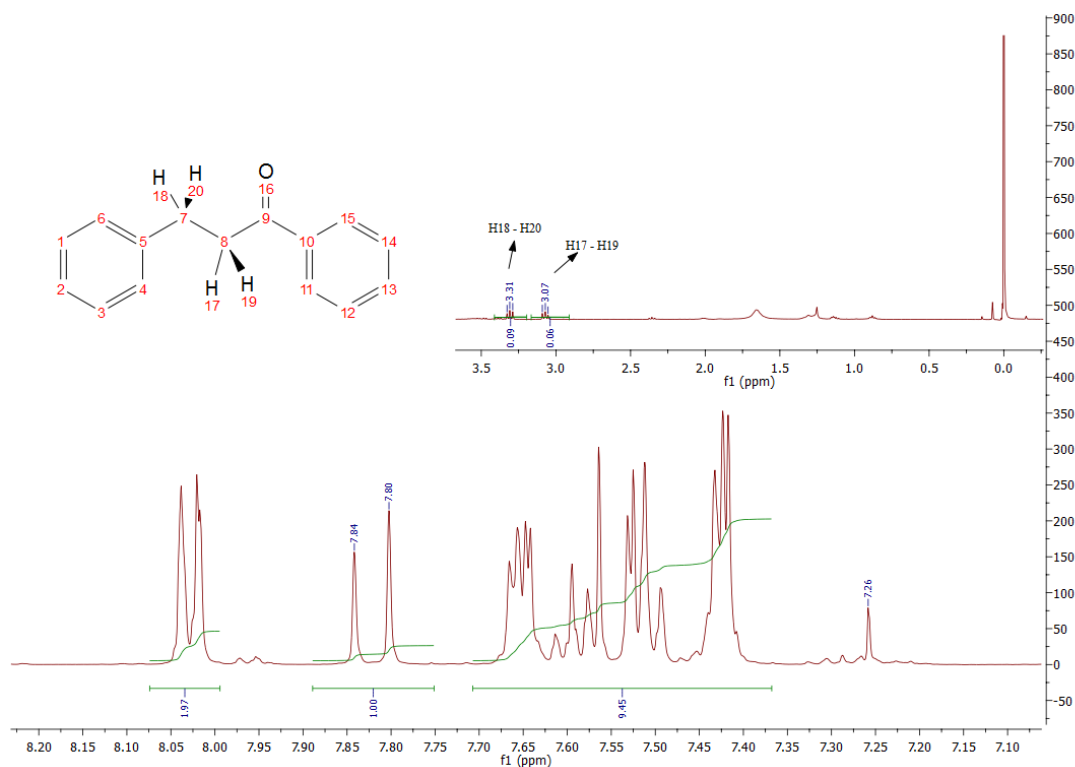


Figura 19- Espectro de RMN-¹H da alíquota da reação de redução da chalcona **7a** com **FP** imobilizado[CDCl₃, 400MHz] Conversão:5%.

É possível observar a presença dos tripletos centrados em 3,07 e 3,31 ppm, porém com uma baixa intensidade, indicando que a conversão foi <5 %. A baixa conversão é evidenciada também devido a presença dos hidrogênios e α - e β - nas regiões de 7,47 e 7,85 ppm.

Os resultados obtidos mostraram que as chalconas **7a-I**, foram reduzidas parcialmente e seletivamente na ligação C=C. Os dois sistemas foram eficientes e formaram os produtos. Porém, ao usar o sistema bifásico, apesar da maior dificuldade de extração do produto, as conversões foram maiores em comparação com o uso do **FP** imobilizado.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, têm-se as seguintes conclusões:

- Todos os compostos sintetizados foram obtidos com bons rendimentos.
- Foi possível caracterizar as chalconas e álcoois preparados, utilizando técnicas de infravermelho, RMN-¹H e pontos de fusão quando possível.
- Dentre os métodos de biorredução utilizados, o sistema em que se teve uma maior obtenção do produto foi o sistema bifásico.
- O sistema de imobilização do fermento de pão em microesferas de alginato de cálcio não se mostrou muito efetivo, sendo que muitas variáveis devem ser estudadas para uma melhor otimização do sistema.
- Os produtos obtidos de ambos os sistemas utilizados foi caracterizado por RMN-¹H, onde foram observados picos característicos dos hidrogênios metilênicos formados a partir da adição de hidretos na região de 3,0 á 4,0 ppm.
- Os grupos substituintes utilizados, não mostraram ter grande influência nas reações de biorredução.
- Foi observada a. redução quimiosseletiva das ligações insaturadas C=C, demonstrando que o **FP** pode ser utilizado como uma alternativa viável e de baixo custo para a redução de compostos carbonílicos α,β -insaturados.

Neste trabalho ainda há diversos aspectos que devem ser estudados e otimizados para se obter maiores conversões, em especial para o sistema que utilizou **FP** imobilizado em microesferas de alginato de cálcio

7. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos, têm-se como perspectivas:

→ Avaliar a influência da massa do substrato, temperatura, massa do biocatalisador, tempo de reação para as reações com o **FP** imobilizado.

→ Testar a influência de outros grupos substituintes ligados nos anéis **A** e **B**.

→ Avaliar a atividade biológica dos produtos obtidos nas reações de biorredução das chalconas **7a-I** mediadas por levedura *S.cerevisae*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- MARSAIOLI, A. J., PORTO, A. L. M., **Biocatálise e Biotransformação – Fundamentos e Aplicações**; vol. 1, Schoba Editora, SP, 11-14, 250-271, 2010.
- 2- LIESE, An., SEELBACH, K., WANDREY, C., **Industrial Biotransformations**, Copyright © WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2ª Ed., 1-36, 2006.
- 3- LERESCHE, J. E., MEYER, H. P., Chemocatalysis and Biocatalysis (Biotransformation): Some Thoughts of a Chemist and of a Biotechnologist, **Org. Process Res. Dev.**, 10 (3), 572-580, 2006.
- 4- BEATRIZ, A., ARAÚJO, Y. J. K., LIMA, D. P., Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas, **Quim. Nova**, 34(2), 306-319, 2011.
- 5- PRADO, A. G. S., Química verde, os desafios da química do novo milênio, **Quim. Nova**, 26 (5), 738-744, 2003.
- 6- FABER, K., **Biotransformations in Organic Chemistry**, 6th Ed., Springer, 2011.
- 7- WONG, C. H.; WHITESIDES, G. M. **Enzymes in Synthetic Organic Chemistry**. 1st. Ed. Oxford: Pergamon, 1994.
- 8- OLIVEIRA, L. G., MANTOVANI, S. M., Transformações biológicas: contribuições e perspectivas, **Quim. Nova**, 32(3), 742-756, 2009.
- 9- BRUICE, P. Y., **Organic Chemistry**, 3rd ed., cap. 17, 18, 22 e 23, pg 735-826 e 958-1032, Prentice-Hall International (UK) Limited, London, 2001.
- 10- NAVARRO, D. M.; NAVARRO, M., Hidrogenação de compostos orgânicos utilizando método eletroquímico para geração de hidrogênio *in situ*: hidrogenação eletrocatalítica. **Quím. Nova**, vol.27, n°.2, 2004.
- 11- ZEYNIZADEH, B.; BEHYAR, T., Fast and efficient method for reduction of carbonyl compounds with NaBH₄/ Wet SiO₂ under solvent free condition. **J. Braz. Chem. Soc.**, 16 (6), 1200-1209, 2005.
- 12- COSTA, P.; PILLI, R.; PINHEIRO, S.; VASCONCELLOS, M., **Substâncias Carboniladas e Derivados**, 1ª Ed., cap. 1, pg 155-164 e 180-192, Artmed Editora S.A., São Paulo, 2003
- 13- IDRIS, A., ZAIN, N., SUHAIMI, M., Immobilization of Baker's yeast invertase in PVA-alginate matrix using innovate immobilization technique. **Process Biochem.**, 43, 331-338, 2008.

- 14- OMORI, T.A.; LOBO, F.G.; AMARAL, A.C.G.; OLIVEIRA, C.S., Purple carrots: Better biocatalysts for the enantioselective reduction of acetophenones than common orange carrots (*D.carota*), **J.Mol. Catal B: Enzym.**, 127, 93-97, 2016.
- 15- DRAUZ, K., GRÖGER, H., MAY, O., **Enzyme Catalysis in Organic Synthesis**, Vol. 1, pg 1-63 e 1035-1153, Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2012.
- 16- SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C.B.; **Química Orgânica**, vol. 2, 8ª Ed., cap 24, pg 471-472, LTC Editora, RJ, 2006.
- 17- CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O.; **Bioquímica**, 5ª Ed., Cap 6, pg 142-148, Thomson, SP, 2006.
- 18- NELSON, D. L.; COX, M. M., **Lehninger: Principles of Biochemistry**, 3ª Ed., cap. 8, Worth Publishers: New York, 2000.
- 19- DRAUS, K.; WALDMANN, H. **Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: a comprehensive handbook**. 2nd ed. Wiley- VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2002.
- 20- SILVA, V. D.; STAMBUCK, B. U.; NASCIMENTO, M. G., Efficient chemoselective biohydrogenation of 1,3-diaryl-2-propene-1-ones catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* yeasts in water/organic solvent biphasic system, **J. Mol. Catal. B.: Enzym** 63, 157-163, 2010.
- 21- HU, Q.; XU, Y.; NIE, Y., Highly enantioselective reduction of 2-hydroxy-1-phenylethanone to enantiopure (*R*)-phenyl-1,2-ethanediol using *Saccharomyces cerevisiae* of remarkable reaction stability, **Bioresour. Technol.**, 101, 8502-8508, 2010.
- 22- VILLIERS, M., MACUAMULE, C., SPRY, C., HYUN, Y.M., STRAUSS, E., SALIBA, K.J., Structural modification of pantothenamides counteracts degradation by *Pantetheinase* and improves antiplasmodial Activity, **ACS Med. Chem. Lett.**, 4, 784-789, 2013.
- 23- MILNER, S.; MAGUIRE, A., Recent trends in whole cell and isolated enzymes in enantioselective synthesis, **ARKIVOC**, (i), 321-382, 2012.
- 24- SHEN, L.; CHENG, K.; SCHROEDER, M.; YANG, P.; MARSH, E.; LAHANN, J.; CHEN, Z., Immobilization of enzyme on a polymer surface, **Surface Sci.**, 648, 53-59, 2016.

- 25- SHELDON, R.; VAN PELT, S., Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how? **Chem. Soc. Rev.**, 42, 6223, 2013.
- 26- BRADY, D.; JORDAAN, J., Advances in enzyme immobilisation, **Biotechnol. Lett.**, 31, 1639-1640, 2009.
- 27- ZAMPIERI, D. S., PAULA, B. R. S., ZAMPIERI, L. A., VALE, J. A., RODRIGUES, J. A. R., MORAN, P. J. S., Enhancements of enantio and diastereoselectivities in reduction of (*Z*)-3-halo-4-phenyl-3-buten-2-one mediated by microorganisms in ionic liquid/water biphasic system, **J. Mol. Catal. B.: Enzym.**, 85-86, 61-64, 2013.
- 28- MONTI, D., OTTOLINA, G., CARREA, G., RIVA, S., Redox reactions catalyzed by isolated enzymes, **Chem. Rev.**, 111, 4111-4140, 2011.
- 29- MILAGRE, H. et al. Asymmetric bioreduction of ethyl 3-halo-2-oxo-4-phenylbutanoate by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in Ca-alginate beads with double gel layer, **Org. Process Res. Develop.**, 10, 611-617, 2006.
- 30- NEDOVIC, V.; WILLAERT, R., **Focus on Biotechnology: Fundamental of Cell Immobilization Biotechnology**. 1st.Ed. [S.I.]: Springer Science+ Business Media, 8A, 2004.
- 31- GARCIA-CRUZ, C.; FOGGETTI, U.; da SILVA, A., Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção, **Quím. Nova**, Vol.31, no.7, 2008.
- 32- STOLLMAIER, J. G., **Preparação, Caracterização e Biorredução de Bis-chalconas**, Trabalho de Conclusão de Curso, Florianópolis: UFSC-CFM, 2015.
- 33- POLINSKY, A., Lead-likeness and drug-likeness. In: Wermuth, C. G. (org). The practice of medicinal chemistry: 3 Ed. Ilkirch, France: **Elsevier**, Cap. 13, 244-254, 2008.
- 34- SAHU, N. K.; BALBHADRA, S. S.; CHOUDHARY, J.; KOHLI, D. V., Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: A review, **Current Med. Chem.**, 19, 209, 2012.
- 35- NOWAKOWSKA, Z.; KEDZIA, B.; SCHROEDER, G., Synthesis, physicochemical properties and antimicrobial evaluation of new (*E*)-chalcones, **Eur. J. Medic. Chem.**, 43, 707-713, 2008.
- 36- JANECKO, T.; GLADKOWSKI, W.; SUSLOW-KOSTRZEWA, E., Microbial transformations of chalcones to produce food sweetener derivatives, **J. Mol. Catal. B.: Enzym**, 98, 55-61, 2005.

- 37- COLE, A. L.; HOSSAIN, S.; COLE, A. M.; PHANSTIEL, O., Synthesis and bioevaluation of substituted chalcones, coumaranones and other flavonoids as anti-HIV agents, **Bioorg. Medic. Chem.**, 24, 2768 – 2776, 2016.
- 38- SCHAEFER, C. A., **Biotransformação de compostos carbonílicos com microorganismos em sistema aquoso e/ou bifásico**, Dissertação de Mestrado, Florianópolis: UFSC-CFM, 2015.
- 39- BRAIBANTE, H. T. S., **Química Orgânica: Um curso experimental**, 1ª ed., 196-197, Campinas SP: Editora Átomo, 2015.
- 40- ZEYNIZADEH, B.; BEHYAR, T.; Fast and efficient method for reduction of carbonyl compounds with NaBH₄/wetSiO₂ under solvent free condition, **J. Braz. Chem. Soc.**, 16(6A), 1200-1209, 2005.
- 41- JI-TAI, L.; WEN-ZHI, Y.; SHU-XIANG, W.; SHENG-HUI, L.; TONG-SHUANG, L., Improved synthesis of chalcones under ultrasound irradiation, **Ultrason. Sonochem.**, 9, 237-239, 2002.
- 42- MONTES-AVILA, J.; DÍAZ-CAMACHO, S.; SICAIROS-FÉLIX, J.; DELGADO-VARGAS, F.; RIVERO, I., Solution-phase parallel synthesis of substituted chalcones and their antiparasitary activity against Giardia lamblia, **Bioorg. Medic. Chem.**, 17, 6780-6785, 2009.
- 43- BATT, D. G.; GOODMAN, R.; JONES, D. G.; KERR, J. S.; MANTEGNA, L. R.; McALLISTER, C.; NEWTON, R. C.; NURNBERG, S.; WELCH, P. K.; COVINGTON, M. B., 2'-Substituted chalcone derivatives as inhibitors of interleukin-1 biosynthesis, **J. Med. Chem.**, 36, 1434-1442, 1993.
- 44- PETROV, O.; IVANONA, Y.; GEROVA, M., SOCI₂/EtOH: catalytic system for synthesis of chalcones, **Catal. Commun.**, 9, 315-316, 2008.
- 45- WILLIAMS, D. H.; FLEMING, I., **Spectroscopic methods in organic chemistry**, 4ª ed., McGraw-Hill Book company (UK) Limited, England, 1987.
- 46- EASTON, M. A.; HABIB, A. J. M.; PARK, J., Stable carbonium ions. Part III. Reactions involving 1,3-diarylallyl and 1-ferrocenyl-3-arylallyl cations, **J. Chem. Soc. Perkin II**, 15, 2290-2297, 1972.
- 47- RANU, B. C.; SAMANTA, S., Reduction of activated conjugated alkenes by the InCl₃- NaBH₄ reagent system, **Tetrahedron**, 59, 7901-7906, 2003.

ANEXO DOS ESPECTROS DE RMN-¹H E IV.

Tabela 6: Bandas de IV

Grupo	Banda* (cm ⁻¹) ⁴⁵
O-H	3600 – 3200 (F)
H-arílico	3040 - 3010 (f)
-CH ₂ , -CH ₃	2960 – 2850 (F)
C=O (cetona) α,β-insaturada	1685 – 1665 (F)
C=C de compostos carbonílicos α,β-insaturados	1640 – 1590 (F)
R' – C=C – R'' (trans)	990 – 960 (F)
Benzeno monosubstituído	770 – 730 (F) e 720 – 680 (F)
NO ₂	1560 e 1350 (F)

* Intensidade relativa das bandas: (mF) = muito forte, (F) = forte, (m) = médio, (mf) = muito fraca, (f) = fraca.

→ Chalcona **7a**:

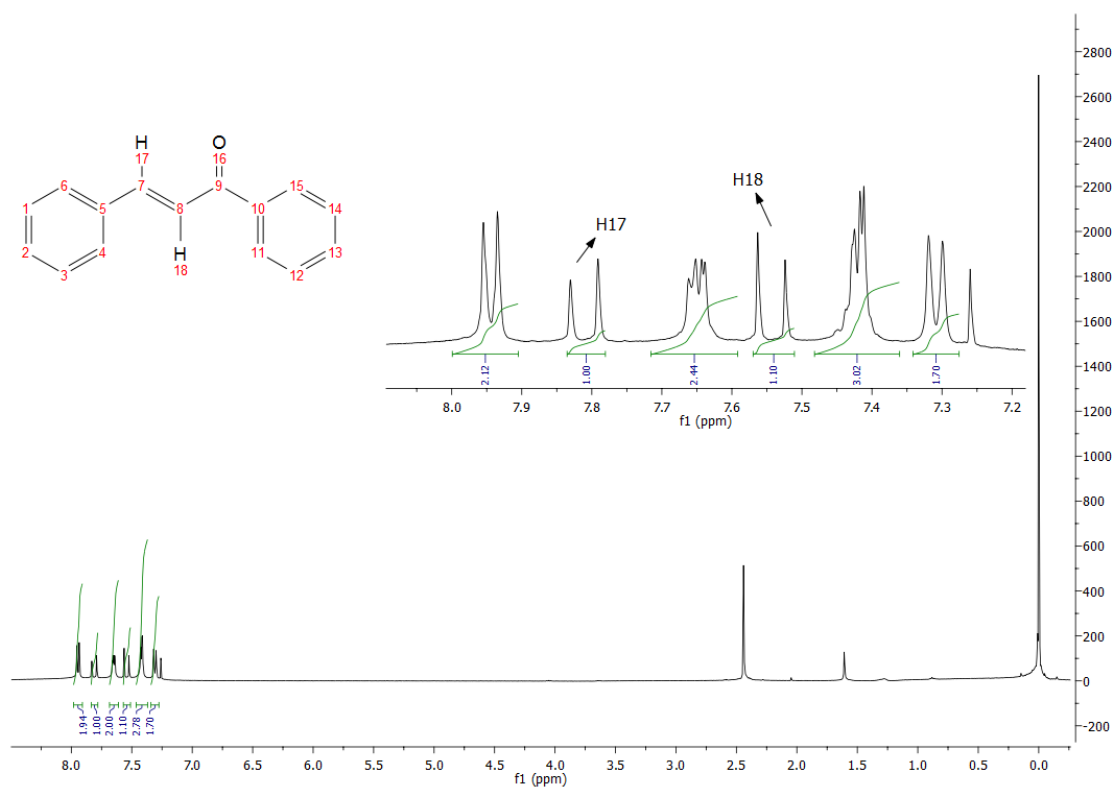


Figura 20- Espectro de RMN – ^1H da chalcona **7a** (400 MHz, CDCl_3).

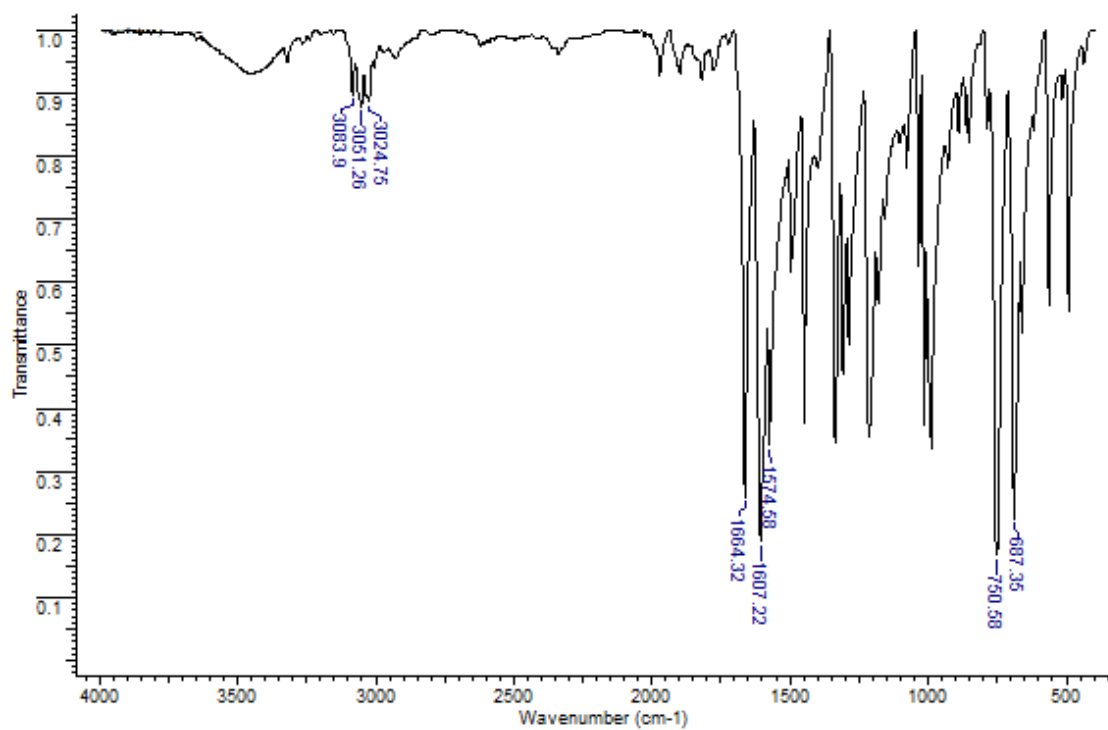


Figura 21- Espectro de IV da chalcona **7a** (KBr).

