

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS-UFGD
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS-FACET
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL
LABORATÓRIO DE CATÁLISE ORGÂNICA E BIOCÁTALISE-LACOB**

SIMONY SARUWATARI

**DESENVOLVIMENTO DE ENZIMAS IMOBILIZADAS EM SUPORTE
INORGÂNICO E SUAS APLICAÇÕES EM SÍNTESE E RESOLUÇÃO
QUIRAL**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

DOURADOS/MS

MAIO/2015

SIMONY SARUWATARI

**DESENVOLVIMENTO DE ENZIMAS IMOBILIZADAS EM SUPORTE
INORGÂNICO E SUAS APLICAÇÕES EM SÍNTESE E RESOLUÇÃO
QURAL**

**ORIENTADOR: PROF. DR. NELSON LUÍS DE CAMPOS
DOMINGUES**

Dissertação de Mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia na área de concentração Tecnologia Ambiental.

DOURADOS/MS

MAIO/2015

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD

S251d Saruwatari, Simony.

Desenvolvimento de enzimas imobilizadas em suporte inorgânico e suas aplicações em síntese e resolução quiral. / Simony Saruwatari. – Dourados, MS : UFGD, 2015. 40p.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Luís de Campos Domingues

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.


1. Biocatalisadores. 2. Reação de tio-Michael. 3. Imobilização enzimática. I. Título.

CDD – 660.2




Termo de Aprovação

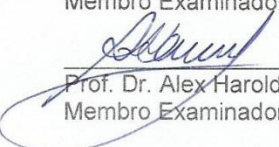
Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Desenvolvimento de enzimas imobilizadas em suporte inorgânico e suas aplicações em síntese e resolução quiral”**, de autoria de **Simony Saruwatari**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof. Dr. Nelson Luís de Campos Domingues
Presidente da banca examinadora



Dr. Leonardo Ribeiro Martins
Membro Examinador (UFGD)



Prof. Dr. Alex Haroldo Jeller
Membro Examinador (UEMS)

Dourados/MS, 28 de Maio de 2015.



SARUWATARI, S.
Defesa de Mestrado
Ciência e Tecnologia Ambiental - UFGD



Dedico este trabalho ao nosso Deus Pai Todo Poderoso, pelo seu infinito amor, a minha eterna gratidão.
Aos meus pais, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, pelas bênçãos derramadas constantemente em minha vida.

À minha maravilhosa família, que me dá suporte e imenso amor. Aos meus pais em especial, meus exemplos, que em todos os momentos estiveram ao meu lado transmitindo palavras de amor, força, confiança. Sempre aconselhando e mostrando o melhor caminho.

Ao professor Nelson, por sua extrema dedicação e alegria, o que nos inspira a correremos atrás de nossos sonhos. A sua grandiosa família, Dani, Nelsinho e Felipe, que estiveram sempre presentes e principalmente, responsáveis em manter o sorriso do professor constantemente.

Aos meus amigos queridos, que estiveram comigo por toda essa caminhada, contribuindo grandemente para a realização desse trabalho, onde simples palavras me encorajavam a concretizar esse objetivo: Ândrea, Andressa, Ângela, Aline, Áurea, Beatriz, Bia, Cintia, Cris, Criscieli, Elias, Elvis, Felipe, Keila, Josi, Letícia, Lígia, Márcia, Mari, Neimar, Rafa, Rony, Rosely, Tábata.

E, por fim, a todos aqueles que me incentivaram de alguma forma, colaborando para esta conquista: abraços fraternos a todos!

Vocês moram em meu coração.

O meu Muito Obrigada!!!

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	Alfa
APTMS	3-Aminopropil-trimetoxissilano
B	Beta
DMSO	Dimetilsulfóxido
LPP	Lipase tipo II em estado bruto obtido de pâncreas suíno
Mg-LPP	Lipase de pâncreas suíno imobilizada em suporte de Cloreto de Magnésio
Mg-QUI	Quimosina imobilizada em suporte de Cloreto de Magnésio
pH	Potencial Hidrogeniônico
QUI	Quimosina
THF	Tetrahidrofurano

LISTA DE TABELA

Tabela 1	Resultados obtidos para as reações de resolução enzimática de 3-fenil-3-feniltiopropanol.....	24
Tabela 2	Dados de log P, dipolo e constante dielétrica dos solventes utilizados na resolução do 3-fenil-3-feniltiopropanol utilizando-se enzimas suportadas.....	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura do medicamento Diltiazem ^[5]	01
Figura 2	Enantiômeros da talidomida. O enantiômero (<i>R</i>) possui efeito de aliviar náuseas, sedativo e hipnótico, enquanto o seu isômero (<i>S</i>) é teratogênico ^[33]	07
Figura 3	2-Benzoamido-3-fenil-3-fenilsulfanil-tiopropionato de <i>S</i> -fenila.....	21
Figura 4	Espectro de infravermelho para o suporte inorgânico de MgCl ₂ (preto); a lipase imobilizada (azul) e quimosina imobilizada (rosa) em suporte inorgânico de MgCl ₂	23
Figura 5	Modelo de Schechter e Berger ^[62] . Modelo utilizado para descrever a interação de uma protease com o substrato protéico. Adaptado de Turk ^[63]	25
Figura 6	Rendimentos obtido para a resolução enzimática de 3-fenil-3-feniltiopropanol utilizando-se Mg-QUI em meio de THF.....	22
Figura 7	Testes de atividade catalítica da lipase de pâncreas suíno imobilizadas em suporte de MgCl ₂ nas reações de tio-Michael.....	27
Figura 8	Rendimentos para a reutilização da Mg-LPP em seu primeiro ciclo e segundo ciclo de reutilização na reação de tio-Michael juntamente com o dado descrito por Rizzo ^[59]	29
Figura 9	Espectro de RMN ¹ H para o composto 2-Benzoilamino-3-fenil-3-fenilsulfanil-tiopropionato de <i>S</i> -fenila obtido pela biocatálise com Mg-LPP.....	30
Figura 10	Ampliação do espectro de RMN ¹ H para o composto 2-Benzoamido-3-fenil-3-fenilsulfanil-tiopropionato de <i>S</i> -fenila obtido pela biocatálise com Mg-LPP.....	31
Figura 11	Espectro de RMN ¹ H para o composto 2-Benzoilamino-3-fenil-3-fenilsulfanil-tiopropionato de <i>S</i> -fenila obtido pela biocatálise com LPP.....	32

Figura 12 Ampliação do espectro de RMN ^1H para o composto 2-Benzoamido-3-fenil-3-fenilsulfanil-tiopropionato de S-fenila obtido pela biocatálise com LPP..... 33