→ Chalcona **7b**:

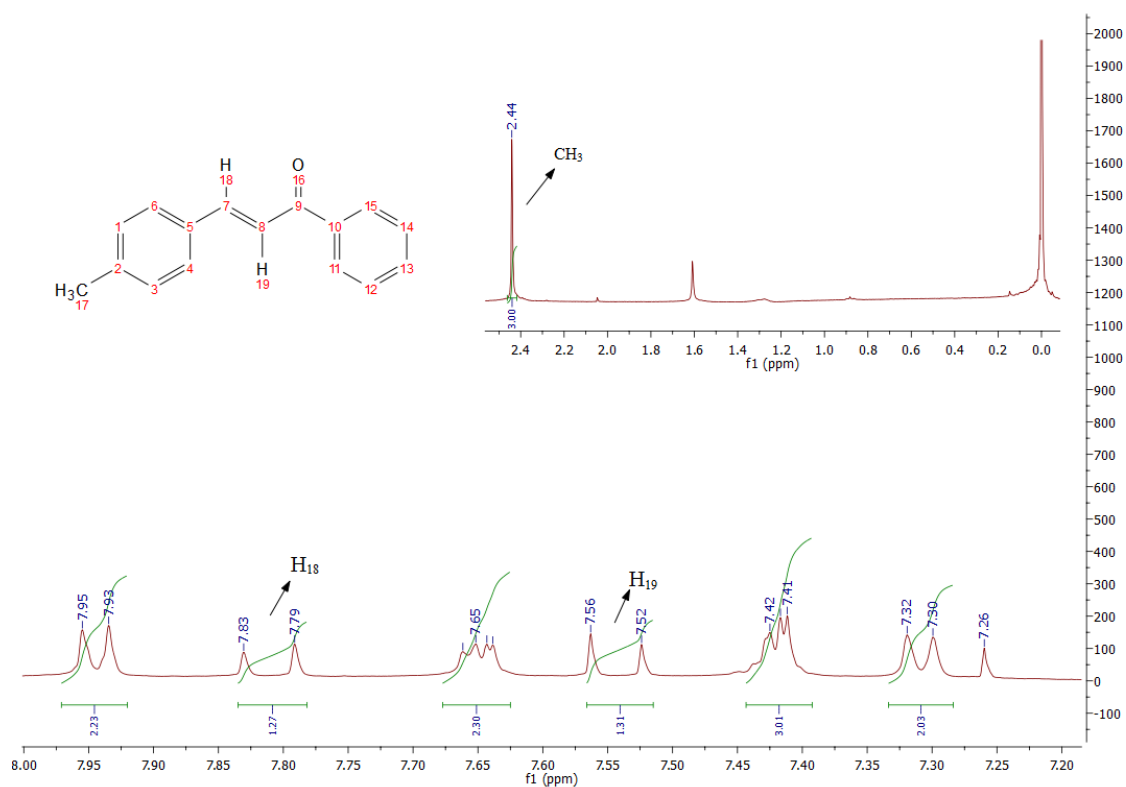


Figura 22- Espectro de RMN – ¹H da chalcona **7b** (400 MHz, CDCl₃).

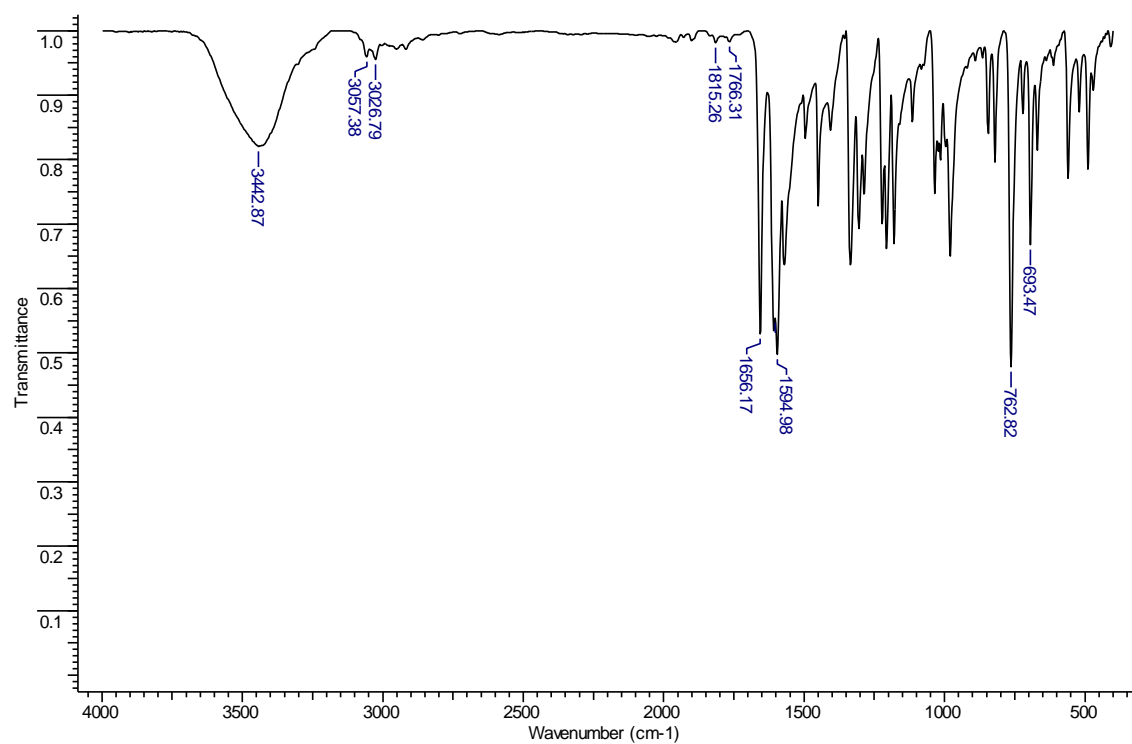


Figura 23- Espectro de IV da chalcona **7b** (KBr).

→ Chalcona **7c**:

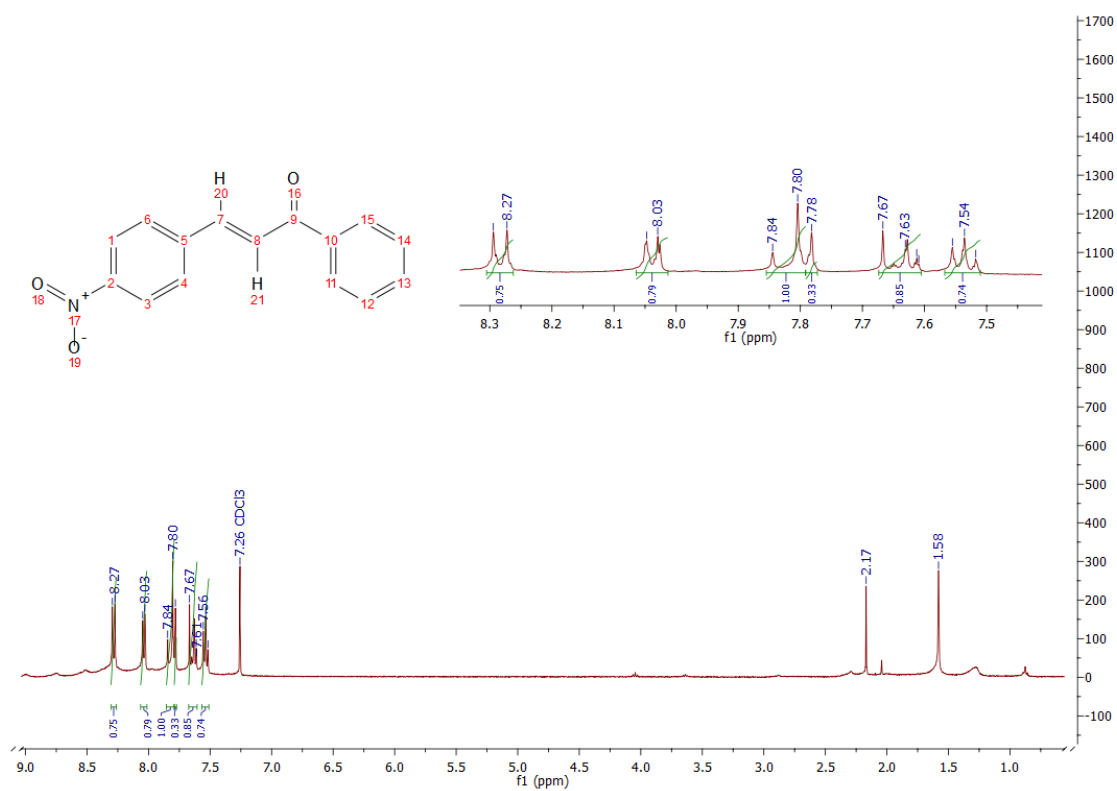


Figura 24- Espectro de RMN – ^1H da chalcona **7c** (400 MHz, CDCl_3).

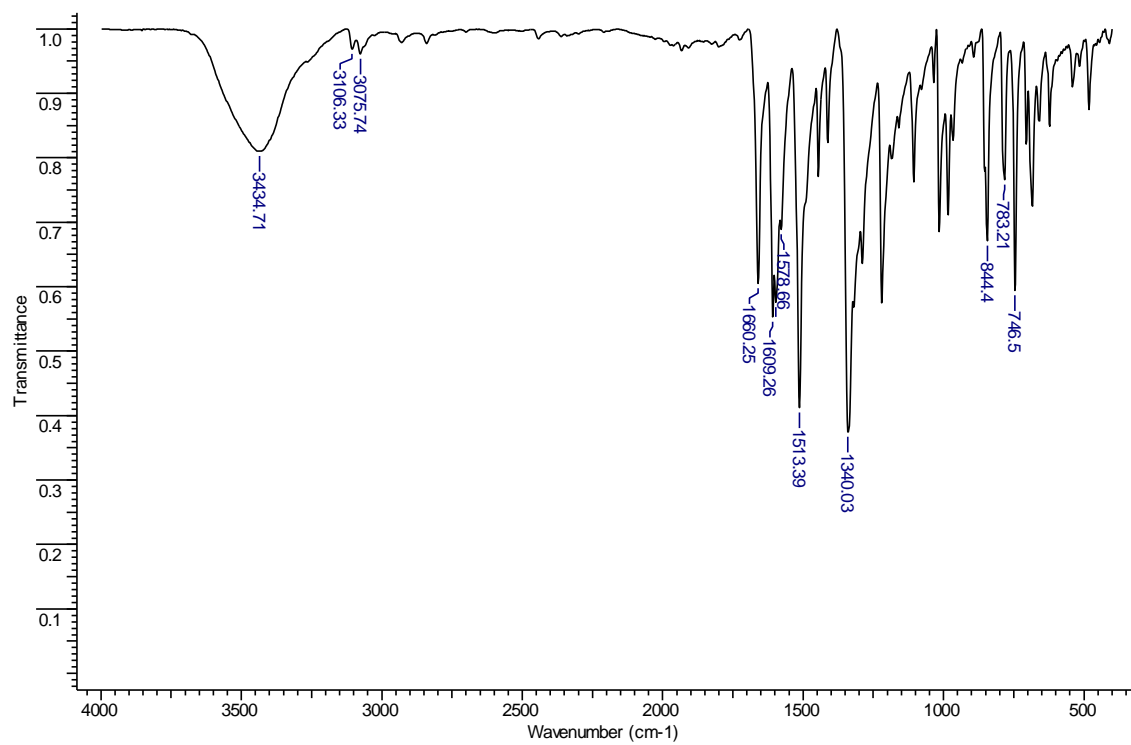


Figura 25- Espectro de IV da chalcona **7c** (KBr).

→ Chalcona **7d**:

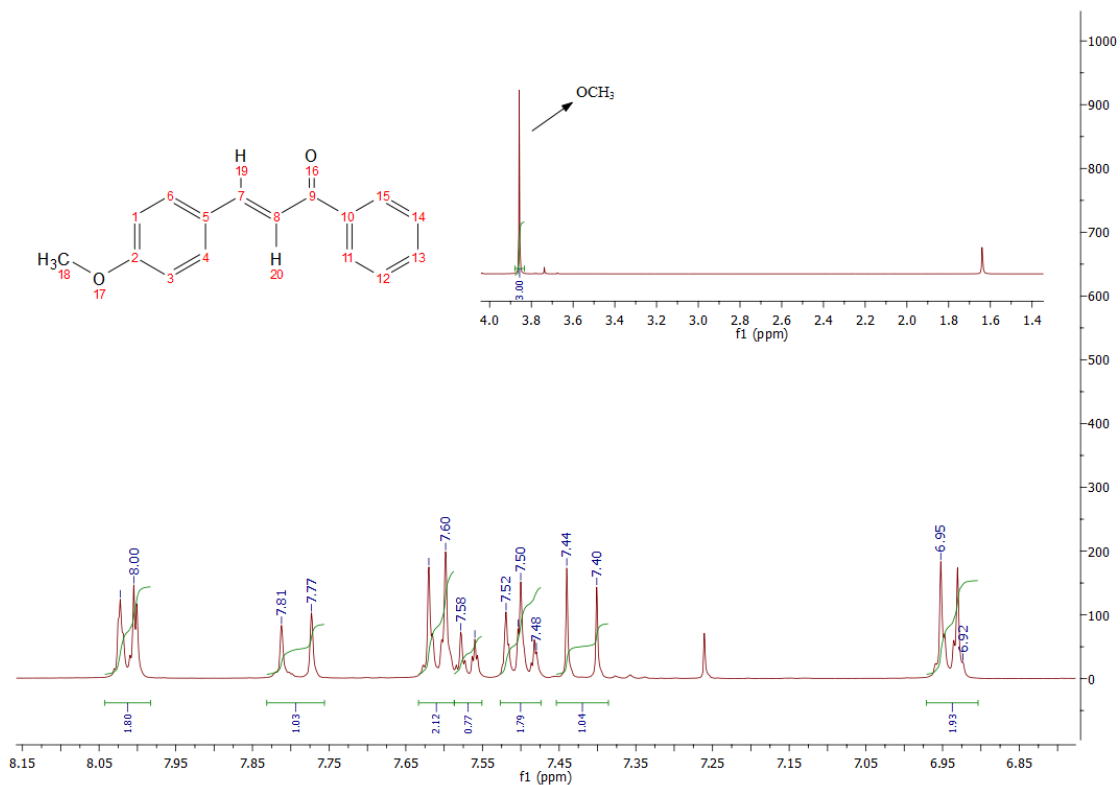


Figura 26- Espectro de RMN – ¹H da chalcona **7d** (400 MHz, CDCl₃).

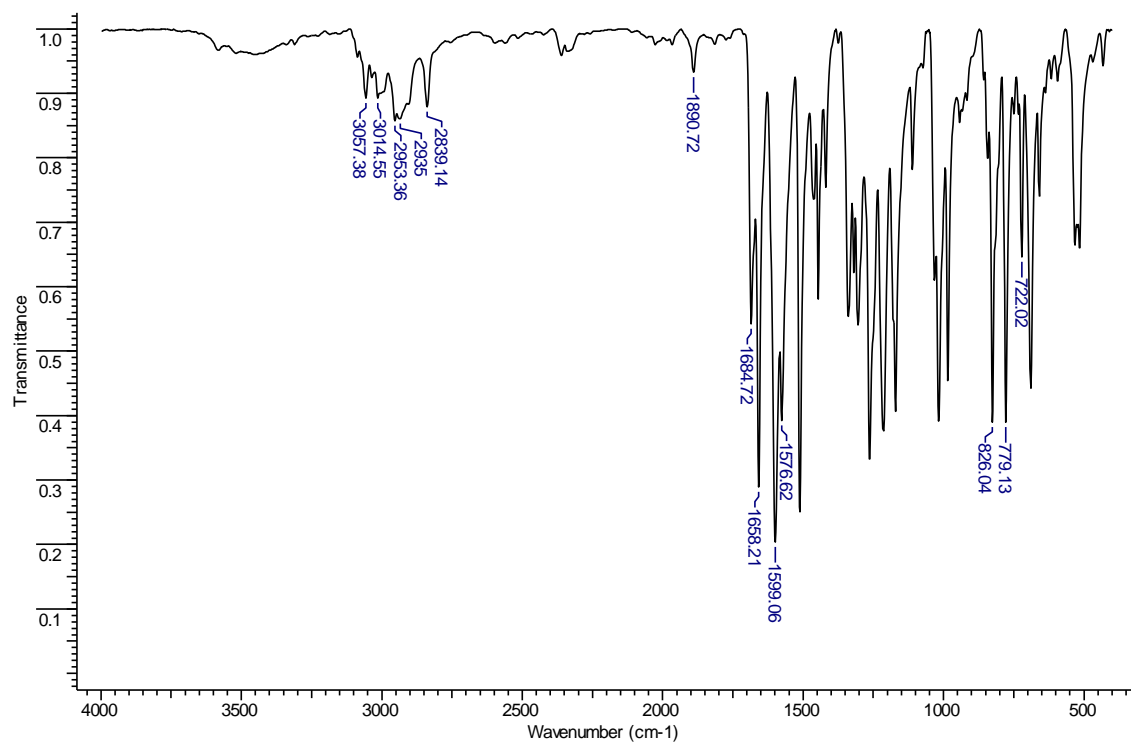


Figura 27- Espectro de IV da chalcona **7d** (KBr).

→ Chalcona **7e**:

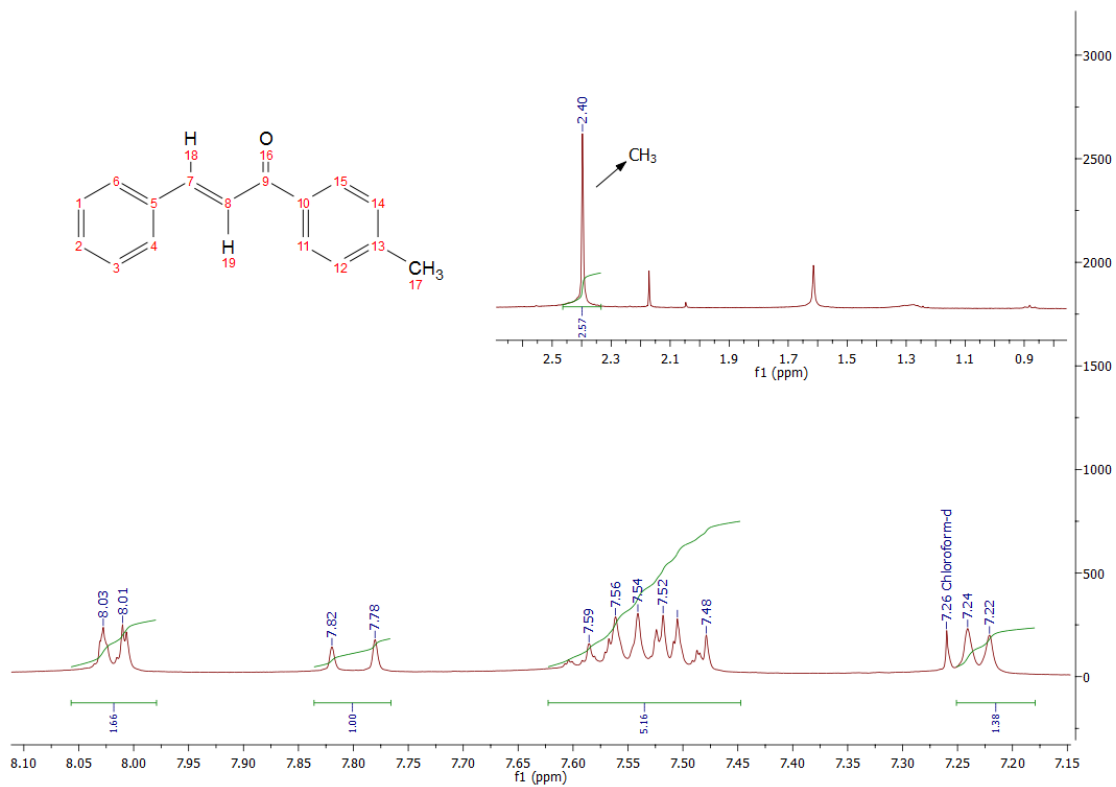


Figura 28- Espectro de RMN – ¹H da chalcona **7e** (400 MHz, CDCl₃).

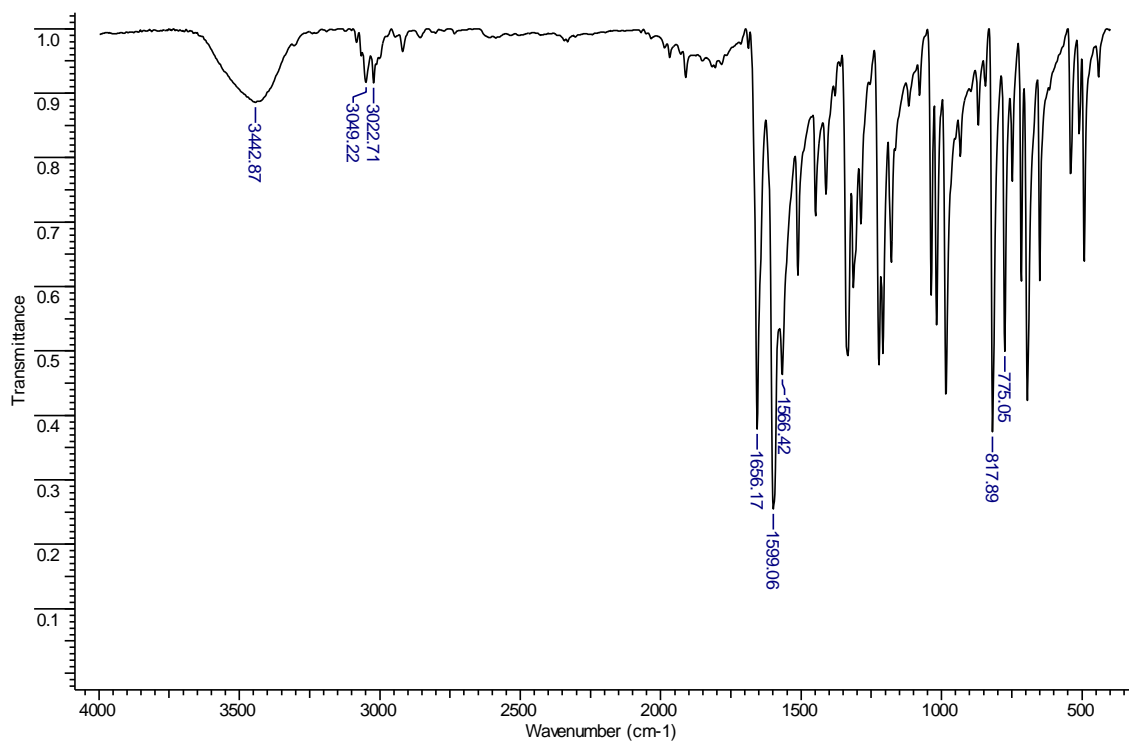


Figura 29- Espectro de IV da chalcona **7e** (KBr).

→ Chalcona **7f**:

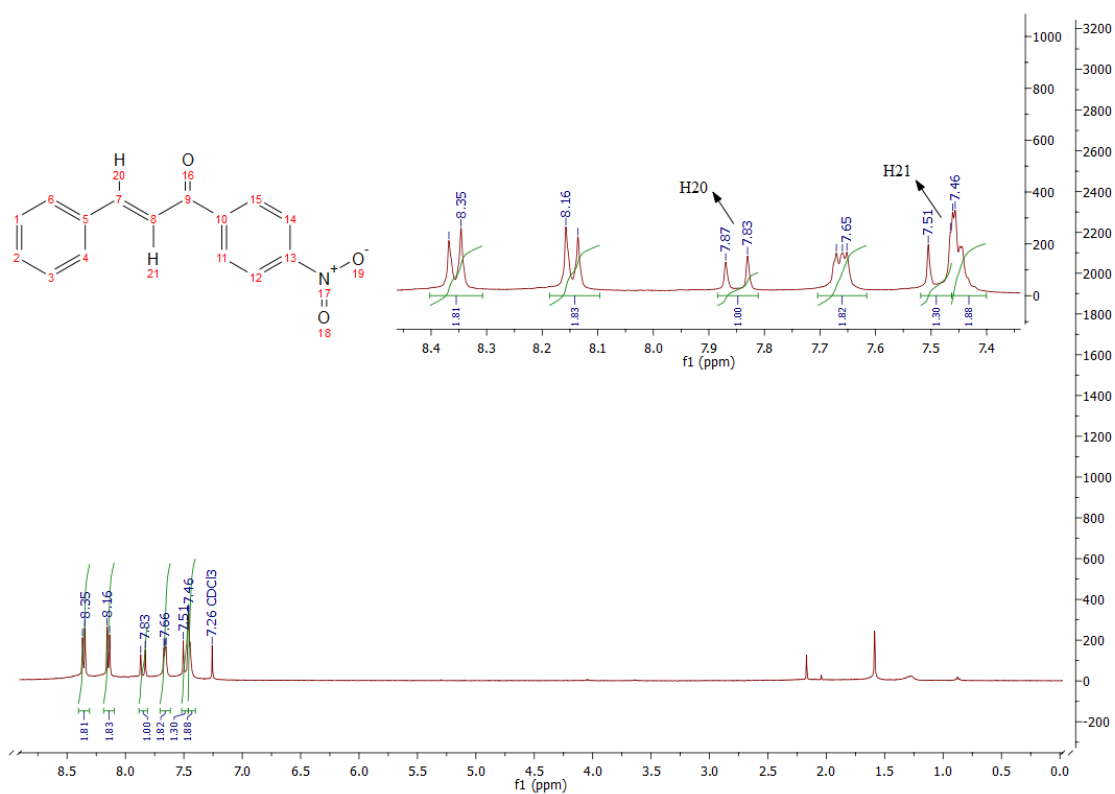


Figura 30- Espectro de RMN – ¹H da chalcona **7f** (400 MHz, CDCl₃).

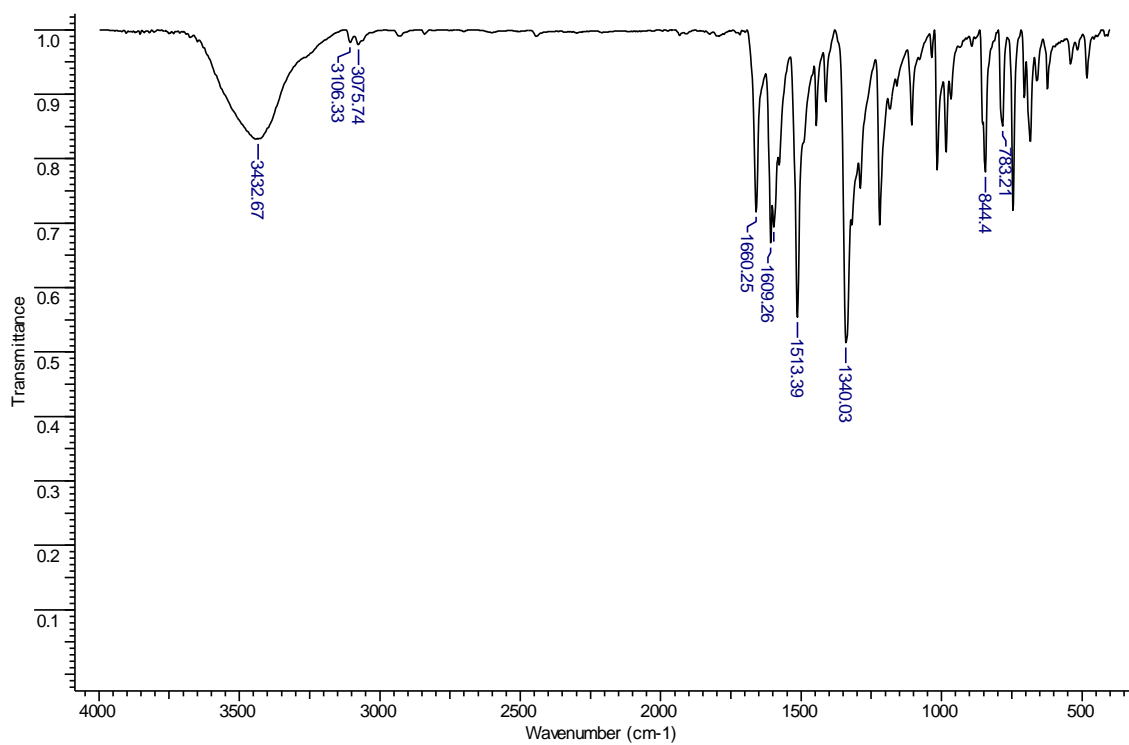


Figura 31- Espectro de IV da chalcona **7f** (KBr).

→ Chalcona **7g**:

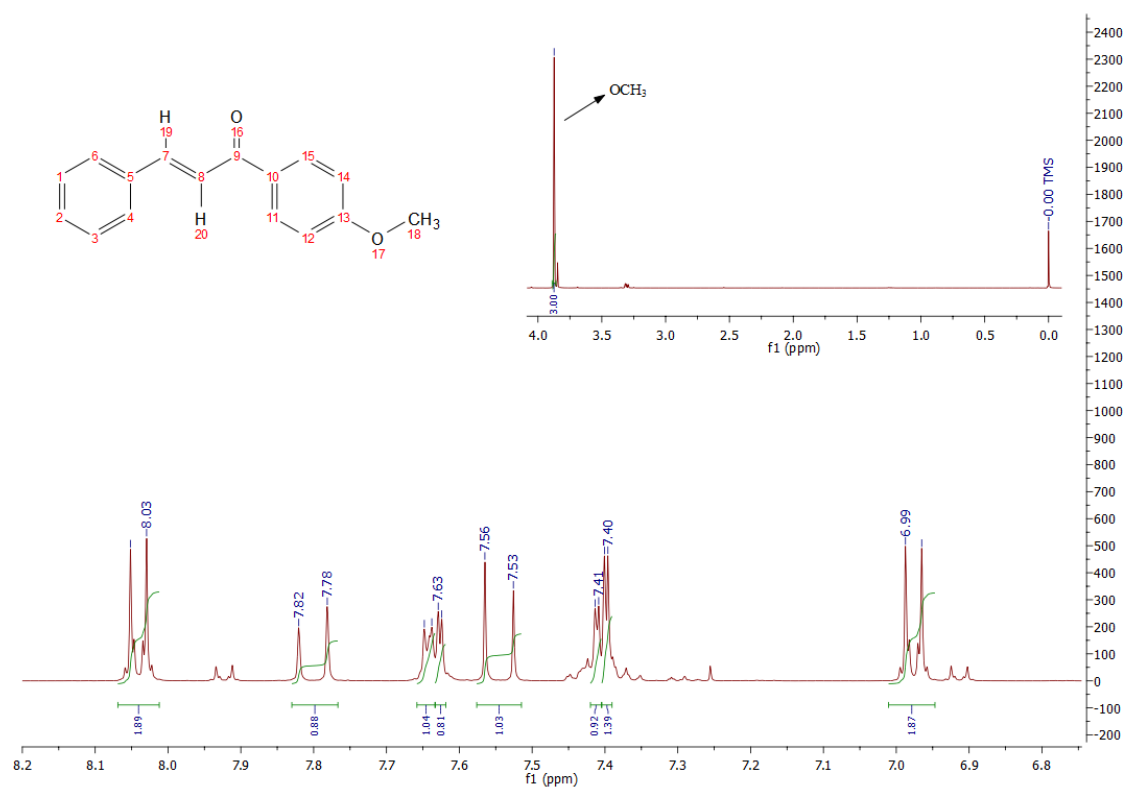


Figura 32- Espectro de RMN – ^1H da chalcona **7g** (400 MHz, CDCl_3).

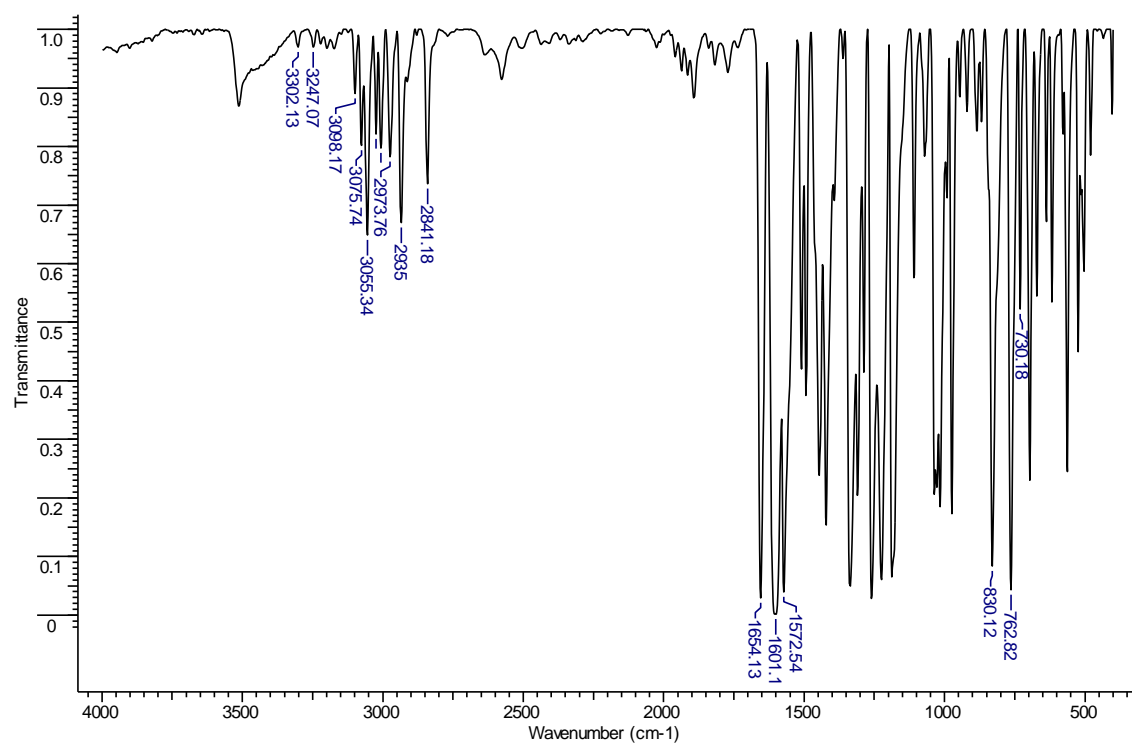


Figura 33- Espectro de IV da chalcona **7g** (KBr).

→ Chalcona **7h**:

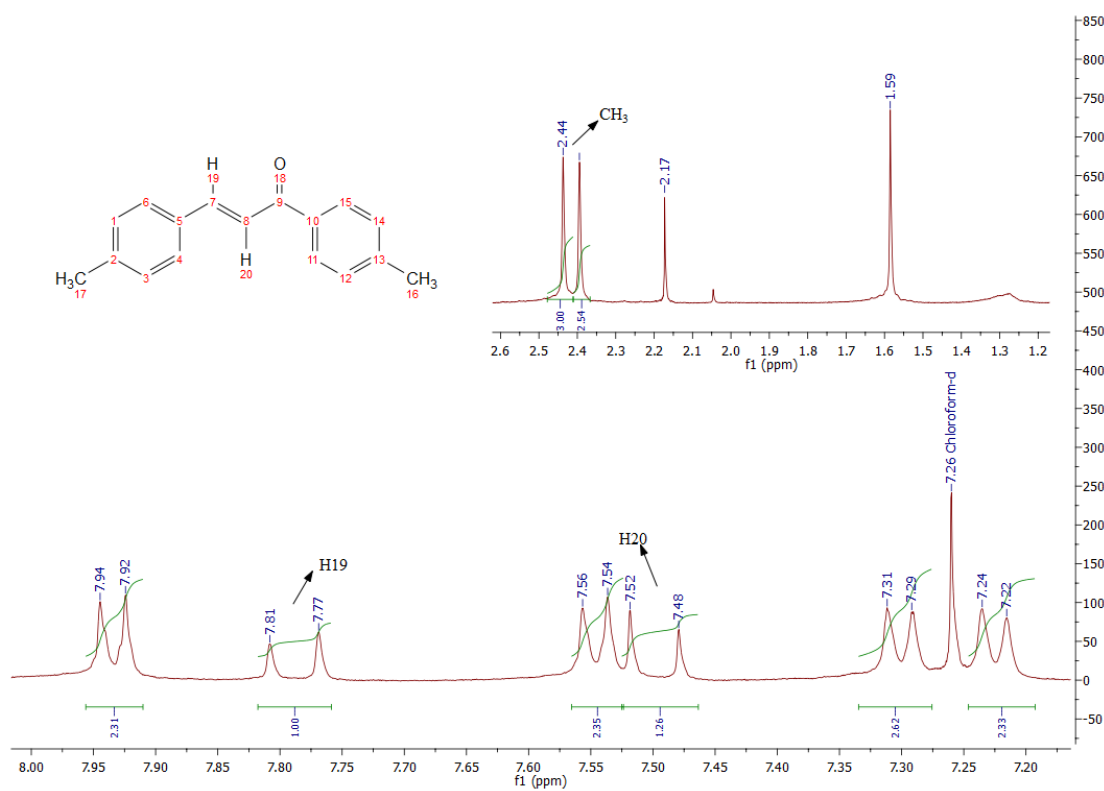


Figura 34- Espectro de RMN – ¹H da chalcona **7h** (400 MHz, CDCl₃).

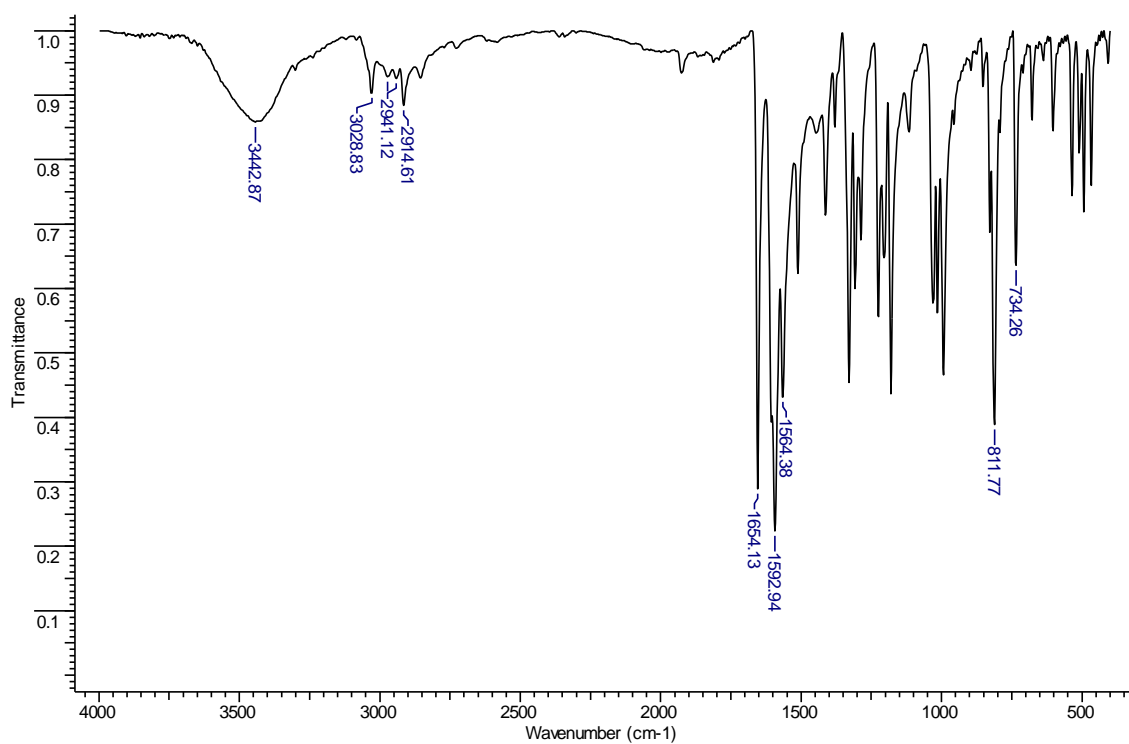


Figura 35- Espectro de IV da chalcona **7h** (KBr).

→ Chalcona 7i:

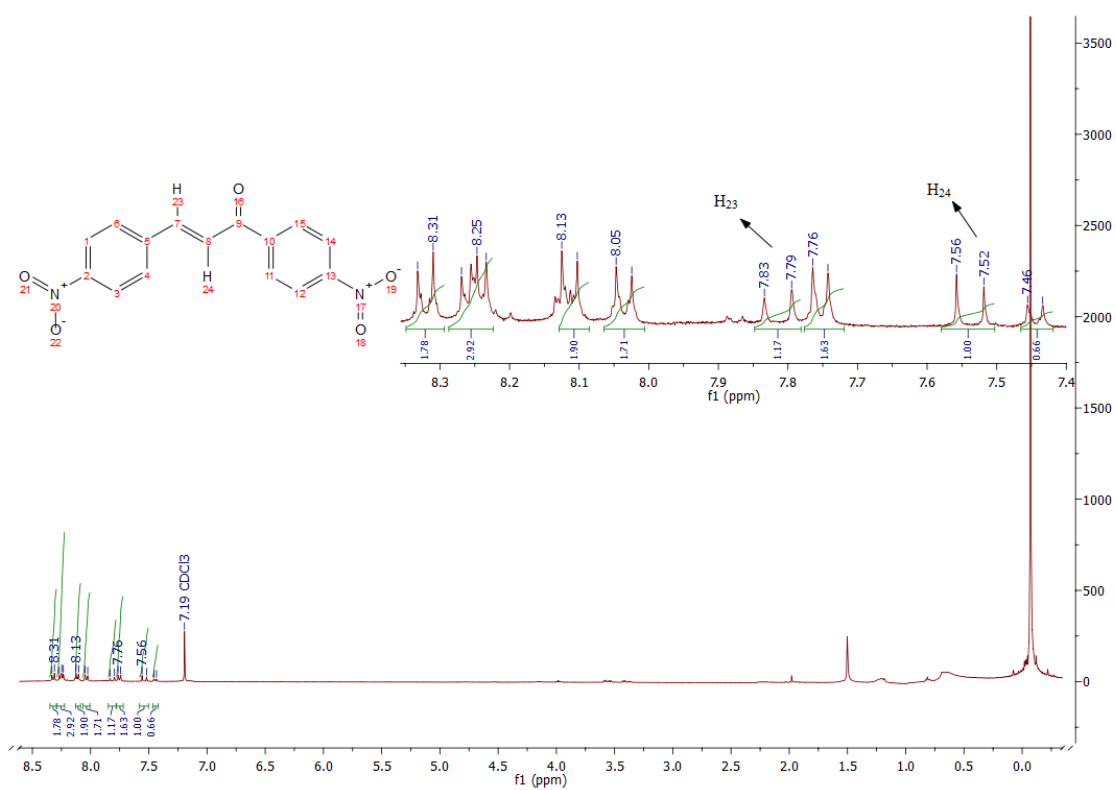


Figura 36- Espectro de RMN – ^1H da chalcona 7i (400 MHz, CDCl_3).

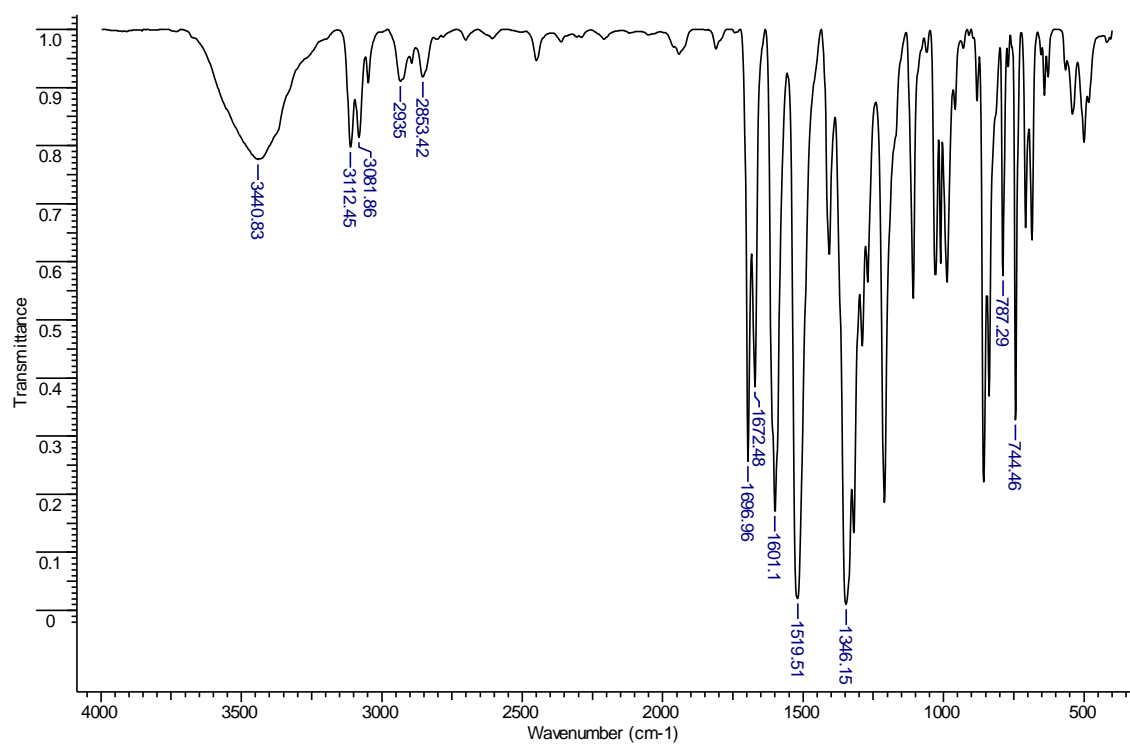


Figura 37- Espectro de IV da chalcona 7i (KBr).