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Reação de Michael.....	05
Esquema 2	Processo geral para imobilização de enzimas em suporte de MgCl ₂	17
Esquema 3	Procedimento geral para resolução enzimática do 3-fenil-3-feniltiopropanol.....	19
Esquema 4	Descrição geral da biossíntese de β -tioalcoóis.....	20
Esquema 5	Reação biocatalizada por LPP e Mg-LPP de tio-Michael à azalactonas.....	21

RESUMO

A clássica reação de tio-Michael, envolve a reação do átomo de enxofre (nucleófilo) com diversos eletrófilos, os quais podem ser ativados utilizando-se os ácidos de Lewis. Entretanto, a utilização destes é prejudicial ao meio ambiente, decorrente dos mesmos muitas vezes serem tóxicos. Uma alternativa eficiente é a utilização de enzimas como biocatalisadores, porém uma das mais importantes desvantagens é a sua solubilidade em meio aquoso. Uma alternativa é a imobilização empregando-se metodologias envolvendo a ligação covalente empregando o glutaraldeído. No sentido de desenvolver suportes menos dispendiosos e mais eficientes, a lipase de pâncreas suíno e a quimosina foram imobilizadas em suporte derivado de $MgCl_2$. Essas enzimas imobilizadas foram inseridas na resolução enzimática do 3-fenil-3-feniltiopropanol em THF, Hexano, 1,2-dicloroetano e DMSO e os resultados indicaram que a quimosina imobilizada em suporte de $MgCl_2$ mostrou-se promissora para o referido álcool, produzindo 61% do composto de interesse em meio de THF. Realizaram-se também testes variando-se a quantidade catalisadora (0,1 g, 0,15 g e 0,2 g da quimosina imobilizada) em meio de THF. Observou-se que o aumento da quantidade de catalisador não confere no aumento nos rendimentos e muitas vezes contribui para a diminuição nos rendimentos. A fim de confrontar os dados da literatura para a síntese do 3-fenil-3-feniltiopropanol, foram realizados testes envolvendo a lipase de pâncreas suíno imobilizada em suporte de $MgCl_2$ (Mg-LPP), para a reação entre o cinamaldeído e o tiofenol (reação de tio-Michael). Verificou-se um declínio na atividade da enzima comparando os dados da literatura para a lipase de pâncreas suíno livre (LPP). Pôde-se também comprovar que a reutilização da enzima é uma possibilidade, tendo em vista que foi realizada sua retirada do meio reacional sem perda de massa com ínfimos decréscimos da atividade. Também se inseriu a LPP e Mg-LPP na síntese de compostos precursores de aminoácidos não naturais, e pôde-se observar que o suporte confere ganhos nos excessos diastereoméricos para o composto obtido.

Palavras-chaves: Lipase, Quimosina, Biocatálise, Imobilização, tio-Michael

ABSTRACT

The classical thio-Michael reaction, involves the reaction of sulfur atom (nucleophile) with various electrophiles, which can be activated using Lewis acids. However, the use of these metals is harmful to the environment and sometimes they are toxic. An efficient alternative is the use of enzymes as biocatalysts, but one of the most important disadvantages in its process is the enzyme's solubility in aqueous medium. To solve this problem, an alternative is the enzyme's immobilization employing methods involving covalent linking using glutaraldehyde. In order to develop less expensive and more efficient supports for enzymes, we synthesized an inorganic support using $MgCl_2$ and we immobilized lipase from porcine pancreas and chymosin on it. These immobilized enzymes were inserted, firstly, in the enzymatic resolution of 3-phenyl-3-phenylthiopropanol using THF, hexane, 1,2-dichloroethane and DMSO as solvent. The results indicated that the chymosin immobilized on $MgCl_2$ support showed to be promising for producing the respective alcohol (61%) in THF. We also carried out the same reaction varying the catalyst amount (0.1 g, 0.15 g and 0.2 g of immobilized chymosin) using the same solvent. We observed that increasing on the catalyst amount did not result in increase of yields on the other hand, this increasing on catalyst amount produced a slight decreasing on yields. In order to compare the literature data for the 3-phenyl-3-phenylthiopropanol synthesis we inserted the lipase from porcine pancreas immobilized on $MgCl_2$ support (Mg-LPP) as a biocatalyst in this reaction between cinnamaldehyde and thiophenol (thio-Michael reaction). The data showed to us a decline in enzyme activity comparing to literature data for the free lipase from porcine pancreas (PPL). Although we had observed a decreasing on enzyme efficiency, we verified that reuse of enzyme was possible for three cycles at least without any loss of yield or biocatalyst mass. Finally, we also inserted LPP and Mg-LPP as biocatalyst in non-natural amino acid synthesis and we observed that the supported enzyme produced an increasing in diastereomeric excess for the interest compound.

Keywords: Lipase, Chymosin, Biocatalysis, Immobilization, thio-Michael

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	01
2	OBJETIVO.....	04
2.1	Objetivo geral.....	04
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	05
3.1	Reação de tio-Michael.....	05
3.2	Biocatálise.....	06
3.3	Enzimas.....	08
3.3.1	Lipase.....	10
3.3.2	Quimosina.....	11
3.4	Imobilização de enzimas.....	12
3.4.1	Tipos de imobilização.....	14
3.4.1.1	Encapsulação.....	14
3.4.1.2	Adsorção.....	14
3.4.1.3	Ligação Covalente.....	15
4	MATERIAIS.....	16
4.1	Enzimas.....	16
4.2	Reagentes e solventes.....	16
4.3	Equipamentos.....	16
5	MÉTODOS.....	17
5.1	Preparo do suporte.....	17
5.2	Imobilização das enzimas.....	17
5.3	Síntese das β -tioalcóois com cinamaldeído e tiofenol.....	18
5.4	Procedimento geral para resolução enzimática do 3-fenil-3-feniltiopropanol.....	18

5.5	Síntese do 3-fenil-3-feniltiopropanol via enzimática.....	19
5.6	Síntese do 2-Benzamido-3-fenil-3-fenilsulfanil-tiopropionato de S-fenila (Figura 3).....	21
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	23
6.1	Espectro de infravermelho obtido para o suporte de MgCl ₂ e das enzimas imobilizadas.....	23
6.2	Estudo da resolução do 3-fenil-3-feniltiopropanol.....	23
6.3	Estudo de síntese do 3-fenil-3-feniltiopropanol via enzimática.....	27
6.4	Estudo de síntese do 2-Benzamido-3-fenil-3-fenilsulfanil-tiopropionato de S-fenila.....	30
7	CONCLUSÃO.....	34
8	REFERÊNCIAS	35
9	MEMORIAL DAS ATIVIDADES.....	40
9.1	Créditos exigidos pelo programa.....	40
9.2	Créditos cumpridos.....	40

1 INTRODUÇÃO

A reação de Michael é a reação na qual um nucleófilo reage com um composto carbonílico α,β -insaturado. Diversos são os tipos de nucleófilos que podem ser utilizados para tal reação. Sendo esta, vastamente utilizada para a formação de ligações de carbono e diversos átomos ^[1]. Dentre os diversos tipos de nucleófilos, podemos citar a reação de tio-Michael a qual o átomo de enxofre atua como nucleófilo da reação. Reações que resultem na formação da ligação C-S são muito importantes, pois tal ligação é encontrada em diversos compostos com ação antibiótica, antimicrobiana, analgésica, anti-inflamatória, antipsicotrópica ou até mesmo anti HIV^[2].