→ Chalcona **7j**

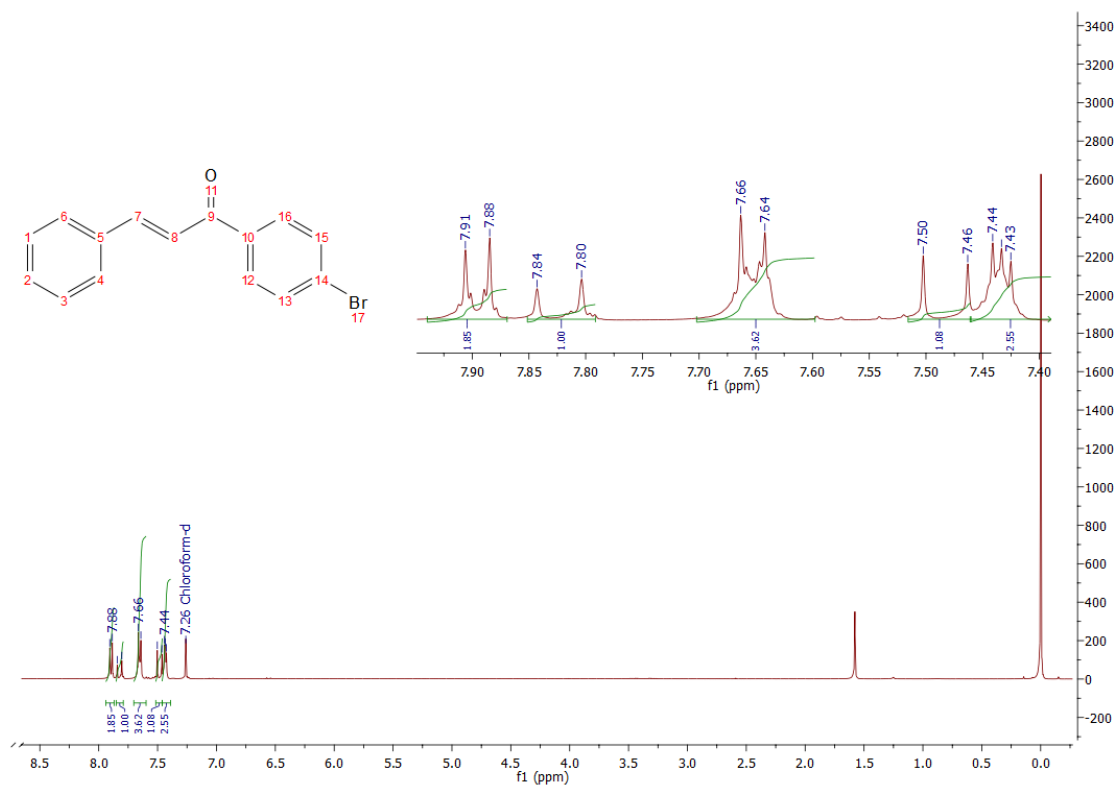


Figura 38- Espectro de RMN – ¹H da chalcona **7j** (400 MHz, CDCl₃).

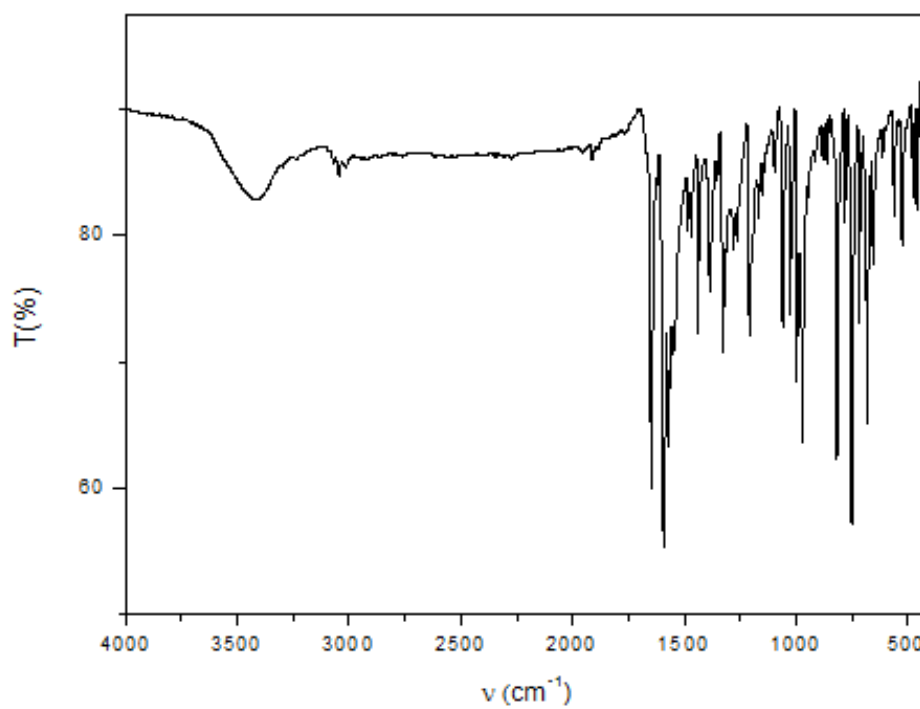


Figura 39- Espectro de IV da chalcona **7j** (KBr).

→ Chalcona **7k**

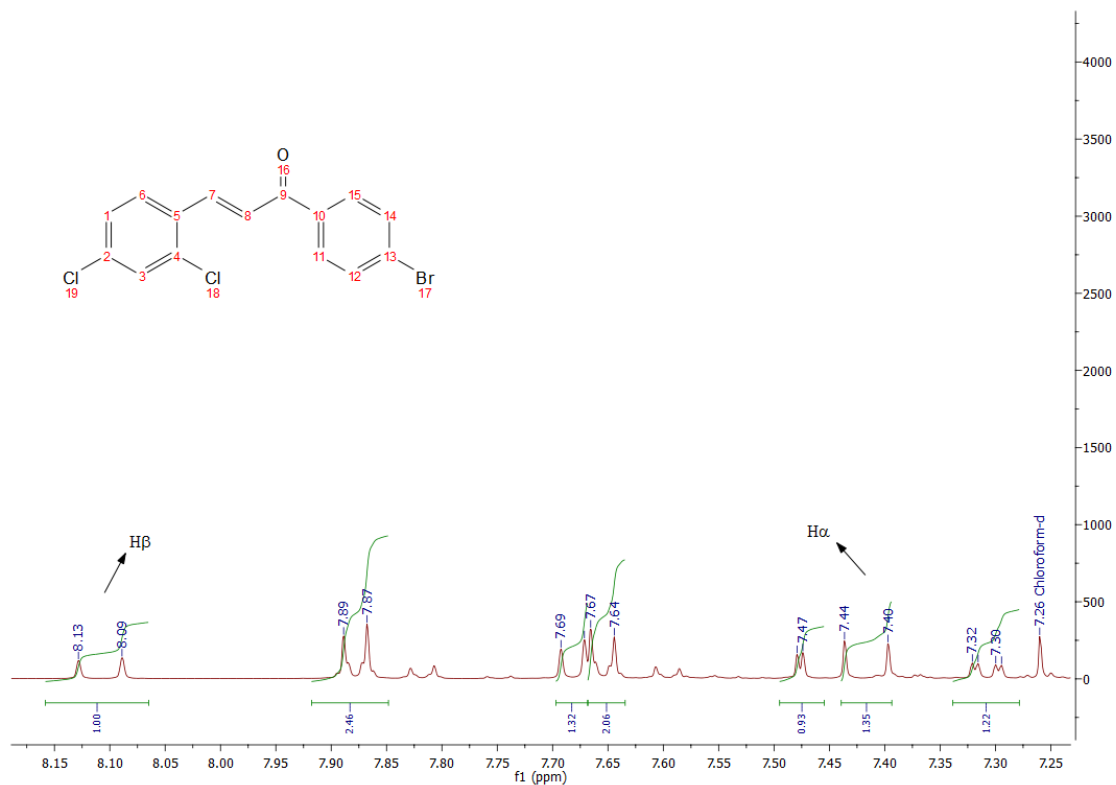


Figura 40- Espectro de RMN – ^1H da chalcona **7k** (400 MHz, CDCl_3).

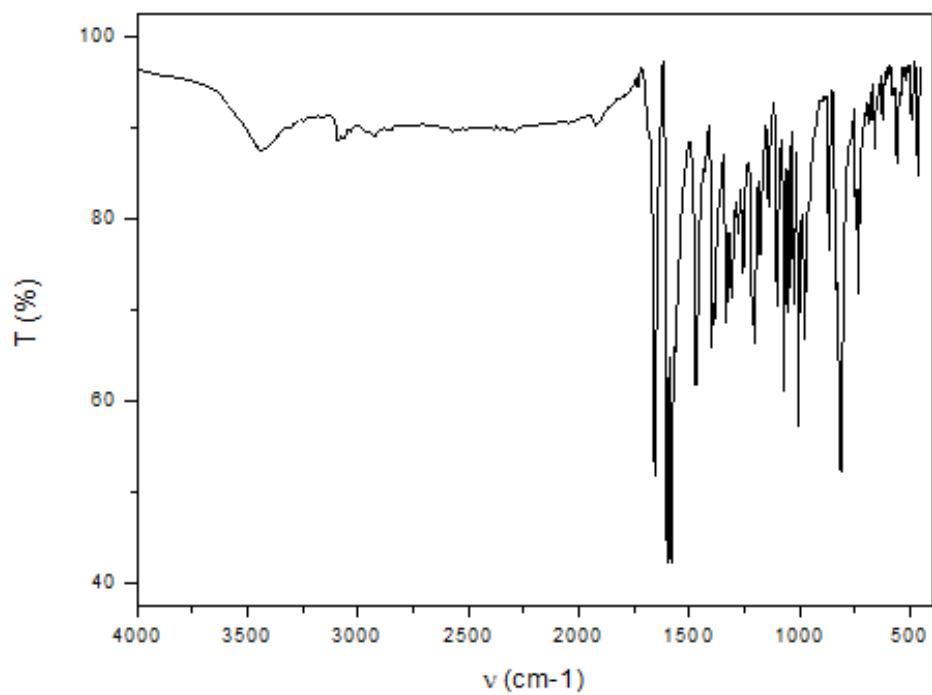


Figura 41- Espectro de IV da chalcona **7k** (KBr).

→ Chalcona **7I**

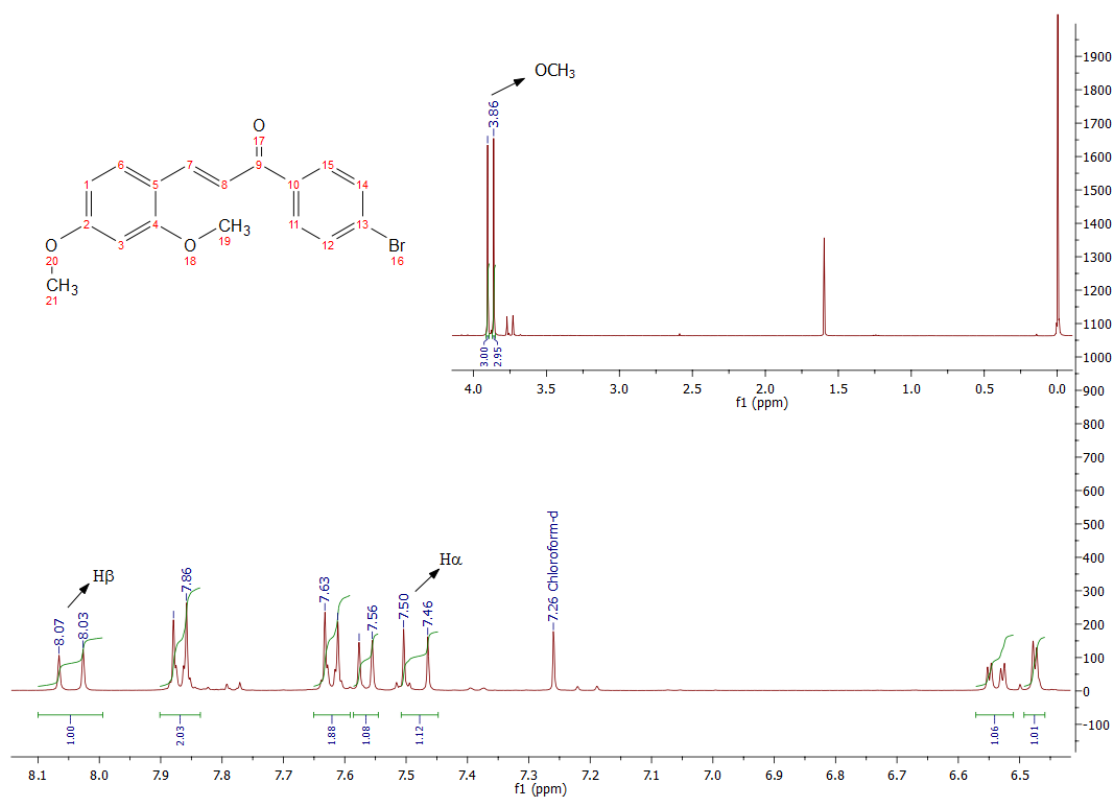


Figura 42- Espectro de RMN – ^1H da chalcona **7I** (400 MHz, CDCl_3).

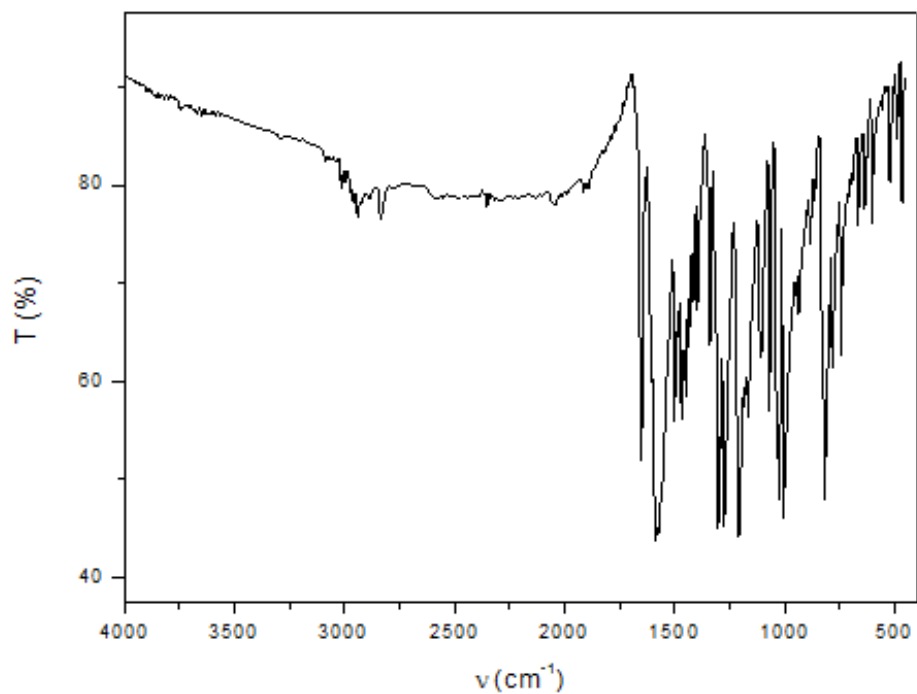


Figura 43- Espectro de IV da chalcona **7I** (KBr).

Álcoois:

→ Álcool **8a**:

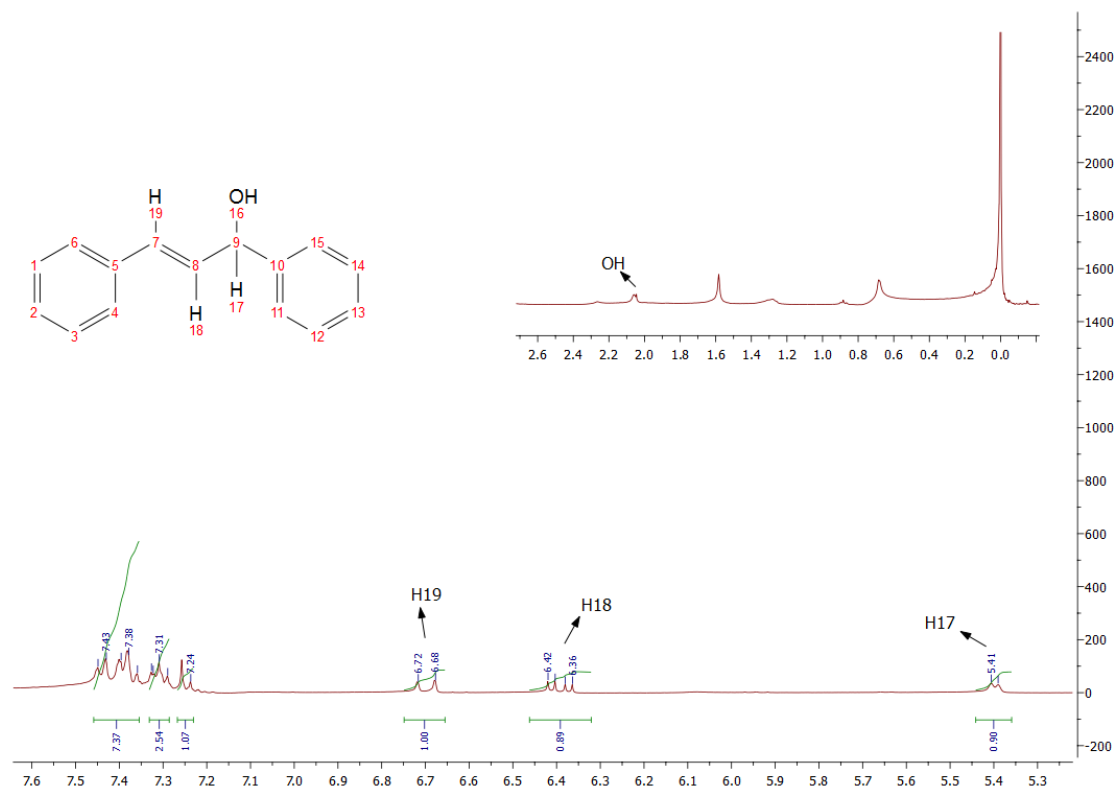


Figura 44- Espectro de RMN – ^1H do álcool **8a** (400 MHz, CDCl_3).

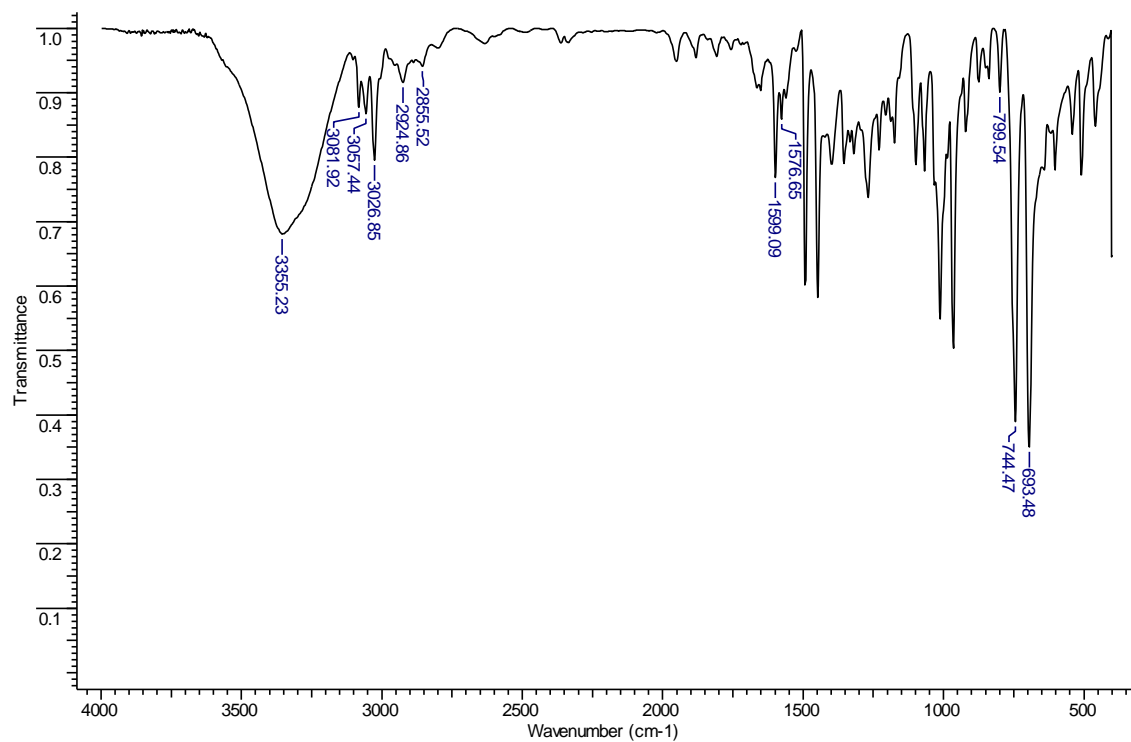


Figura 45- Espectro de IV do álcool **8a** (KBr).