Esta reação também apresenta uma vasta aplicação sintética para (i) proteção quimiosseletiva da dupla ligação em compostos carbonílicos α,β -insaturados ^[3], (ii) para gerar enolatos a partir dos compostos carbonílicos α,β -insaturados ^[4] e (iii) realizar a síntese de medicamentos importantes como Diltiazem^[5] (Figura 1). Este medicamento pertence ao grupo das benzodiazepinas, um tipo de bloqueadores dos canais de cálcio, cuja ação se dá nos canais lentos de cálcio das membranas celulares miocárdicas e da musculatura lisa dos vasos, diminuindo, desta forma, a entrada de cálcio nas fibras musculares e reduzindo a sua capacidade contrátil. Assim, os seus principais efeitos são seu poder vasodilatador e depressor da função cardíaca ^[6].

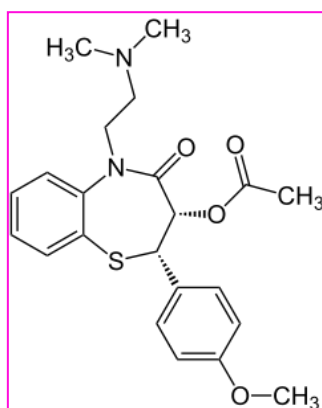


Figura 1: Estrutura do medicamento Diltiazem^[5].

Nesse contexto, muitos sistemas catalíticos têm sido desenvolvidos para a adição de tióis a compostos carbonílicos α,β -insaturados, dentre estes inclui-se os

ácidos de Lewis ^[7,8], suportes sólidos^[9, 10] e líquidos iônicos ^[11, 12]. No entanto, esses sistemas são limitados decorrentes dos tempos de reação longos, condições relativamente severas, uso de catalisadores caros ou não comerciais, e os rendimentos dos produtos relativamente baixos ^[13].

Nesse sentido a biocatálise é uma ferramenta eficiente e “verde” na química moderna, a qual vem atraindo cada vez mais atenção por sua excelente eficiência, seletividade e condições reacionais leves ^[14]. O termo biocatálise aplica-se às reações que são catalisadas por enzimas isoladas ou contidas em organismos biológicos e, a rigor, as enzimas podem ser consideradas exatamente iguais a outros reagentes de ação catalítica empregados em reações químicas ^[15].

As enzimas presentes nos microrganismos e em outros organismos vivos podem promover reações com altíssimas quimio-, regio-, e estereosseletividades, em condições brandas de pH, temperatura e pressão ^[15].

A grande desvantagem da utilização de enzima na forma solúvel é a sua separação para posterior aplicação, assim como a contaminação do produto desejado, pois enzimas são compostos solúveis em água. Desta forma, técnicas de imobilização têm sido empregadas com o objetivo de reutilizar as enzimas. Esta estratégia também é uma importante ferramenta para estabilizar e reduzir a inativação por distorção da sua estrutura nativa por influência da temperatura, pH e de solventes orgânicos, o que pode ser atrativo para a aplicação de enzimas no setor industrial ^[16-20].

A imobilização consiste no confinamento da enzima em um suporte sólido para que posteriormente ocorra a reutilização do biocatalisador, tornando assim o processo menos oneroso ^[16].

No presente trabalho foram imobilizadas enzimas da classe das lipases e quimosina utilizando-se metodologias que envolvem a ligação covalente ^[21] empregando o glutaraldeído. Como suportes foi utilizado derivados de MgCl₂ sendo este um sal inorgânico extremamente barato e inerte em sistemas orgânicos. Este suporte foi exposto a uma modificação estrutural conforme descrito por Patel, Sharma e Jasra^[22].

Os processos envolvendo enzimas imobilizadas são considerados processos ambientalmente corretos, pois o biocatalisador é específico, geralmente não produz

subprodutos, podendo ser reutilizado sem a perda da eficiência por várias vezes e seu descarte não é agressivo ao meio ambiente. Tendo em vista o baixo custo para a síntese proposta e a reutilização dos catalisadores, tornaria o processo mais barato e viável.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

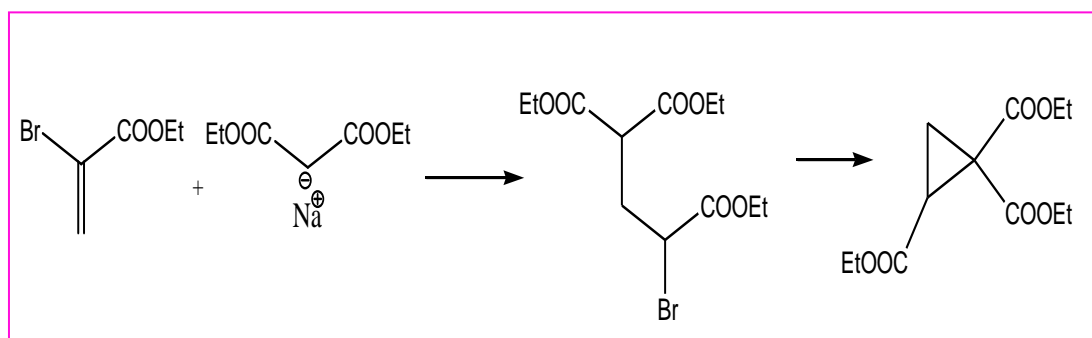
O objetivo deste estudo foi a síntese de um material inorgânico que atuasse como suporte para imobilização de algumas enzimas livres e o estudo de inserção destes como biocatalisadores nas reações de tio-Michael.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Reação de tio-Michael

A reação de Michael envolve a adição de um nucleófilo (doador de Michael) a um eletrófilo (aceptor de Michael), apresentando este uma insaturação entre os carbonos α e β referente a um grupo retirador de elétrons (exemplos: óxido de nitrogênio, cetona, aldeído, éster, etc.). Esta reação apresenta o nome de seu primeiro executor Arthur Michael, o qual executou em 1887 a reação entre o dietilmalonato de sódio e o 2-bromoacrilato de etila para a produção de derivados do ciclopropano^[23] (Esquema 1).

Esquema 1. Reação de Michael.



Diversos nucleófilos foram utilizados concomitantemente com muitos aceptores de Michael^[24]. Dentre estas modificações, a reação denominada tio-Michael envolve um nucleófilo de enxofre com aceptores de Michael. Esta reação surge como uma das mais importantes metodologias para se obter a formação da ligação C-S. Esta também apresenta uma vasta aplicação sintética como na síntese de medicamentos importantes como Diltiazem^[5] (Figura 1).

A reação de tio-Michael, como dito anteriormente, por muitas vezes necessita da ativação tanto do acceptor de Michael (composto α,β -insaturado) quanto do doador de Michael ou nucleófilo. A ativação mais importante citada na literatura é quando se trata do acceptor de Michael. Este, quando apresenta o grupamento carbonila, pode ser ativado com organocatalisadores ou através de ácidos de Lewis. A ativação do acceptor de Michael por ácidos de Lewis vem sendo muito estudado e dentre os exemplos de ácidos de Lewis utilizados na reação de tio-Michael podemos

citar $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ ^[25a], InBr_3 ^[25b], $\text{Hf}(\text{OTf})_3$ ^[25c], alumina em DMSO ^[26], InCl_3 ^[27] e $\text{Cu}(\text{BF}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ^[25d].

Porém, há diversas desvantagens para as metodologias que empregam estes ácidos de Lewis como, por exemplo, o longo tempo reacional, a necessidade de altas temperaturas, a utilização destes sais com custo elevado, a necessidade de condições reacionais anidras, rendimentos dos produtos apenas moderado, utilização de quantidade estequiométrica do catalisador e uso de sais agressivos ao meio ambiente ^[28].

Desta forma, fica evidente a necessidade de se obter esses importantes compostos, porém com a utilização de novos tipos de catalisadores sem a presença de metais. Dentre os catalisadores que vem ganhando atenção mundialmente são os biocatalisadores (enzimas, microrganismos e etc.).

3.2 Biocatálise

Biocatálise é a técnica que utiliza catalisadores biológicos, sejam enzimas ou microrganismos, para converter um substrato em um número limitado de etapas enzimáticas e, para que tal processo seja eficaz, é necessária a análise de uma série de fatores.

A biocatálise vem ganhando atenção decorrente de alguns fatores: como transformações químicas tradicionais que empregam solventes e até mesmo alguns reagentes nocivos ao meio ambiente; a biocatálise promove produtos com alto grau de quimio-, regio- e estereosseletividade em condições reacionais muito brandas; reações biocatalisadas são aceleradas na ordem de $10^8 - 10^9$ do que as mesmas reações catalisadas quimicamente; os catalisadores empregados em biotransformações são biodegradáveis, auxilia na redução dos custos de produção, tecnologia importante para a síntese de compostos químicos quirais com alto valor agregado ^[14].

Outro fator de grande importância mundial atualmente é a questão ambiental. Referente a isto Wang & Daí ^[29] relatam que os benefícios destes processos incluem redução da poluição ambiental por produtos e processos industriais, possibilidade de redução da dependência sobre os combustíveis não

renováveis e outros recursos e produção sustentável de produtos existentes e novos.

É possível notar que a biocatálise tem abrangido diversos setores industriais, porém o setor farmacêutico é o que mais tem utilizado técnicas biocatalíticas na síntese de seus produtos. Contudo, sabe-se que neste setor a obtenção de compostos enantiomericamente puros é de grande interesse^[30, 31], isto porque ocorreu um fato importantíssimo em 1987. Neste ano a FDA (*FoodAndDrugAdministration*) levantou questionamentos acerca dos medicamentos ora liberados destacando a questão dos estereoisômeros^[32]. Em 1992 finalmente foi estipulado que a ação de cada produto farmacêutico deveria ser caracterizada, se houvesse, por seu enantiômero individualmente. Este regulamento,forçou as grandes empresas do ramo farmacêutico a investir fortemente na pesquisa de novos processos bioquímicos que resultasse em compostos enantiomericamente puros. A justificativa para tal determinação recorre das diferentes propriedades apresentadas pelos enantiômeros. Um dos exemplos mais emblemáticos da literatura é a talidomida (Figura 2), droga usada inicialmente em 1958 e retirada do comércio em 1965, a qual era utilizada para aliviar a náusea matinal das mulheres grávidas. Em 1965 descobriu-se que a talidomida era a causa de terríveis defeitos congênitos em muitas crianças nascidas após o uso do fármaco por suas mães^[33].

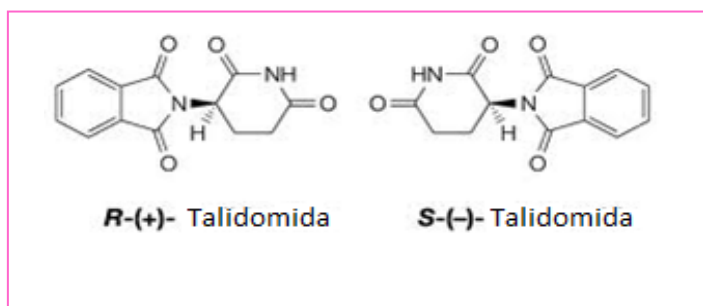


Figura 2. Enantiômeros da talidomida. O enantiômero (*R*) possui efeito de aliviar náuseas, sedativo e hipnótico, enquanto o seu isômero (*S*) é teratogênico^[33].

Mais tarde verificou-se evidências de que um dos enantiômeros tinha efeito de aliviar a náusea matinal, sedativo e hipnótico, enquanto que o outro, também presente no fármaco comercial (e em quantidades iguais ao da primeira), podia ter

relação com os efeitos congênitos. A evidência em relação aos efeitos dos enantiômeros se converte no outro ^[33] (Figura 2).

Desde então, o preparo de fármacos e moléculas precursoras com alta pureza enantiomérica tem contribuído para o crescente desenvolvimento de novos processos, especialmente àqueles que se utilizam da biocatálise e de metodologias ambientalmente corretas ^[30].

O potencial da biocatálise na síntese de produtos químicos é evidente e exemplos de diversos processos industriais operacionais, por exemplo, na BASF (Ludwigshafen, Alemanha), a DSM (Geleen, Holanda), e Lonza (Visp, Suíça). Essas indústrias utilizam enzimas para a produção de compostos de alto custo que não podem ser produzidos por abordagens químicas ^[34].

O interesse pela biocatálise deve-se principalmente a algumas vantagens tais como a baixa toxicidade dos produtos químicos empregados, a simplicidade operacional e o baixo custo da maioria dos catalisadores de origem natural ou sintética. Além disso, os produtos oriundos de reações catalisadas por compostos orgânicos, não apresentam contaminação por metal ou outros aditivos, despertando o interesse da indústria farmacêutica, que por sua vez não tolera a contaminação por metais de transição no produto final.