→ Álcool **8b**:

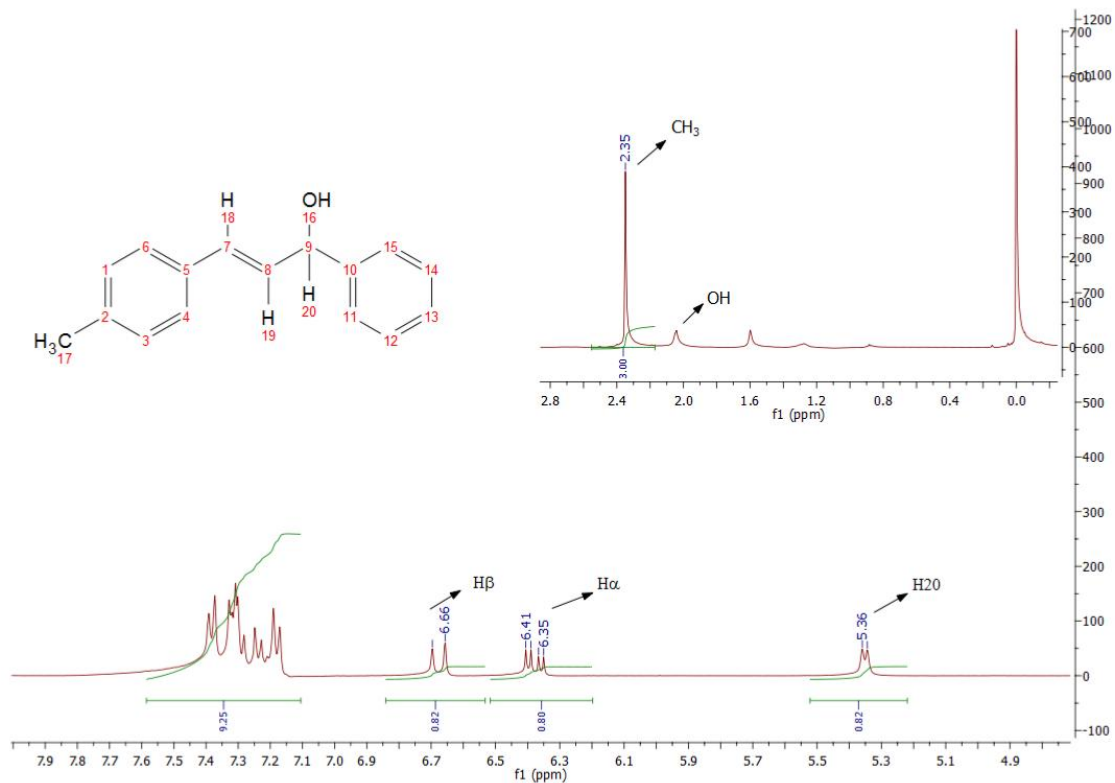


Figura 46- Espectro de RMN – ^1H do álcool **8b** (400 MHz, CDCl_3).

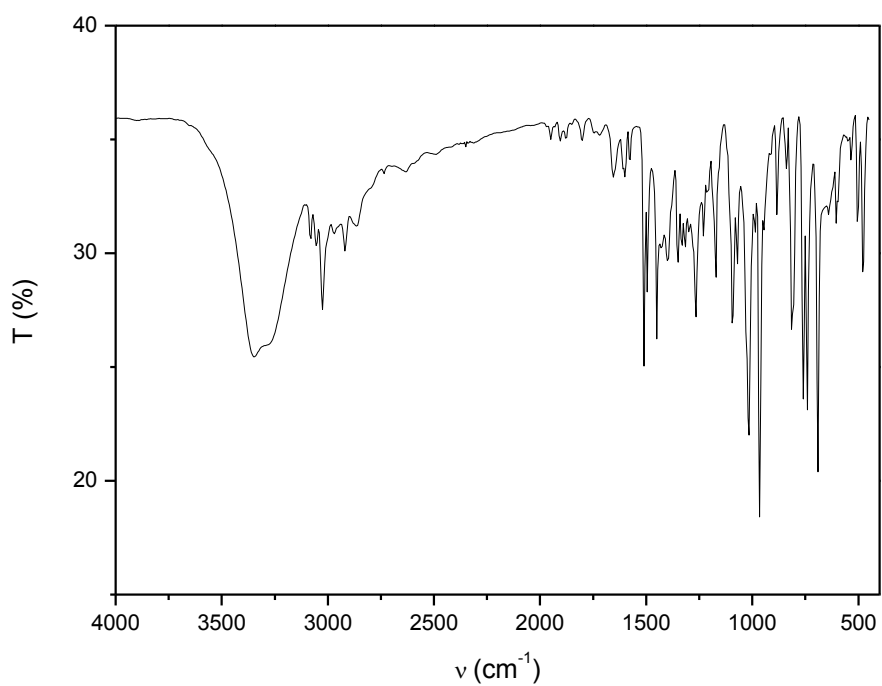


Figura 47- Espectro de IV do álcool **8b** (KBr).

→ Álcool **8c**:

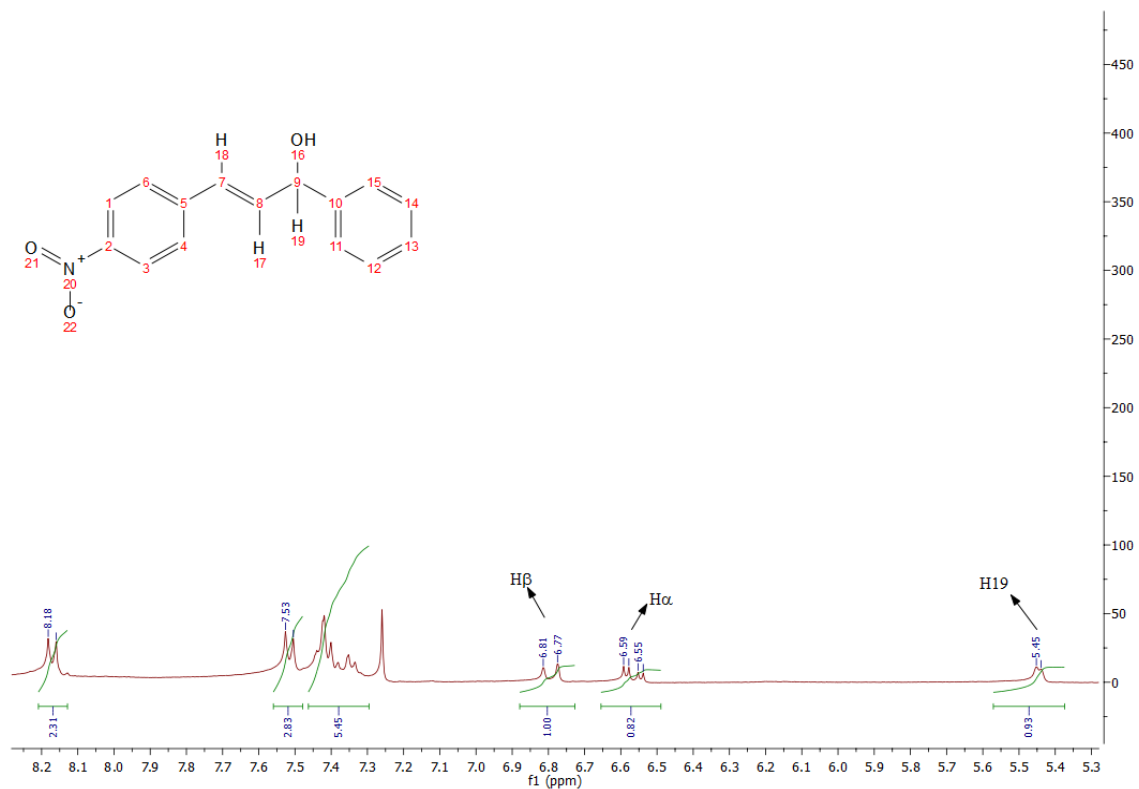


Figura 48- Espectro de RMN – ^1H do álcool **8c** (400 MHz, CDCl_3).

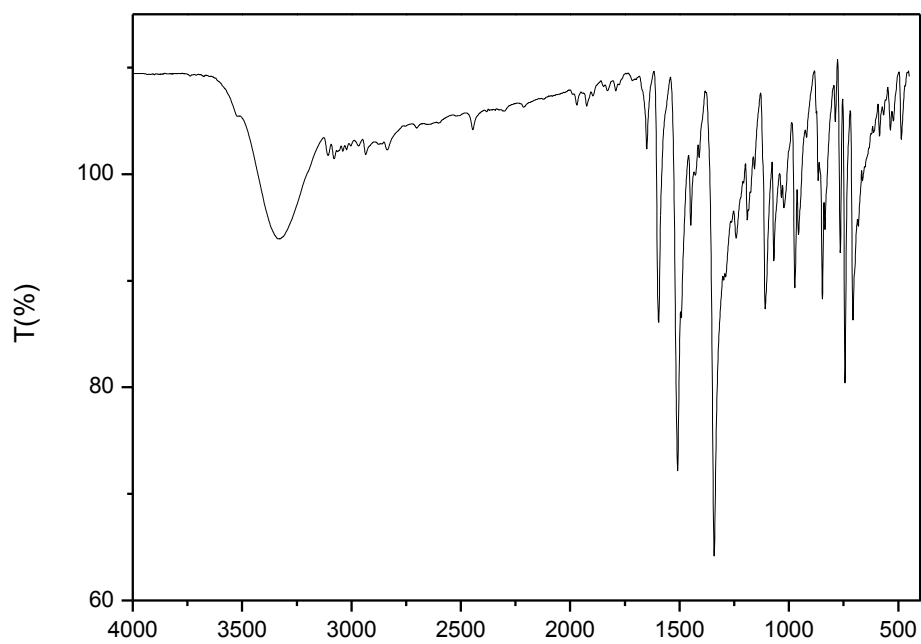


Figura 49- Espectro de IV do álcool **8c** (KBr).

→ Álcool **8d**:

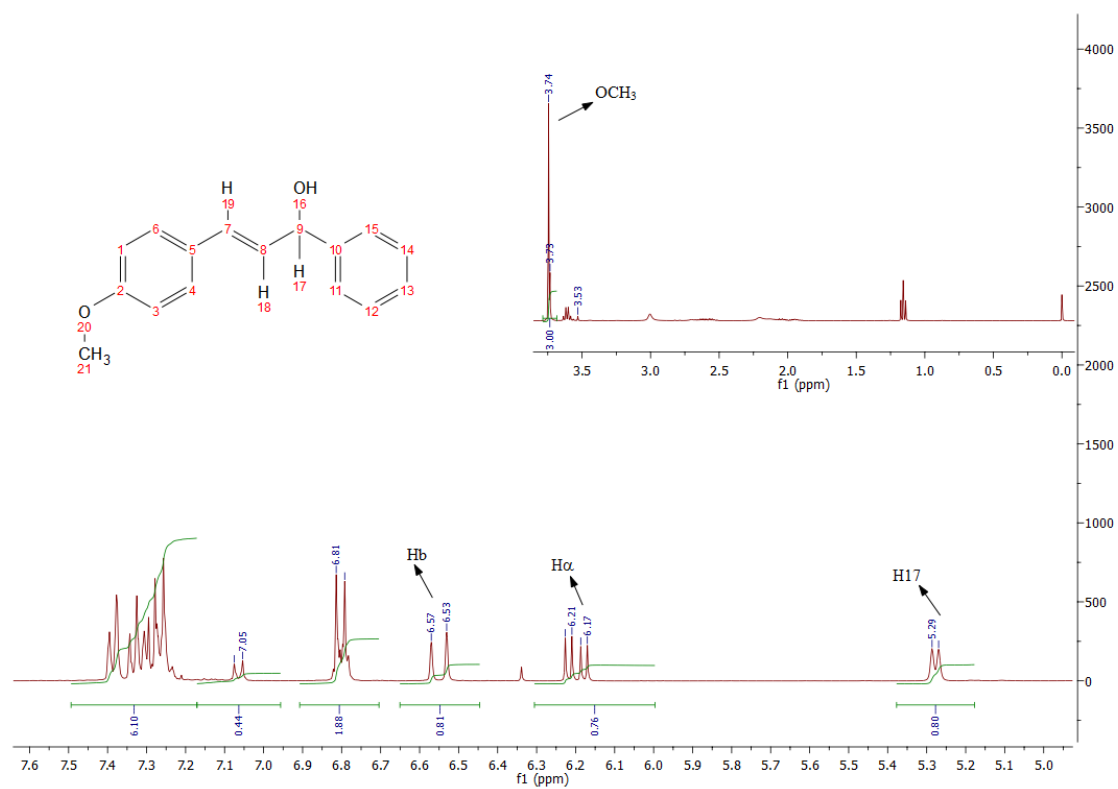


Figura 50- Espectro de RMN – ¹H do álcool **8d** (400 MHz, CDCl₃).

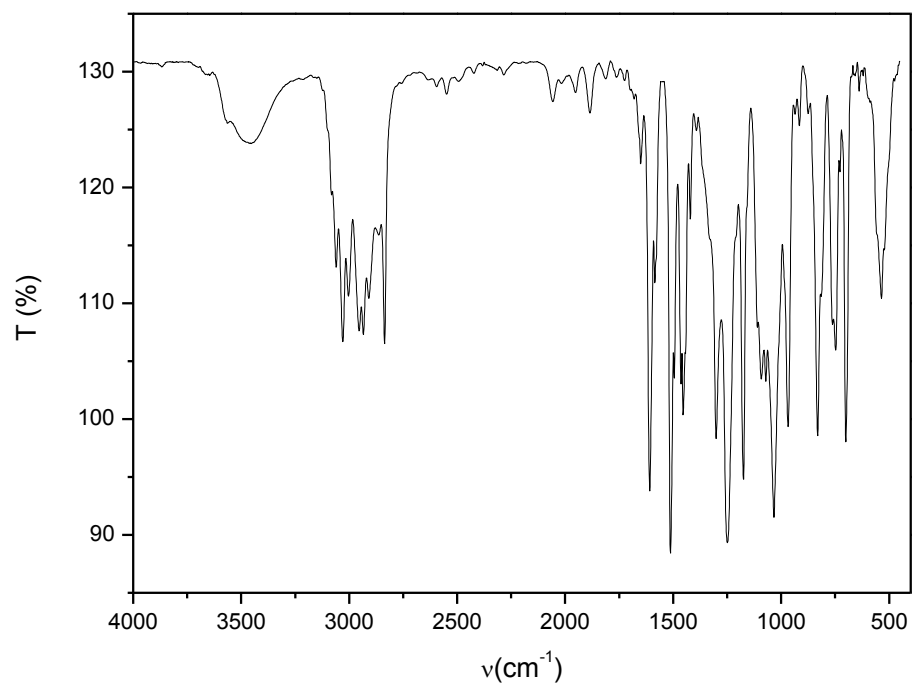


Figura 51- Espectro de IV do álcool **8d** (KBr).

→ Álcool **8e**:

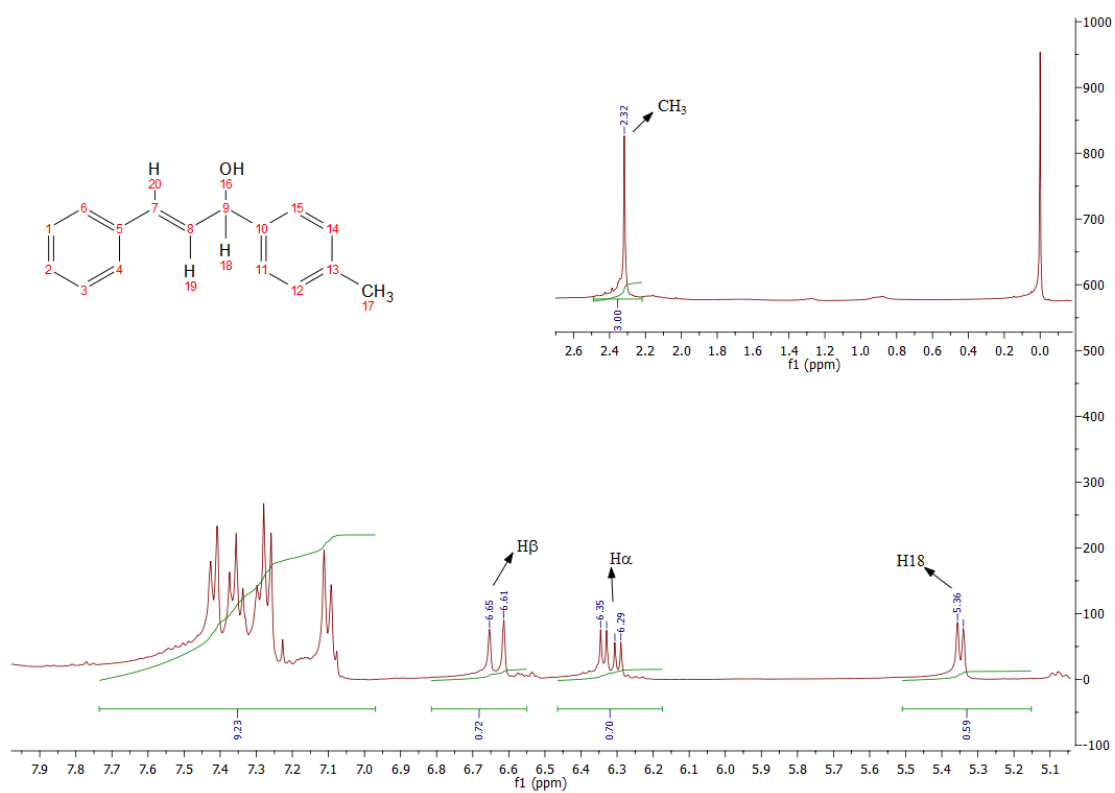


Figura 52- Espectro de RMN – ^1H do álcool **8e** (400 MHz, CDCl₃).

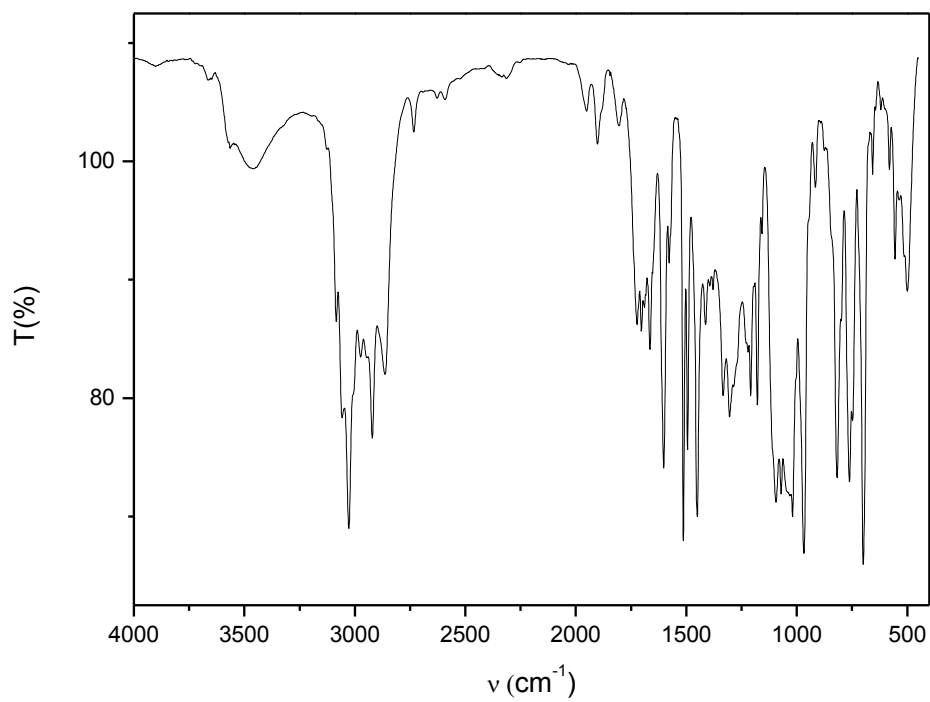


Figura 53- Espectro de IV do álcool **8e** (KBr).

→ Álcool **8f**:

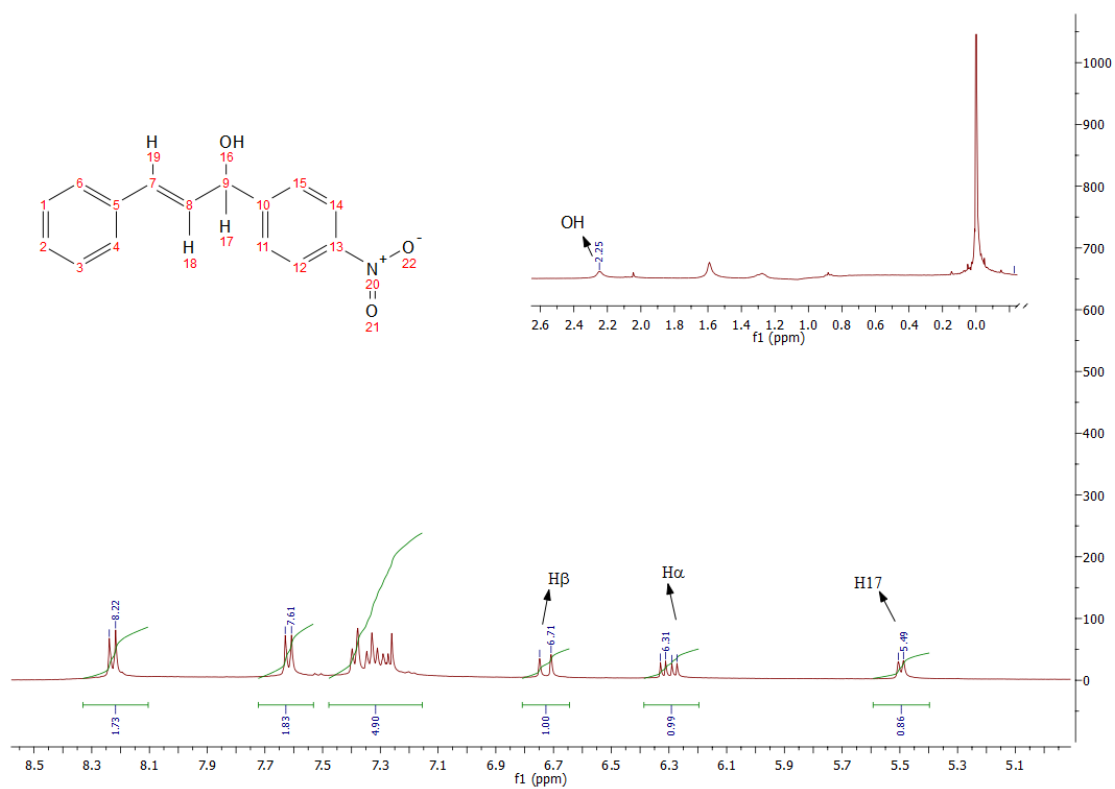


Figura 54- Espectro de RMN – ^1H do álcool **8f** (400 MHz, CDCl_3).

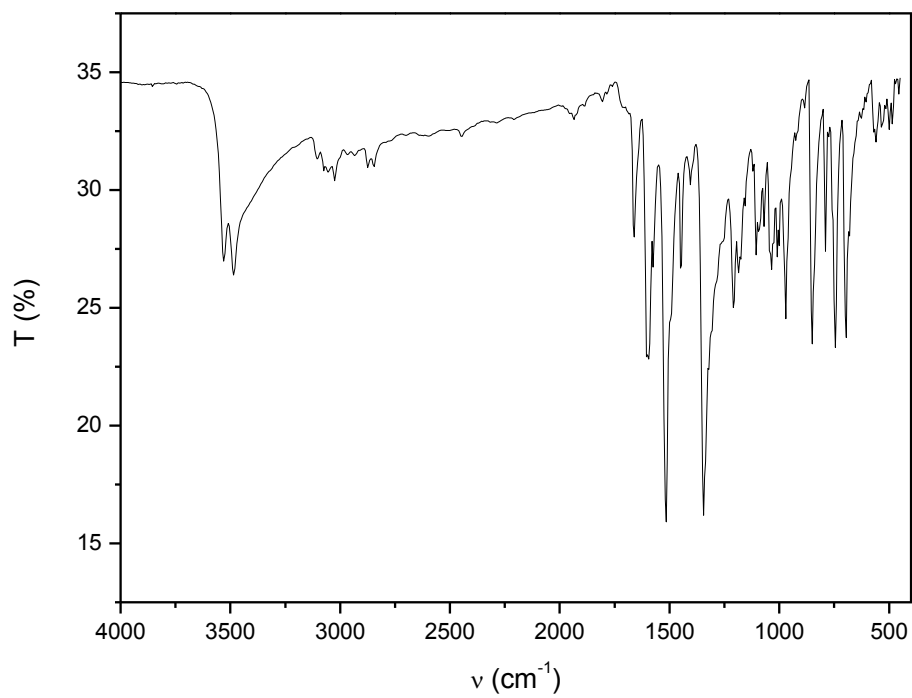


Figura 55- Espectro de IV do álcool **8f** (KBr).

→ Álcool **8g**:

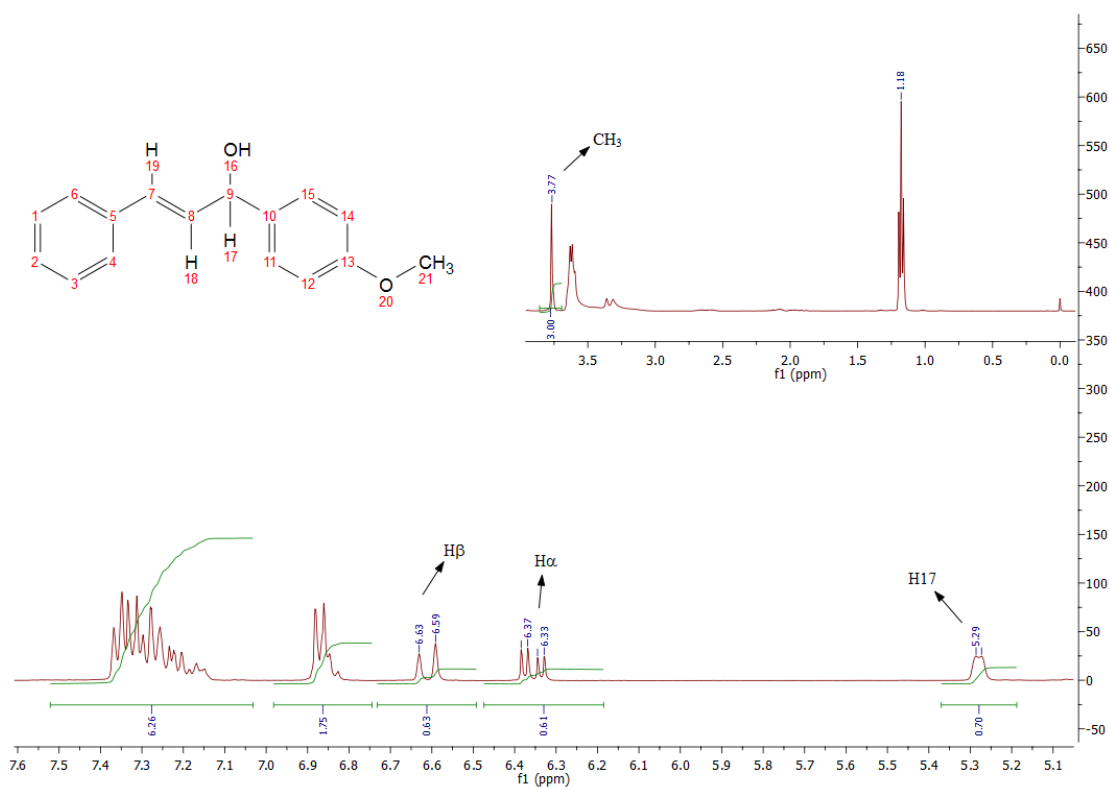


Figura 56- Espectro de RMN – ^1H do álcool **8g** (400 MHz, CDCl_3).

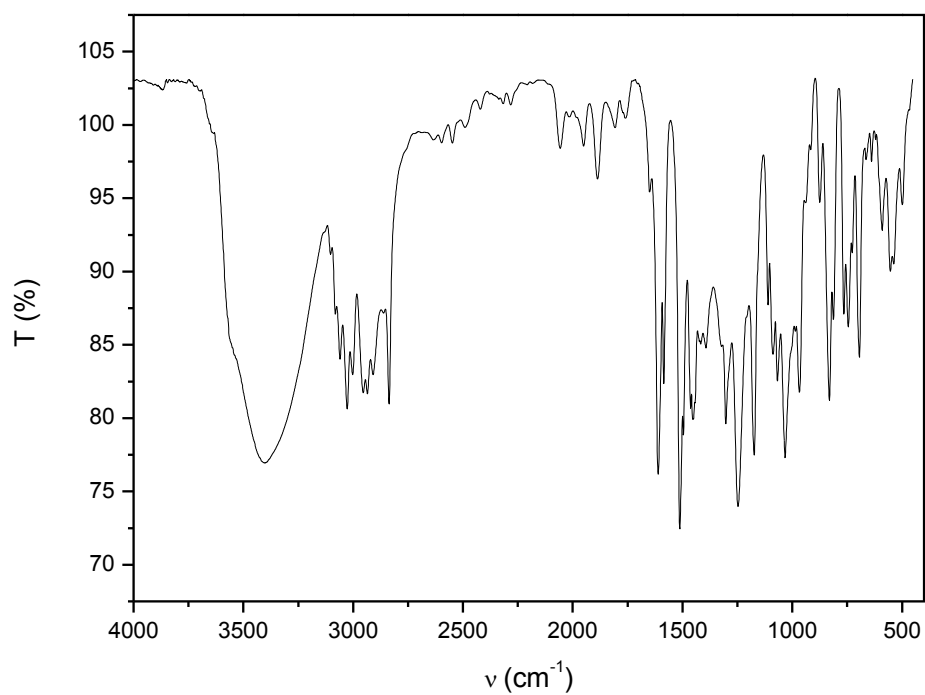


Figura 57- Espectro de IV do álcool **8g** (KBr).

→ Álcool **8h**:

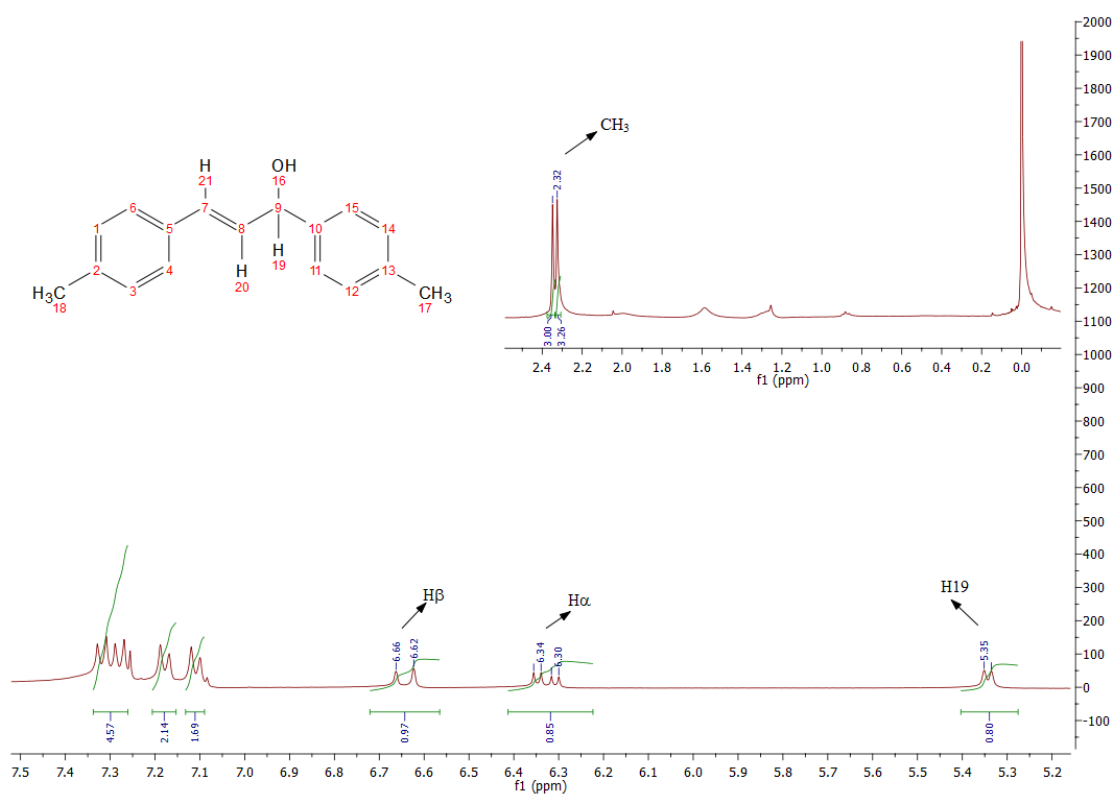


Figura 58- Espectro de RMN – ^1H do álcool **8h** (400 MHz, CDCl_3).

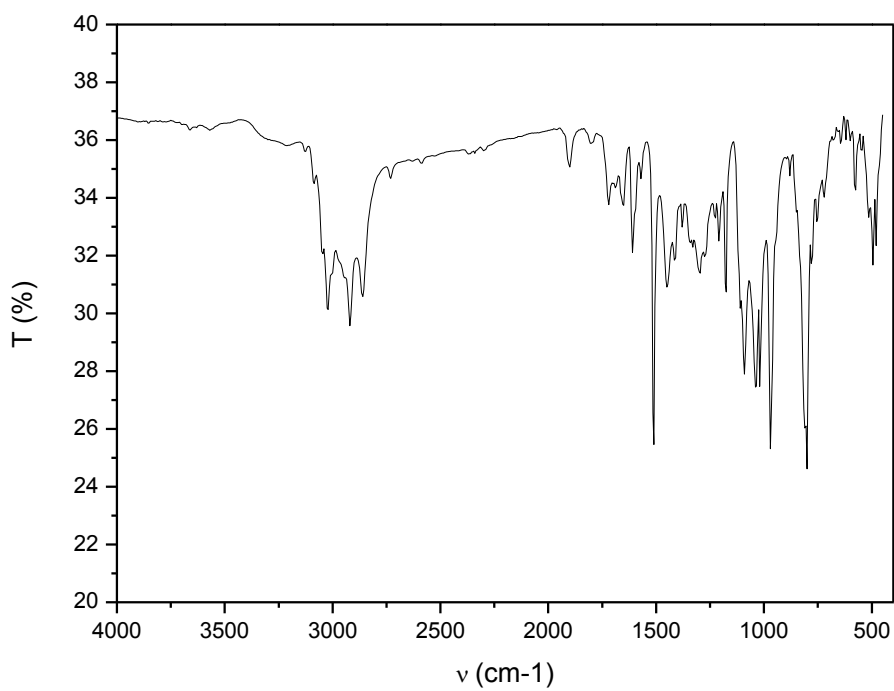


Figura 59- Espectro de IV do álcool **8h** (KBr).

→ Álcool **8i**:

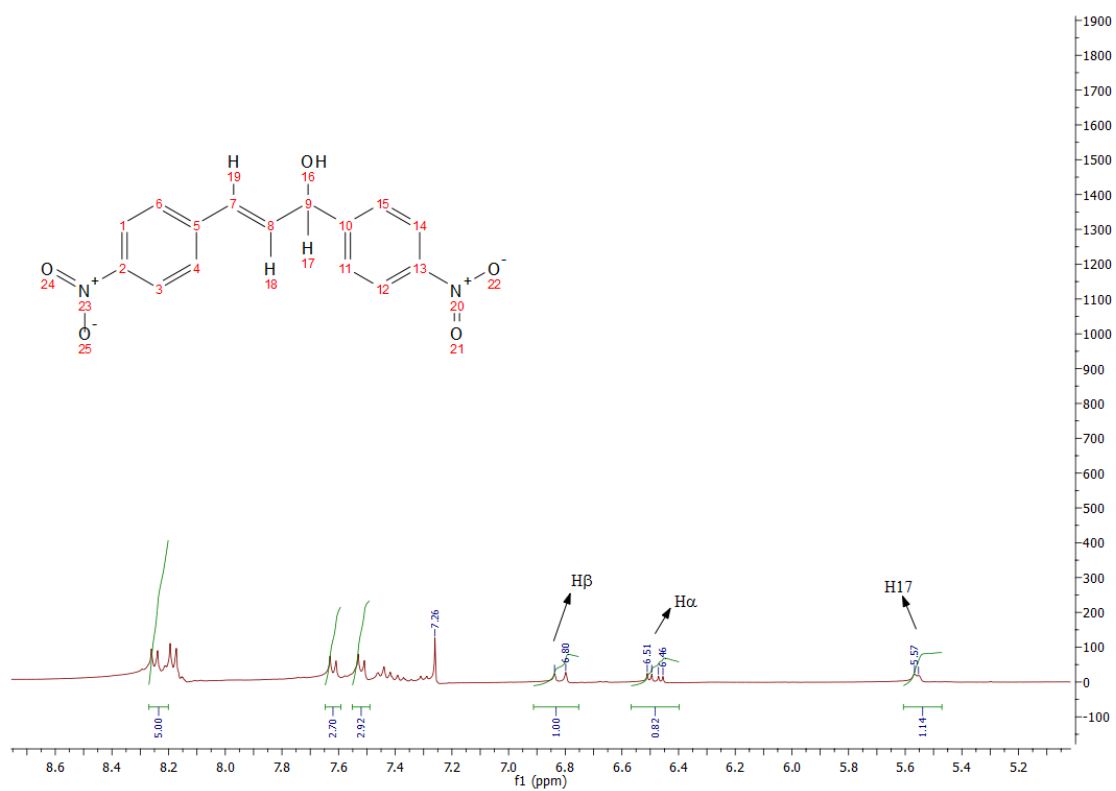


Figura 60- Espectro de RMN – ^1H do álcool **8i** (400 MHz, CDCl_3).

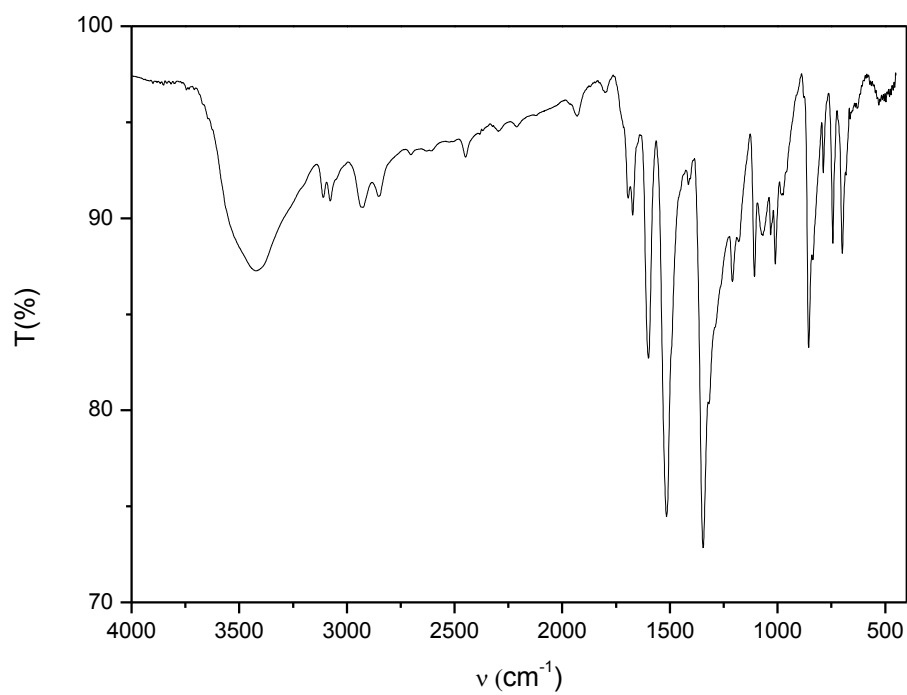


Figura 61- Espectro de IV do álcool **8i** (KBr).

→ Álcool **8j**:

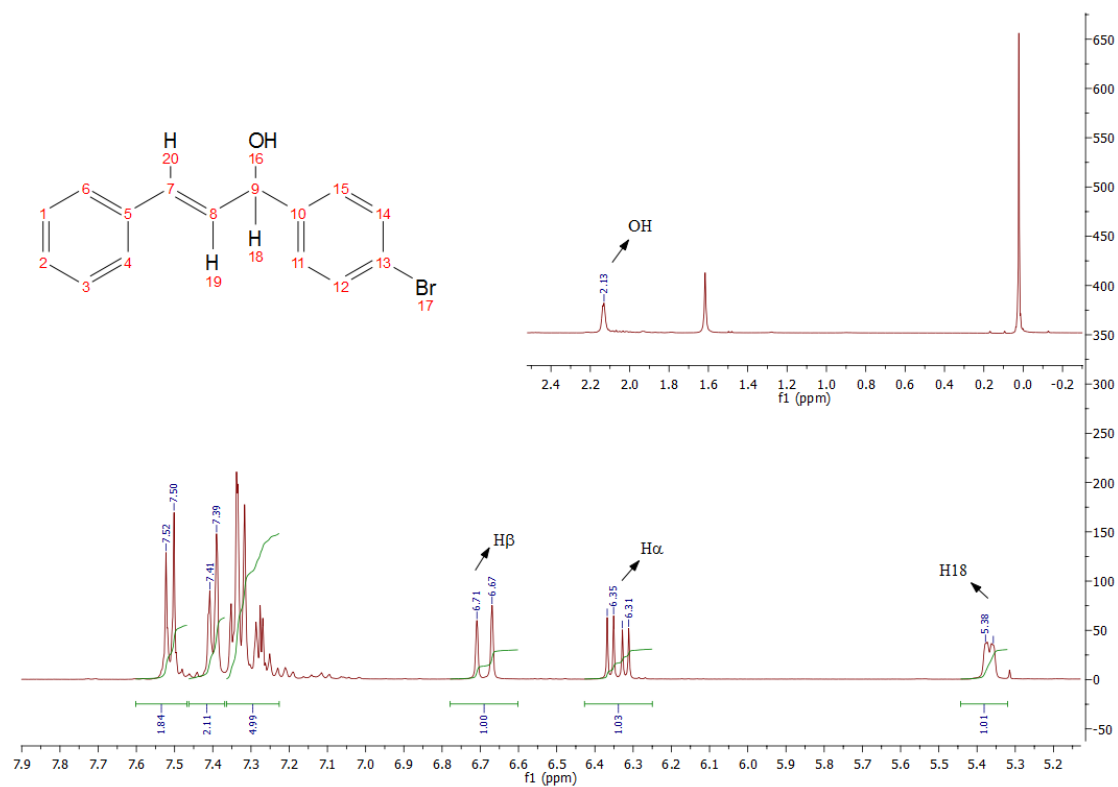


Figura 62- Espectro de RMN – ^1H do álcool **8j** (400 MHz, CDCl_3).

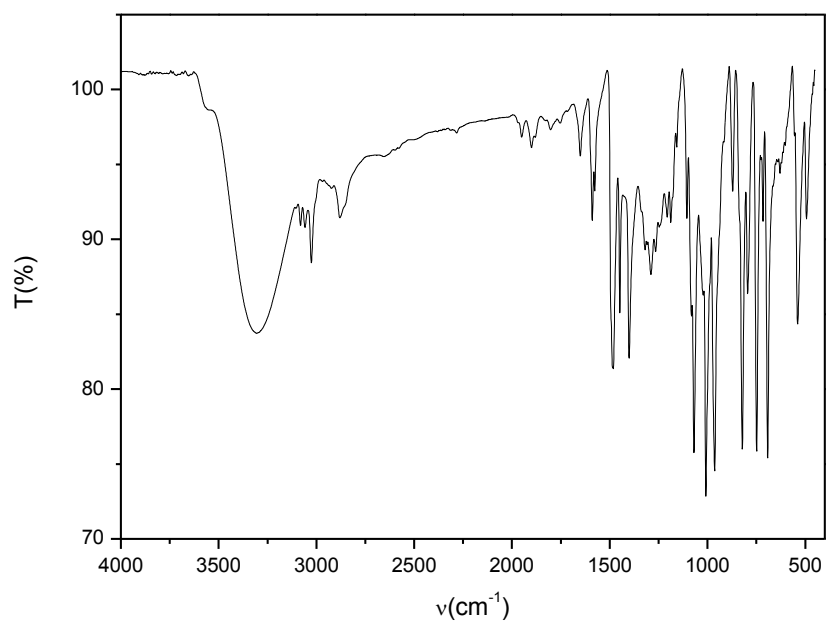


Figura 63- Espectro de IV do álcool **8j** (KBr).