No tocante à questão ambiental, a biocatálise está inserida no contexto de uma nova filosofia denominada Química Verde. Esta pode ser definida como a utilização de técnicas químicas e metodologias que reduzam ou eliminam o uso de solventes, reagentes ou a geração de produtos e subprodutos que são nocivos à saúde humana ou ao meio ambiente ^[35].

3.3 Enzimas

As enzimas são proteínas naturais responsáveis por catalisar reações químicas que ocorrem no metabolismo de organismos vivos, podendo ser obtida de microrganismos, plantas e animais. Como em toda reação catalítica, as enzimas aceleram diversas reações, diminuindo a energia de ativação ^[36].

Elas são formadas por subunidades de aminoácidos e possuem em sua estrutura grupos polares tais como COOH, OH, NH₂, SH e CONH₂. Todas possuem

estruturas complexas de cadeias polipeptídicas que se mantêm estáveis em meio aquoso, entretanto, poucas possuem sua estrutura tridimensional definida ou mesmo seu mecanismo de ação descrito ^[37].

As enzimas são catalisadores altamente seletivos que podem executar eficientes modificações químicas de substratos em meios não aquosos ^[32], obtendo-se um alto rendimento e com a possibilidade de reaproveitamento do mesmo.

As razões pelos quais as enzimas são amplamente empregadas em síntese estereosseletivas são inúmeras. As enzimas são catalisadores muito mais eficientes, podendo ser empregadas em concentrações de porcentagem molar de 10^{-3} a 10^{-4} % enquanto são necessários de 0,1 a 1 mol para os catalisadores químicos ^[36].

Em 1961 a Comissão para enzimas (*Enzyme Commission* – EC) da União Internacional de Bioquímica (IUB), estabeleceu uma classificação para as enzimas e dividiu-as em seis classes, de acordo com a reação catalisada ^[38]. São elas:

1. Oxidorredutases: São enzimas que catalisam reações de transferência de elétrons, ou seja, reações de oxi-redução. As mais conhecidas são as Desidrogenases e as Oxidases.

2. Transferases: São enzimas que intervêm em reações de transferência de diversos grupos funcionais, como aldeído, cetona, acila, amina, carboxila, etc.

3. Hidrolases: São enzimas que catalisam reações de hidrólise. A extensão de grupos hidrolisáveis é ampla, e incluem ésteres, amidas, peptídeos e outras funções que contem grupos C-N, anidridos e muitos outros.

4. Liases: Catalisam as reações de remoção ou fixação de grupos químicos, envolvendo ligações C=C, C=N e C=O de forma não hidrolítica. São bons exemplos as desidratases e as descarboxilases.

5. Isomerasas: Catalisam diversos tipos de isomerização, incluindo a racemização.

6. Ligases: São enzimas que catalisam reações de formação e novas moléculas a partir de duas já existentes. Nesta classe são denominadas frequentemente sintetases, que produzem a formação C-O, C-S e C-N.

As oxidorredutases e as hidrolases são as mais empregadas em síntese na área de catálise enzimática.

Muitas são as vantagens de se utilizar enzimas em síntese orgânica, mas três características se destacam:

1. Quimiosseletividade - atuam sobre um determinado grupamento químico.
2. Regiosseletividade ou Diastereosseletividade - devido a sua estrutura tridimensional complexa, as enzimas podem distinguir entre grupos funcionais que estão situados em diferentes regiões da mesma molécula do substrato.
3. Enantioseletividade - as enzimas são feitas de *L*-aminoácidos e, portanto, são catalisadores quirais. Como consequência, qualquer tipo de quiralidade presente na molécula do substrato é reconhecida na formação do complexo enzima substrato ^[39].

A combinação entre biocatálise e síntese utilizando diferentes enzimas tem se destacado no setor industrial principalmente no setor farmacêutico devido à crescente demanda por compostos enantiomericamente puros. Com o passar dos anos, processos interessantes vem sendo utilizados na indústria catalítica utilizando hidrolases, liases, oxirredutases dentre outros biocatalisadores, despontando como uma nova metodologia para síntese de intermediários na indústria farmacêutica ^[30].

3.3.1 Lipase

As lipases (EC 3.11.3), são enzimas pertencentes à classe das hidrolases e desempenham um papel fundamental na digestão de gorduras pela clivagem de triglicerídeos de cadeia longa. Devido à polaridade oposta entre a enzima (hidrofílica) e seus substratos (lipofílico), as reações que envolvem a lipase ocorrem na interface entre as fases aquosas e oleosas ^[40]. Elas são muito utilizadas devido à sua versatilidade catalítica, disponibilidade comercial e baixo custo, além de não requererem cofatores ^[37].

Este grupo de enzimas é uma ferramenta poderosa para catalisar não só a hidrólise, como também as reações de esterificação e transesterificação envolvendo ésteres insolúveis em água.

Entre todos os processos biocatalíticos, o uso de lipases apresenta muitas vantagens em comparação com outras transformações sintéticas, devido às moderadas condições de reação e do nível elevado de seletividade apresentado por

estes tipos de catalisadores ^[41], sendo também as enzimas mais empregadas nos processos biocatalíticos.

As lipases têm recebido uma grande atenção como biocatalisadores industriais, incluindo áreas de laticínio como na hidrólise da gordura do leite, detergentes, limpeza de superfícies duras, processamento de papel, couro, indústria química, agroquímica, farmacêutica, nutrição, tratamento de esgotos, entre outras ^[42].

A estrutura tridimensional da lipase fúngica de *Rhizomucormiehei* e da lipase pancreática foram determinadas em 1990. Desde então, mais de onze estruturas dessas enzimas já foram determinadas, das quais, com exceção da lipase pancreática, todas são de origem microbiana ^[43]. Além disso, a lipase pancreática não necessita de cofatores, fato esse que a torna mais atrativa, pois os mesmos são de alto custo.

No presente trabalho optou-se pela lipase tipo II em estado bruto obtido de pâncreas suíno (LPP), a qual é uma mistura de várias proteínas principalmente lipases e esterases ^[44] com o intuito de desenvolver catalisadores enzimáticos para a reação de tio-Michael no desenvolvimento de β -tioalcoóis e de β -tioacetonas.

3.3.2 Quimosina

A quimosina (EC 3.4.23.4), também conhecida como renina, é uma aspartil protease que catalisa a quebra das ligações peptídicas em outras proteínas, sendo encontrada no abomaso (quarto estômago dos ruminantes) de bezerros lactentes e de outros ruminantes jovens ^[45].

Bioquimicamente é uma proteína com cadeia polipeptídica única de 323 aminoácidos e massa molecular de 35600 Da ^[46, 47]. Diferente das outras proteínas gástricas aspárticas que processam todas as proteínas no lúmen gástrico, a quimosina é específica para uma das proteínas do leite: a caseína k, apresentando baixa atividade proteolítica sobre as outras proteínas e devido a isto, esta enzima tornou-se atraente para a indústria de queijo ^[48].