→ Álcool **8k**:

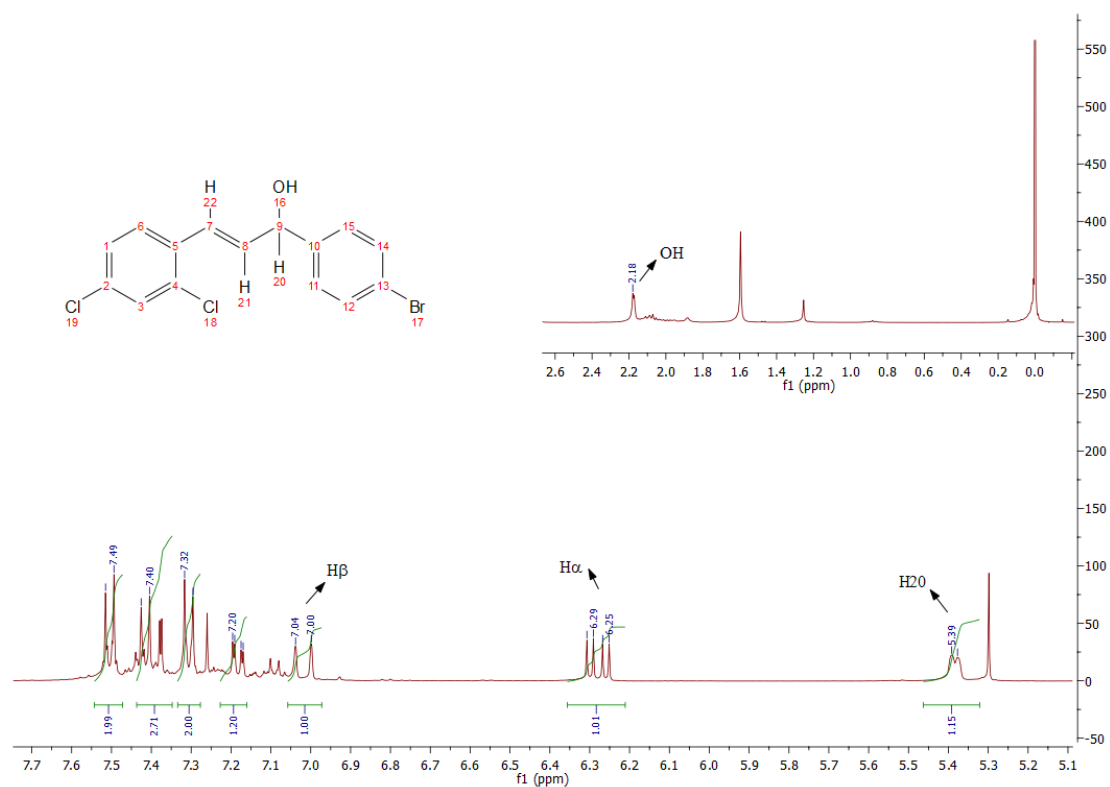


Figura 64- Espectro de RMN – ^1H do álcool **8k** (400 MHz, CDCl_3).

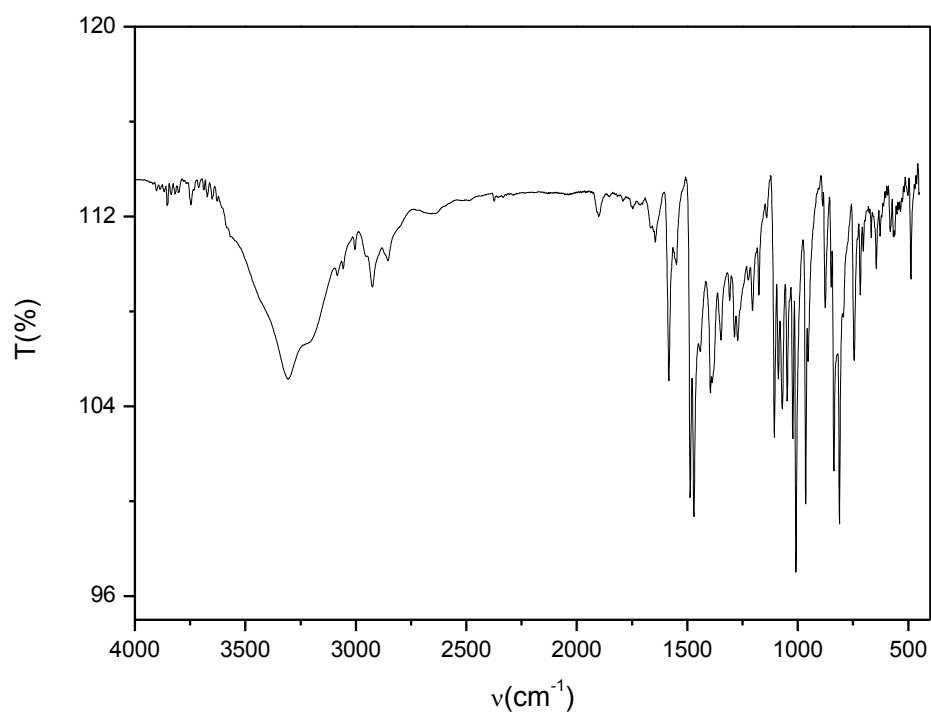


Figura 65- Espectro de IV do álcool **8k** (KBr)

→ Álcool **8I**:

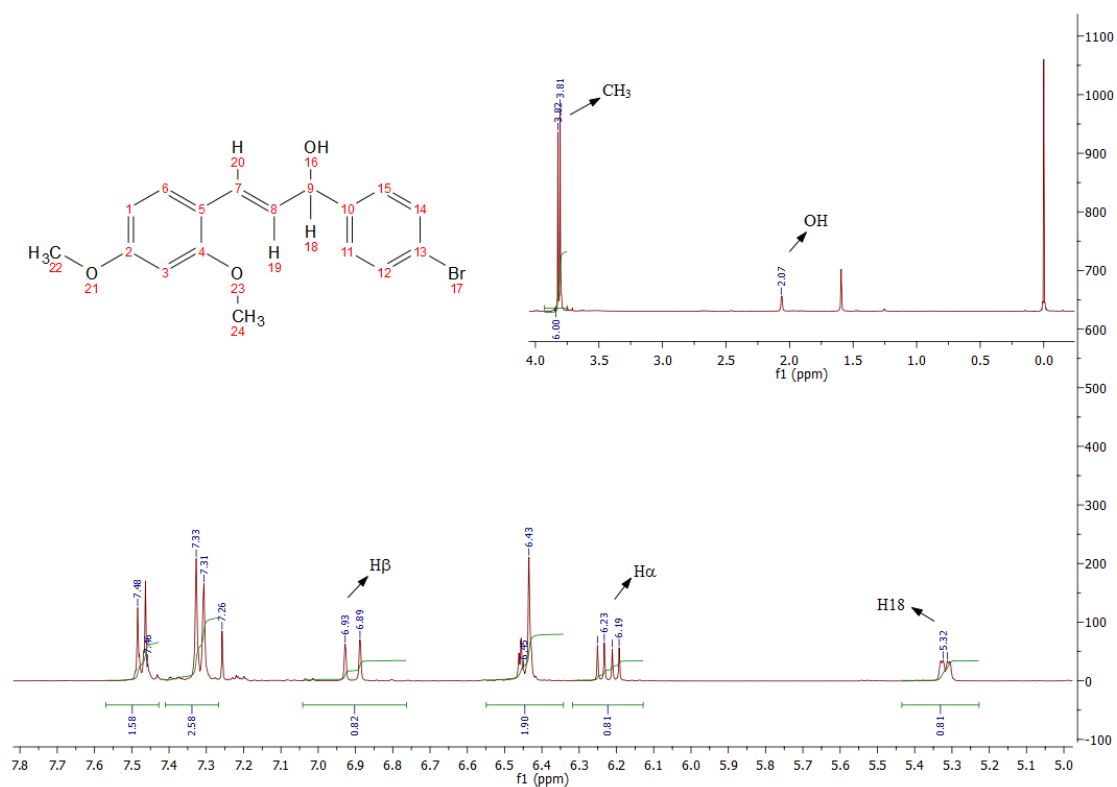


Figura 66- Espectro de RMN – ^1H do álcool **8I** (400 MHz, CDCl₃).

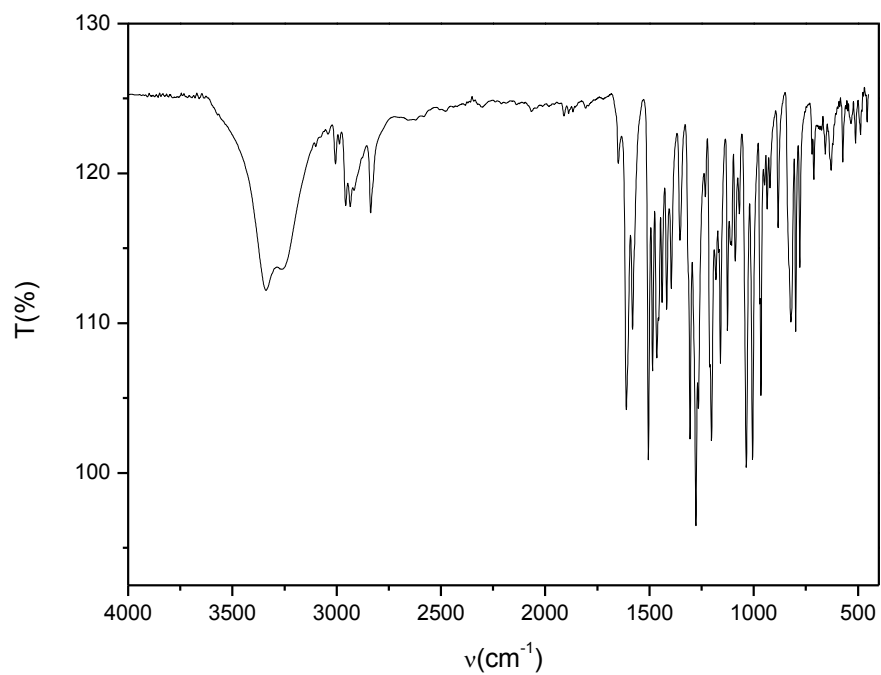


Figura 67- Espectro de IV do álcool **8I** (KBr)

Biorredução em sistema bifásico

→ Dihidrochalcona **9b**

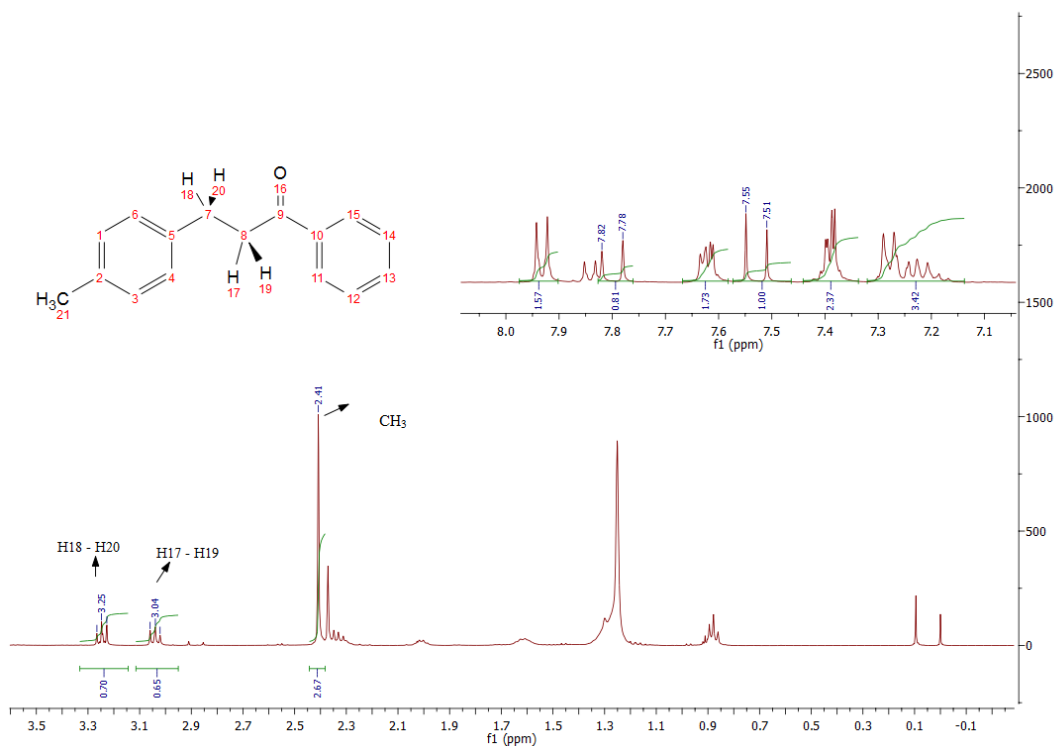


Figura 68- Espectro de RMN – ^1H da dihidrochalcona **9b** (400 MHz, CDCl_3).

→ Dihidrochalcona **9e**

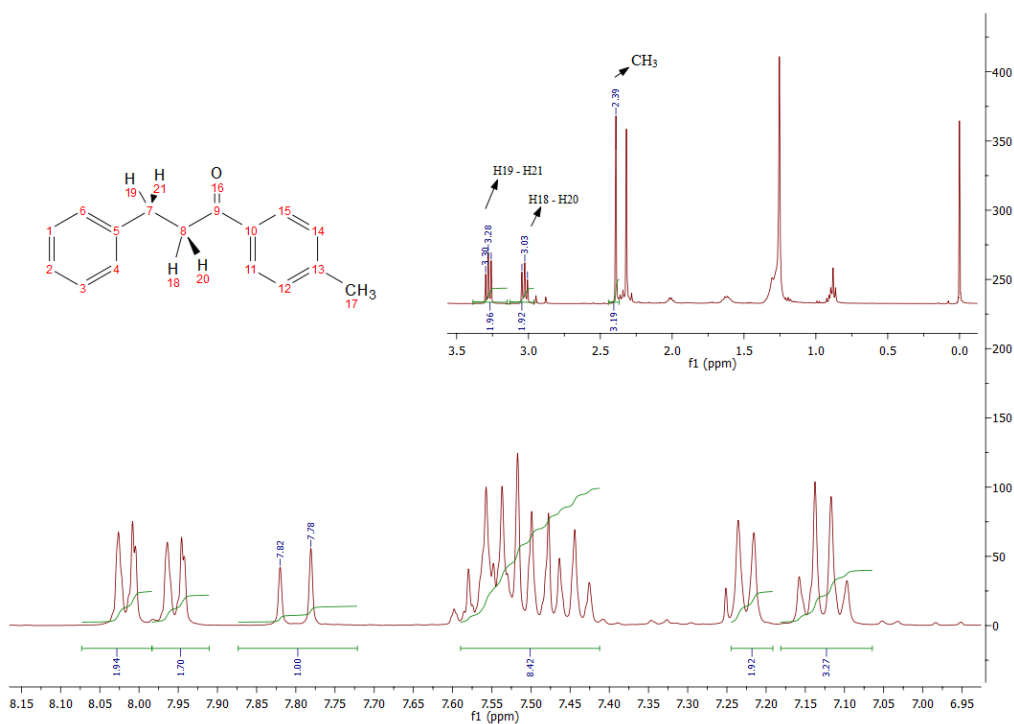


Figura 69- Espectro de RMN – ^1H da dihidrochalcona **9e** (400 MHz, CDCl_3).

→ Dihidrochalcona **9h**

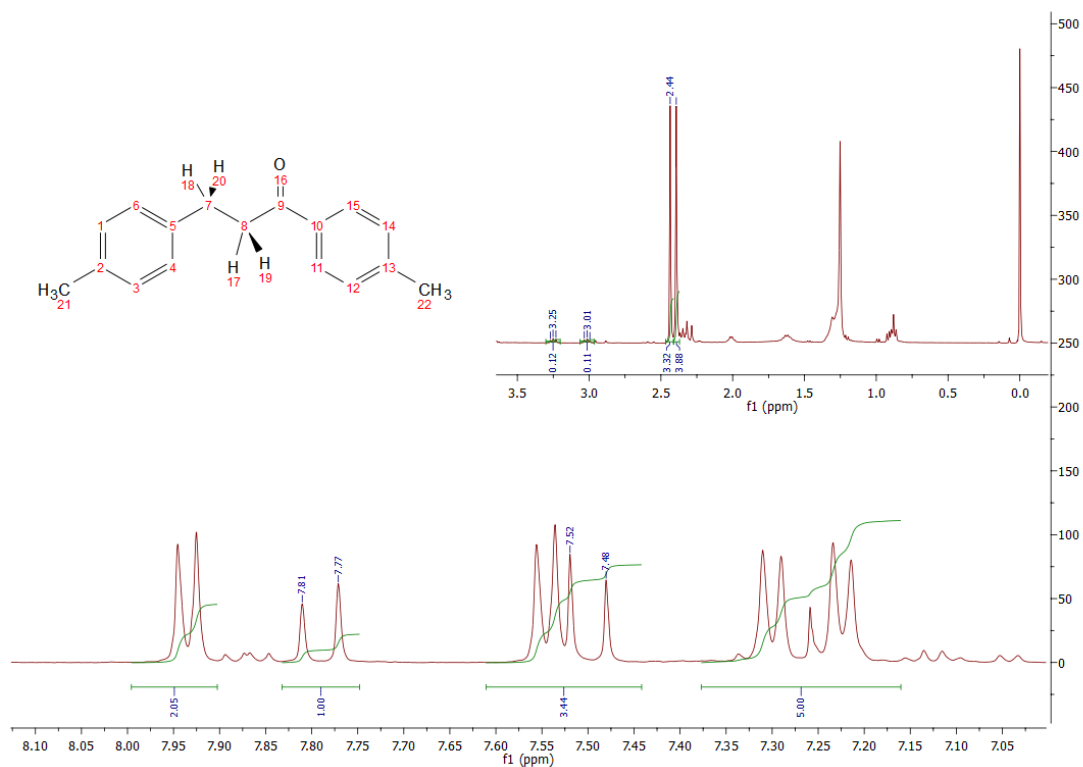


Figura 70- Espectro de RMN – ^1H da dihidrochalcona **9h** (400 MHz, CDCl_3).

→ Dihidrochalcona **9i**

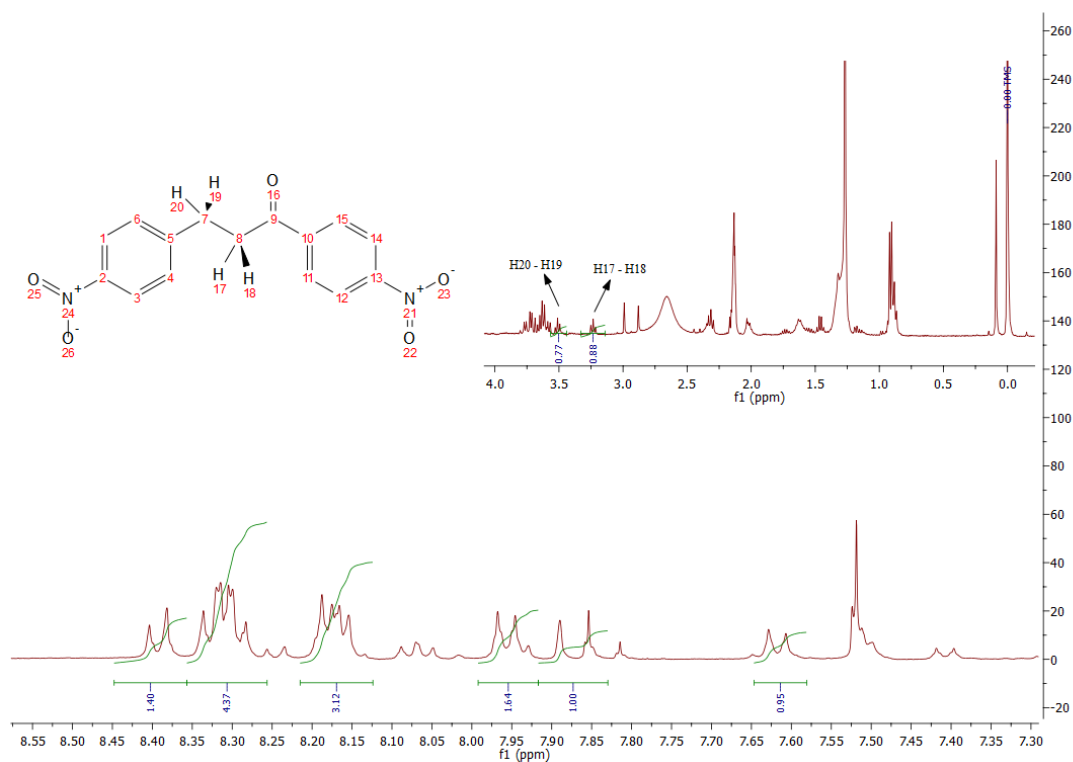


Figura 71- Espectro de RMN – ^1H da dihidrochalcona **9i** (400 MHz, CDCl_3).

→ Dihidrochalcona **9j**

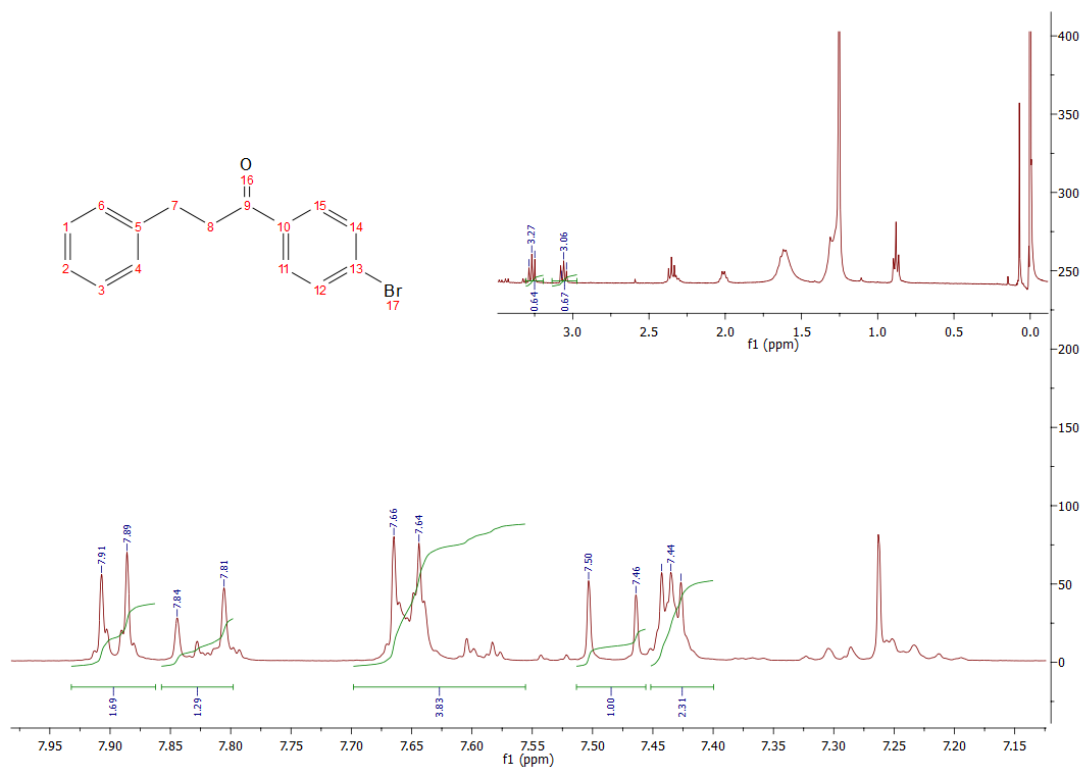


Figura 72- Espectro de RMN – ^1H da dihidrochalcona **9j** (400 MHz, CDCl_3).