Existem duas formas alélicas de quimosina naturalmente produzidas de bezerros: quimosinas A e B que diferem em apenas um resíduo de aminoácido na

posição 244: um aspartato na quimosina A e uma glicina na quimosina B. A presença desses aminoácidos, garante uma maior afinidade da quimosina A pela caseína k, devido a uma estabilização adicional eletrostática adicional do complexo caseína-k-quimosina, e uma maior estabilidade da quimosina B em pH abaixo de 5 [45].

Devido a problemas de escassez e de flutuação no custo de coalho de bezerro, bem como sua qualidade insatisfatória, os cientistas começaram a investigar a possibilidade de atribuir a microrganismos, a produção de quimosina idêntica à produzida pelas células do estômago do bezerro. Para isso foi introduzido o gene do bezerro responsável pela produção de quimosina num microrganismo hospedeiro, a *Escherichia coli*, que é um microrganismo conhecido, facilmente cultivável em grandes quantidades, porém outros microrganismos foram identificados como produtores de quimosinas como *Mucorpusillus*, *Mucormeihei*, *Aspergillusoryzae* [49, 50], estas são denominadas quimosinas recombinantes. Atualmente apenas três empresas internacionais (Pfizer, Chr-Hansen e GirstBrocades) produzem e comercializam quimosinas recombinantes [51].

As quimosinas recombinantes passam por rigorosos testes bioquímicos, toxicológicos e microbiológicos para garantir a sua pureza. A FDA (*FoodandDrugAdministration*) concluiu que as enzimas recombinantes são idênticas e mais puras que os extratos enzimáticos extraídos do bezerro, o que conferiu o status GRAS (*GenerallyRegarded as Safe*) para estas preparações [52].

A quimosina recombinante representa cerca de 60% das vendas de todas as enzimas industriais do mundo devido às suas aplicações em diversos setores industriais como nos detergentes, alimentos, produtos farmacêuticos, produtos químicos, couro, papel e celulose e indústrias de seda [53], já que estas apresentam custos reduzidos e podem ser produzidas em quantidades satisfatórias em fermentações industriais.

3.4 Imobilização de enzima

A técnica da imobilização teve início em 1916 por Nelson e Griffin (imobilização da invertase em carvão ativo), no qual adquiriu um grande impulso a

partir dos anos 60 e evoluiu tanto que várias enzimas imobilizadas podem ser encontradas no comércio ^[54].

A imobilização consiste no confinamento da enzima em um suporte sólido para que posteriormente ocorra a reutilização do biocatalisador, tornando assim o processo menos dispendioso. Em geral, a imobilização oferece uma série de vantagens e a razão para a escolha certa de um derivado imobilizado varia de aplicação para aplicação, incluindo: utilização das atividades catalíticas por um maior período de tempo; as possibilidades de operações contínuas dos processos; facilidade de separação do produto final; em alguns casos, ocorre modificação favorável das propriedades catalíticas da enzima como, por exemplo, maior estabilidade ao pH e à temperatura; maior facilidade de interrupção da reação, em um nível desejado, pela remoção da enzima ^[15, 16, 17, 18, 19].

Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados na imobilização de enzimas, não existe um único método aplicável para todas as enzimas. Dessa forma, para cada aplicação de uma enzima imobilizada é necessário escolher o procedimento mais simples e mais barato que resulte em um derivado com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional ^[15, 16, 18].

A partir das informações disponíveis sobre as características do suporte e o efeito dos métodos empregados, é possível fazer generalizações que permitam uma primeira seleção do método de imobilização. As enzimas podem ser imobilizadas por diferentes protocolos, isto é, podem ser encapsuladas; adsorvidas em materiais insolúveis como resinas de troca iônica; copolimerizadas com algum monômero ou se ligar a uma matriz insolúvel por ligações covalentes ^[15, 16, 18].

A escolha do suporte contribui para o bom desempenho da enzima imobilizada. Isso porque, se de um lado um suporte criteriosamente selecionado pode aumentar o tempo de meia-vida da enzima imobilizada, de outro uma escolha imprudente pode afetar adversamente não só a estabilidade térmica, como o desempenho global do sistema.

Na seleção de um suporte para uma determinada aplicação, devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como a possibilidade de regeneração do material. As principais características a serem observadas na seleção de um suporte para uma determinada aplicação são: área superficial,

permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica, custo, dentre outras. Eles podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos, e conforme sua morfologia em materiais porosos, não porosos e de estrutura de gel^[18, 55].

No presente trabalho foram imobilizadas enzimas da classe das lipases utilizando-se metodologias envolvendo a ligação covalente^[20] empregando o glutaraldeído. Como suportes foi utilizado derivados de $MgCl_2$, um sal inorgânico extremamente barato e inerte em sistemas orgânicos. Este suporte foi exposto a uma modificação estrutural conforme descrito por Patel, Sharma e Jasra^[21].

3.4.1 Tipos de imobilização

3.4.1.1 Encapsulação

A encapsulação consiste na retenção física da enzima nas cavidades internas de uma matriz sólida porosa constituída geralmente por polímeros entre cruzados como poliacrilamida, gelatina, alginato, resinas de poliuretano e silanos. As principais vantagens da encapsulação de enzimas referem-se à grande área superficial para contato do substrato e da enzima no interior de um volume relativamente pequeno, e à possibilidade de imobilização simultânea de diferentes enzimas em uma única etapa. Como principais desvantagens, têm-se: a restrição de que os biocatalisadores podem ser aplicados somente com substratos de baixa massa molecular; a possível inativação da enzima durante o procedimento de imobilização; a alta concentração de enzima necessária para garantir a encapsulação e, os possíveis efeitos de difusão de substratos e/ou produtos no interior da matriz porosa^[16, 18, 56].

3.4.1.2 Adsorção

A adsorção física é o método mais simples e o mais empregado para imobilização de enzimas. Nesse caso, o biocatalisador é estabilizado por interações fracas com o suporte como forças de Van der Waals (interações hidrofóbicas),

ligações de hidrogênio e ligações iônicas. As principais vantagens deste processo de imobilização são a facilidade e a simplicidade do processo e, além disso, a estrutura conformacional da enzima é pouco alterada. A grande desvantagem é a dessorção da enzima, devido às variações de temperatura, pH e força iônica [16,18, 56].

3.4.1.3 Ligação covalente

A imobilização por ligação covalente, baseia-se na ativação de suportes com a inserção de grupos reativos que reagem com os grupos nucleofílicos da enzima. Esta técnica não é comum como o método de adsorção física, mas apresenta a vantagem de evitar o fenômeno de dessorção. A seleção das condições para a imobilização por ligação covalente é mais difícil que em outros métodos de ligação em suportes. É necessário conhecer a densidade dos grupos ativos por unidade de área do suporte, e a sua geometria para reduzir a formação do complexo enzima-suporte inativo. Este método pode também afetar a estrutura ativa da enzima, devido à alteração do centro ativo. Suas principais vantagens são a maior resistência do biocatalisador quanto à variação de pH, temperatura e influência de solventes orgânicos; os derivados preparados podem ser empregados em diversas conformações de reatores, como fluxo contínuo, empacotado, tanque agitado e leito fluidizado e, a carga de enzima permanece constante após a etapa de imobilização [16, 55].

4 MATERIAIS

4.1. Enzimas

As enzimas utilizadas foram lipase tipo II em estado bruto obtida de pâncreas suíno (Sigma-Aldrich), quimosina obtida de *Aspergillus Níger var. awamori* cedida pela empresa internacional Chr-Hansen (Dinamarca).

4.2. Reagentes e solventes

Os reagentes empregados neste estudo foram: cinamaldeído (Vetec), tiofenol (Sigma-Aldrich), borohidreto de sódio (Sigma-Aldrich), tetrahidrofurano (Vetec), dimetilsulfóxido (Vetec), hexano (Dinâmica), etanol (CRQ), acetato de etila (Vetec), metanol (Dinâmica), 1,2-dicloroetano (VETEC), dimetilsulfóxido (Dinâmica), $MgCl_2$ (Sigma-Aldrich), APTMS – 3-aminopropil-trimetoxisilano (Sigma-Aldrich) e glutaraldeído (Vetec) todos com grau de pureza PA. Como secante nas reações foi utilizado o sulfato de magnésio (Proquímios) grau de pureza PA. Para purificação e separação dos compostos de interesse foi utilizado cromatografia em coluna com fase estacionária sílica gel 70-230 Mesh (Vetec).

4.3 Equipamentos

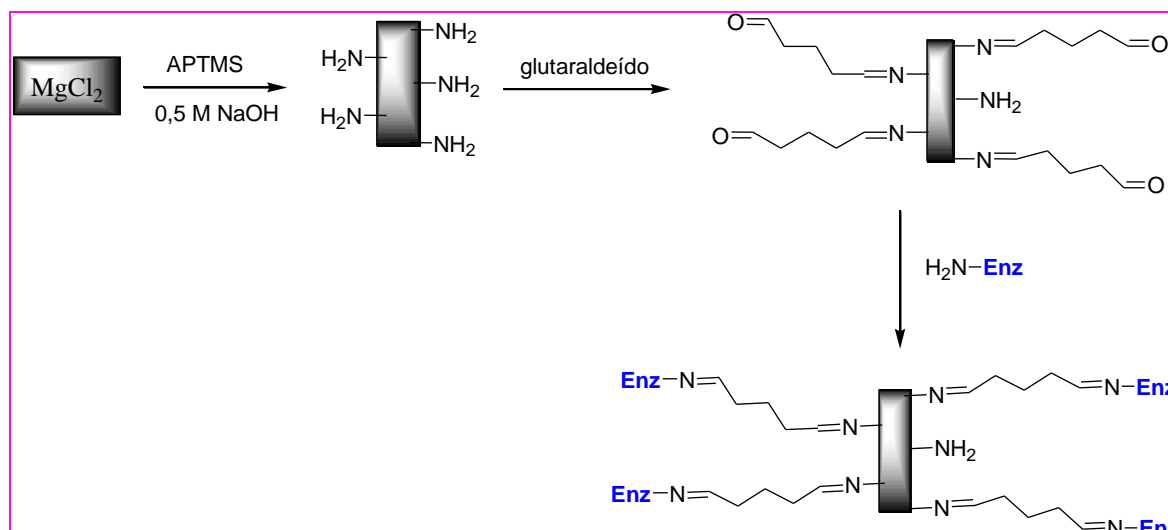
- Agitador magnético (Marconi).
- Balança analítica digital (Marte).
- Centrífuga 206 BL (Fanem).
- Cromatógrafo gasoso 431-GC (Varian) acoplado ao detector de massas 210-MS (Varian).
- Espectrofotômetro de infravermelho, FTIR modelo 4000 (Jasco).
- Estufa a vácuo (Marconi).
- Rotaevaporador (Fisatom).
- Ressonância Magnética Nuclear (Bruker DPX 300 - 300 MHz para 1H e 75 MHz para ^{13}C).

5 MÉTODOS

5.1 Preparo do suporte

Em um Erlenmeyer de 250 mL adicionou-se 3,92 g de $MgCl_2$ e 50 mL de metanol, mantido sobre agitação a 25 °C. Posteriormente gota a gota foi adicionado uma solução contendo 2,45 g de APTMS e 12,5 mL de metanol. Ocorreu a formação de uma suspensão branca. Adicionou-se lentamente uma solução de NaOH 0,5 M, até atingir o pH de 10,5. Foi mantido em repouso durante uma semana a 25 °C. Após esse período, a solução formada foi centrifugada e o gel obtido levado à estufa a 65°C para secar conforme esquema 2.

Esquema 2. Processo geral para imobilização de enzimas em suporte de $MgCl_2$.



5.2 Imobilização das enzimas

Foram imobilizadas as enzimas lipase e quimosina, utilizando-se metodologias que envolvem a ligação covalente, empregando o glutaraldeído.

Em um béquer de 25 mL adicionou-se 0,4 g do suporte e 2 mL de glutaraldeído, permanecendo em repouso durante 1 h. Após esse período, o suporte foi filtrado em papel filtro e lavado com água destilada. Em seguida, adicionou-se ao suporte, 0,45 g de enzima e 10 mL de água destilada, manteve-se sobre agitação durante 12 h. Após o tempo decorrido, a enzima imobilizada foi filtrada em papel

filtro, lavada com água destilada e seca em temperatura ambiente, esquema 2. Este composto foi analisado em espectroscopia de infravermelho.