→ Dihidrochalcona **9k**

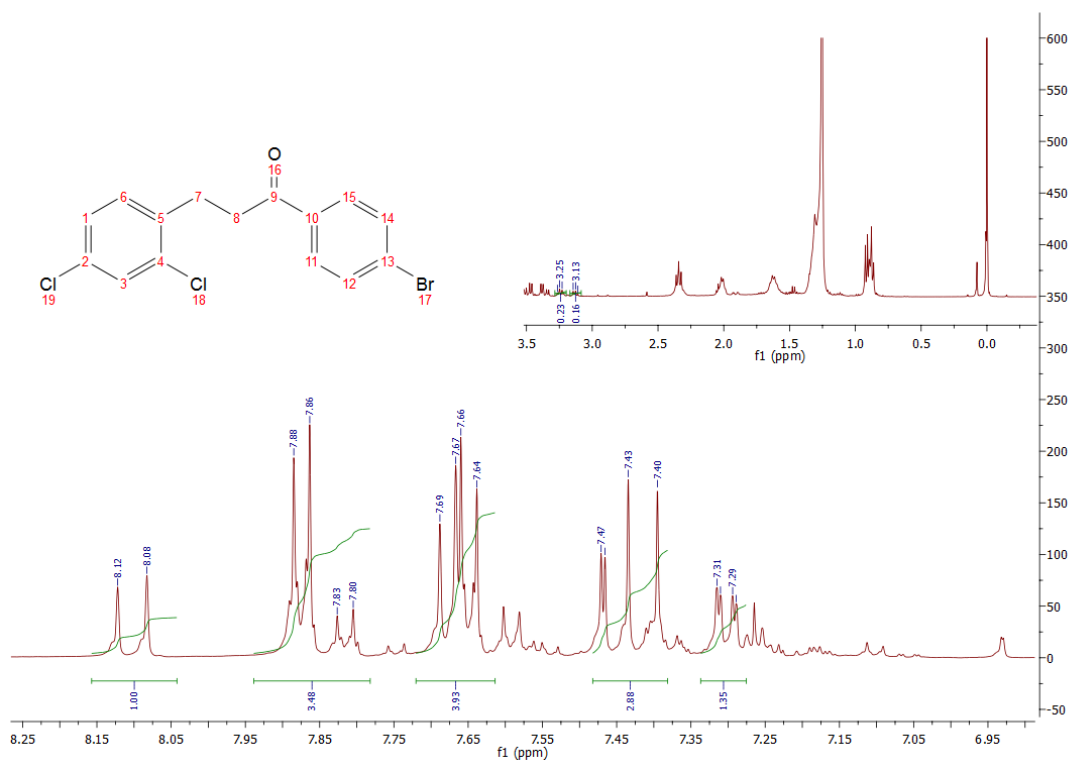


Figura 73- Espectro de RMN – ^1H da dihidrochalcona **9k** (400 MHz, CDCl_3).

→ Dihidrochalcona **9I**

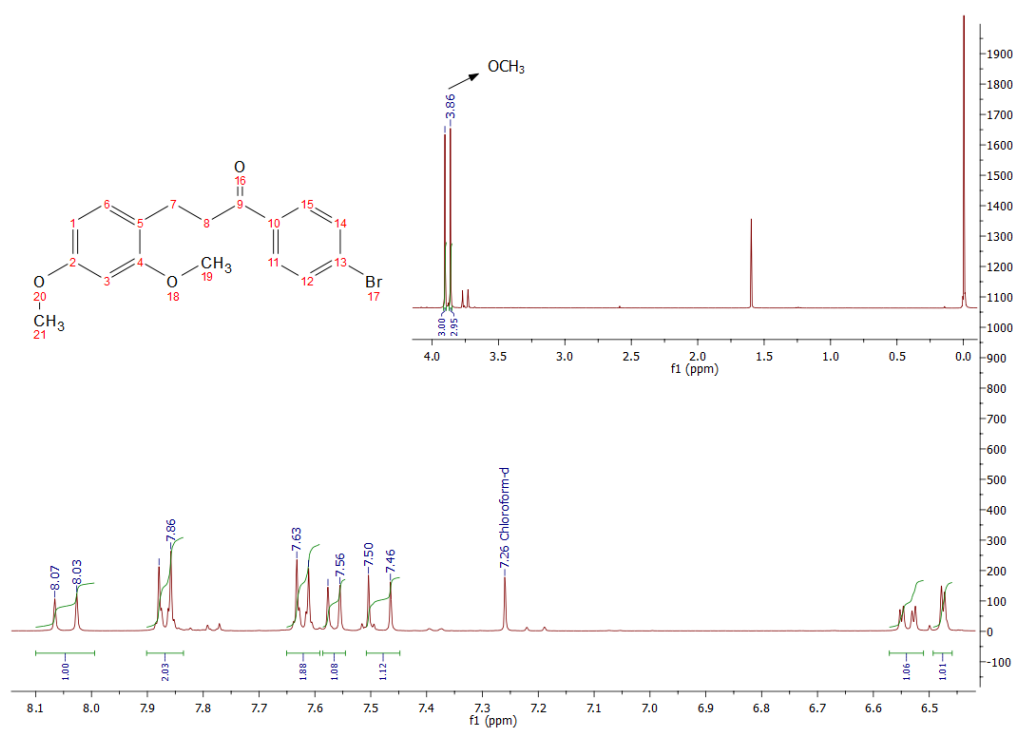


Figura 74- Espectro de RMN – ^1H da dihidrochalcona **9I** (400 MHz, CDCl_3).

Biorredução com levedura imobilizada em alginato de cálcio

→ Dihidrochalcona **9a**

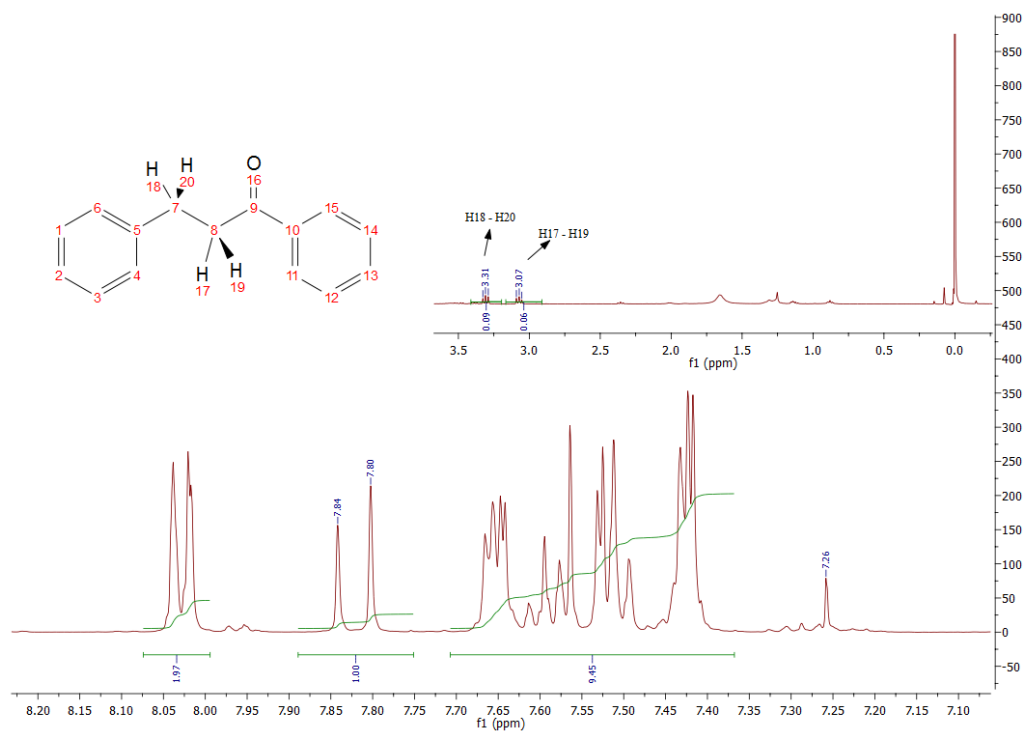


Figura 75- Espectro de RMN – ^1H da dihidrochalcona **9a** (400 MHz, CDCl_3).

→ Dihidrochalcona **9b**

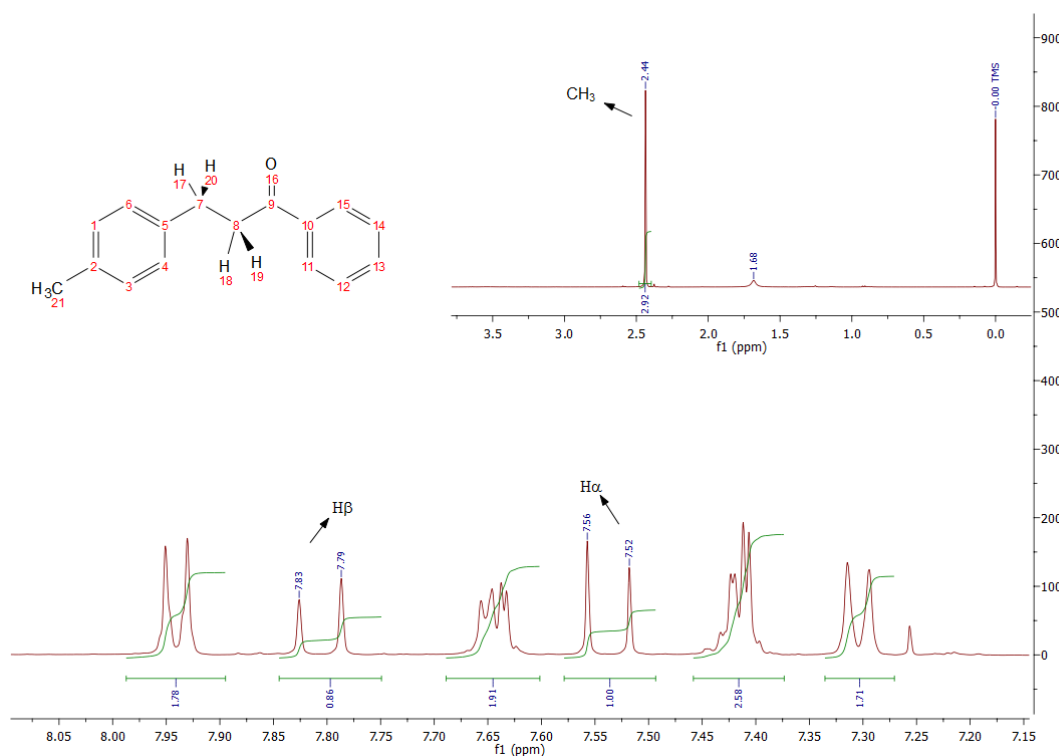


Figura 76- Espectro de RMN – ¹H da dihidrochalcona **9b** (400 MHz, CDCl₃).

→ Dihidrochalcona **9e**

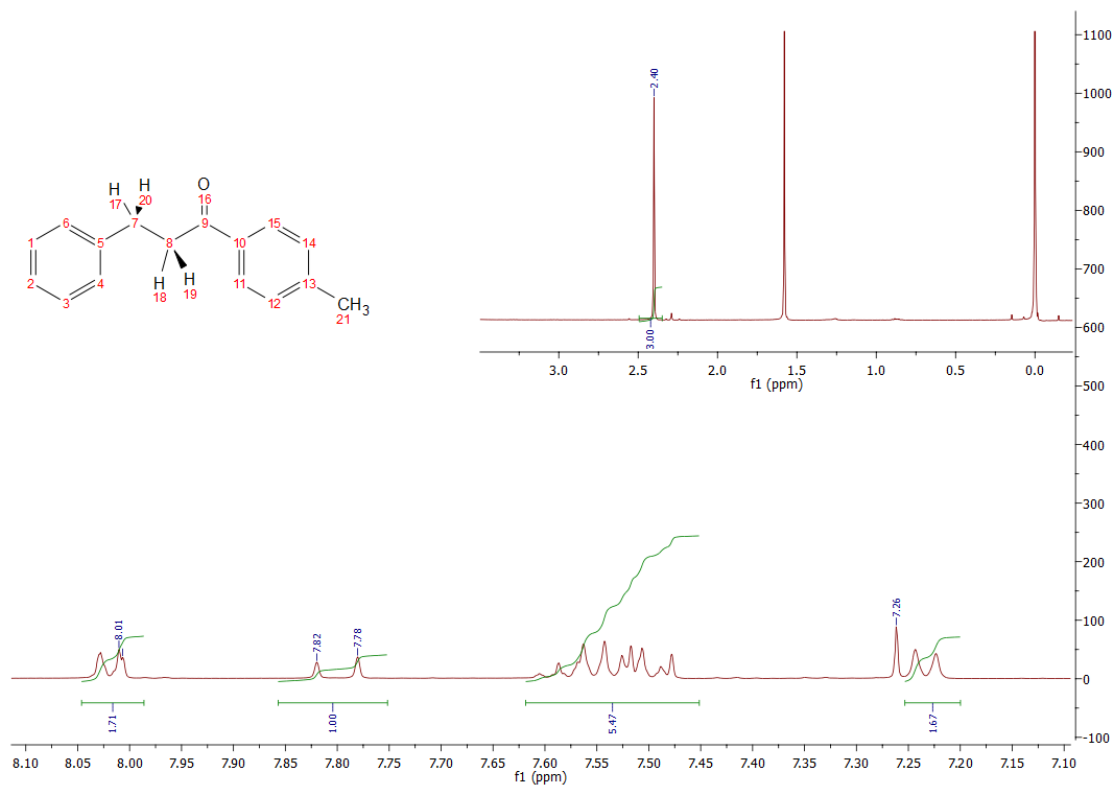


Figura 77- Espectro de RMN – ¹H da dihidrochalcona **9e** (400 MHz, CDCl₃).

→ Dihidrochalcona **9f**

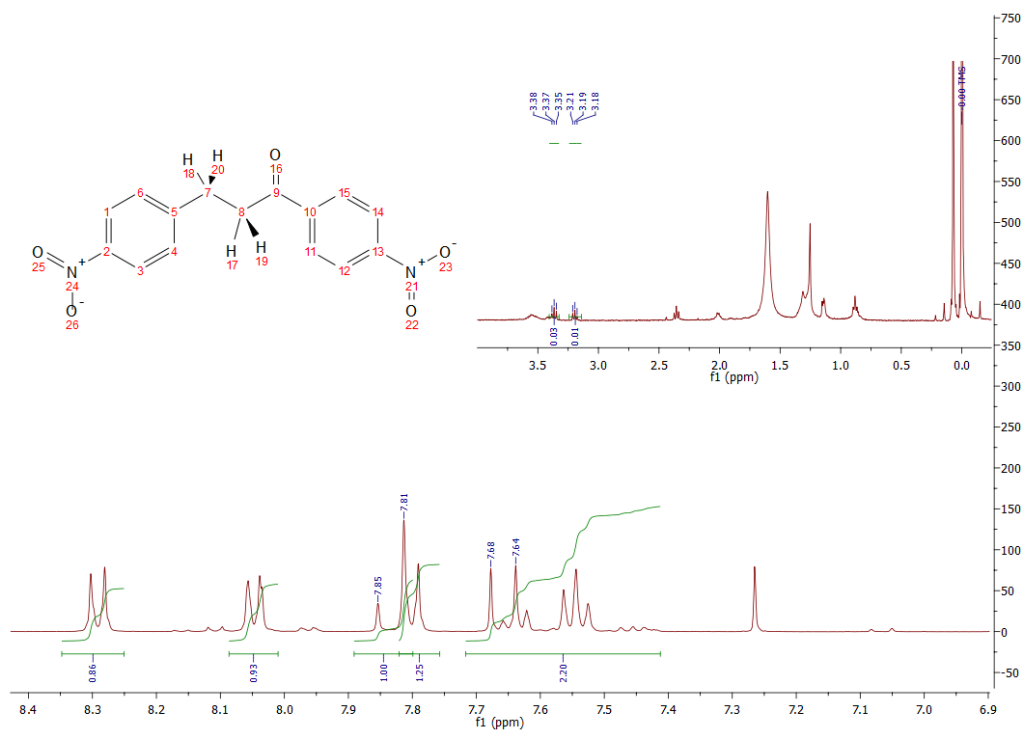


Figura 78: Espectro de RMN – ¹H da dihidrochalcona **9f** (400 MHz, CDCl₃).

→ Dihidrochalcona **9h**

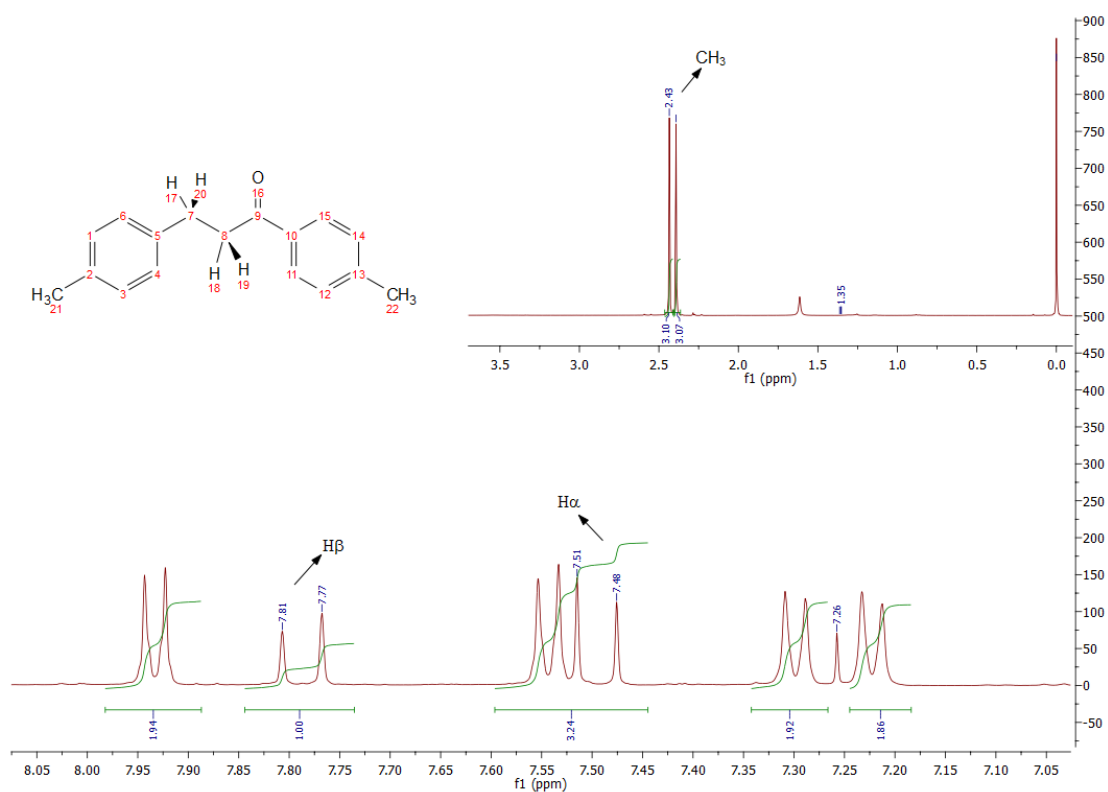


Figura 79: Espectro de RMN – ¹H da dihidrochalcona **9h** (400 MHz, CDCl₃).

→ Dihidrochalcona **9k**

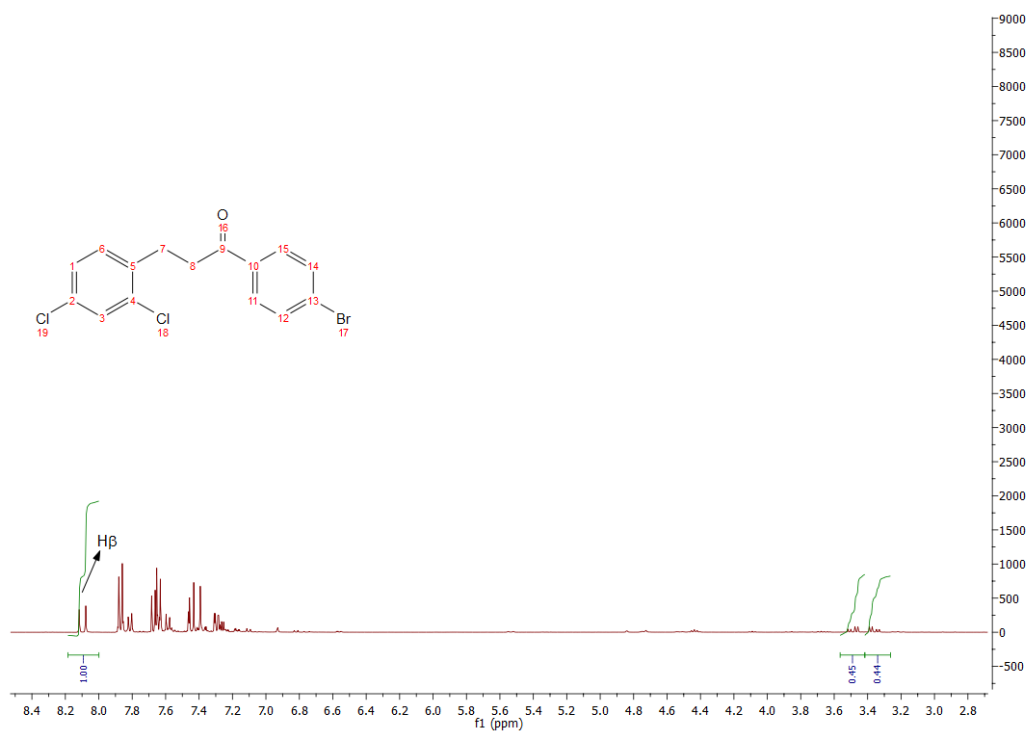


Figura 80: Espectro de RMN – ^1H da dihidrochalcona **9k** (400 MHz, CDCl_3).