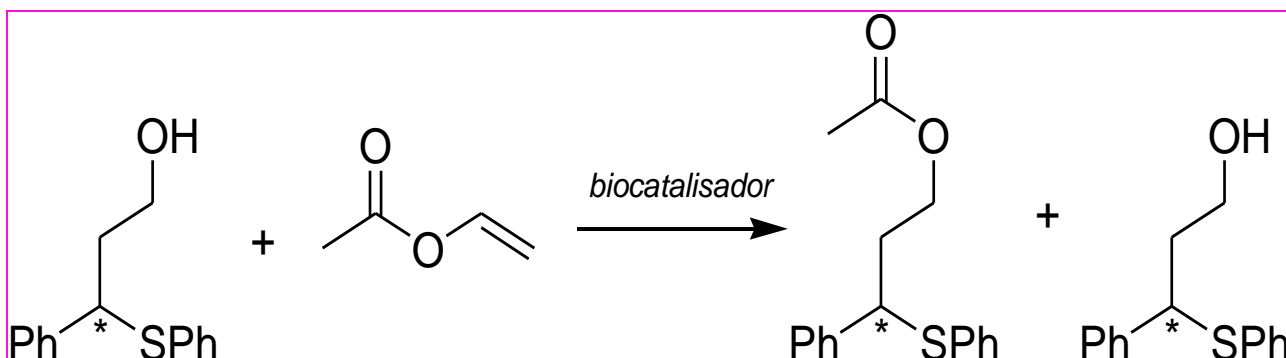
5.3 Síntese das β -tioalcóois com cinamaldeído e tiofenol

O composto 3-fenil-3-feniltiopropanol foi sintetizado conforme descrito por Darbem^[57] utilizando-se como catalisador o bis-glicinato de zinco (II) conforme descrito a seguir. Em um balão de 50 mL, adicionou-se 1,0 equivalente de cinamaldeído, 10 mL de etanol, 10 % mol catalisador bis-glicinato de zinco (II) e posteriormente foi adicionado 1,0 equivalente de tiofenol. A reação processou-se com agitação durante um período de 180 min. Após essa etapa, filtrou-se a reação para retirada do catalisador, adicionou-se NaBH_4 para a redução do produto carbonilado e a reação foi deixada sob agitação por mais 90 minutos. Passado este tempo, rotaevaporou-se, e o bruto da reação foi extraído primeiramente com acetato de etila e posteriormente com uma solução de bicarbonato de sódio 10% (m/v). A fase orgânica foi seca com MgSO_4 e rotaevaporado. O composto foi purificado via cromatografia em coluna utilizando-se sílica gel 60 e tendo como eluente a mistura de solventes hexano:acetato (9,5:0,5). O composto foi identificado via FTIR, CG/MS e RMN ^1H , ^{13}C e DEPT 135.

5.4 Procedimento geral para resolução enzimática do 3-fenil-3-feniltiopropanol

O procedimento adotado foi conforme descrito por Patel^[58] o qual envolve a utilização de acetato de vinila para tal resolução de alcoóis (Esquema 3).

Esquema 3. Procedimento geral para resolução enzimática do 3-fenil-3-fenilpropanol.



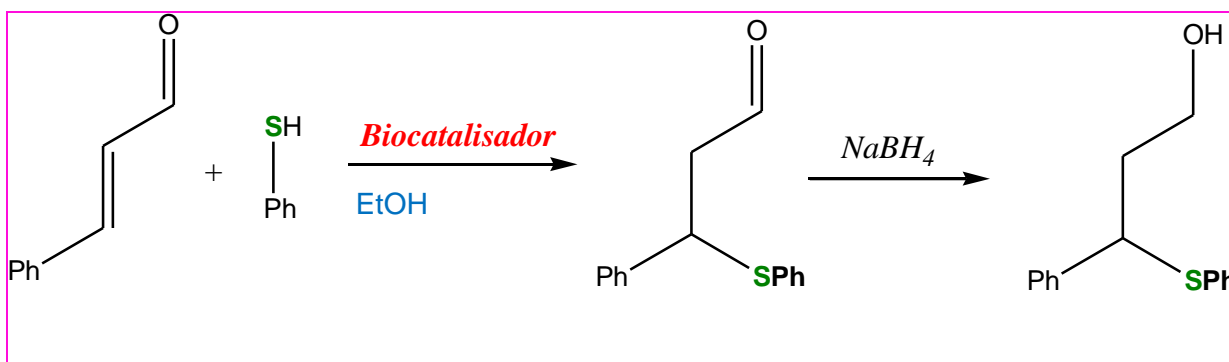
Cumpra salientar que todas as enzimas utilizadas foram suportadas em cloreto de magnésio. Foram imobilizadas as seguintes enzimas: lipase de pâncreas suíno e quimosina as quais, a partir de agora chamaremos de Mg-LPP e Mg-QUI.

Foram testados como solventes: hexano, THF, 1,2-dicloroetano e DMSO. Foram utilizados 0,1 g de enzima imobilizada, 0,14 g do álcool, 0,214 mL de acetato de vinila e 10 mL do respectivo solvente, permanecendo sobre agitação durante 1 dia, em temperatura ambiente. Após esse período, o produto foi rotoevaporado, obtendo-se ao término deste processo uma fração a qual foi purificada por coluna cromatográfica de sílica gel, sendo a razão de sílica/amostra utilizada de 30 g para cada 1 g de composto, tendo como fase móvel uma solução de hexano/acetato de etila 8:2.

5.5 Síntese do 3-fenil-3-fenilpropanol via enzimática

Para a comprovação dos efeitos da imobilização sobre a atividade catalítica da lipase de pâncreas suíno, foram realizados testes iguais aos publicados anteriormente por Rizzo ^[59] (Esquema 4).

Esquema 4. Descrição geral da biossíntese de β -tioalcóois.



Em um balão de uma boca de 50 mL, adicionou-se 103 μ L (0,82 mmol) do cinamaldeído, 92,3 μ L (0,9 mmol) do tiofenol, e quantidades variáveis de biocatalisador Mg-LPP em 15,0 mL de solvente etanol. A reação processou-se com agitação por 2 h e 5h à temperatura ambiente. Após esse tempo filtrou-se a reação para retirada do biocatalisador. Em seguida, foram adicionados 0,09 g de borohidreto de sódio. O balão reacional foi inserido em um equipamento de ultrassom e deixado reagir por 30 min. Após esse tempo a fase orgânica foi extraída com acetato de etila e água. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio, posteriormente filtrada e então, rotoevaporada, obtendo-se ao termino deste processo uma fração amarelo oleosa a qual foi purificada por coluna cromatográfica de sílica gel, sendo a razão de sílica/amostra utilizada de 30 g para cada 1 g de composto, tendo como fase móvel uma solução de hexano/acetato de etila 8:2. Este composto foi analisado por cromatografia gasosa, espectroscopia de infravermelho e por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono. Os dados espectroscópicos correspondem aos citados na literatura.

5.6 Síntese do 2-Benzoamido-3-fenil-3-fenilsulfanil-tiopropionato de S-fenila (Figura 3)

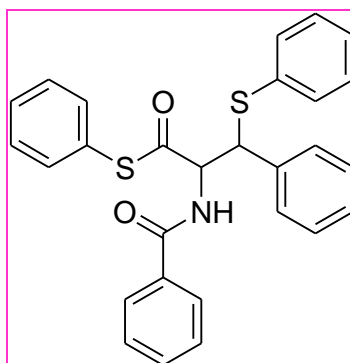
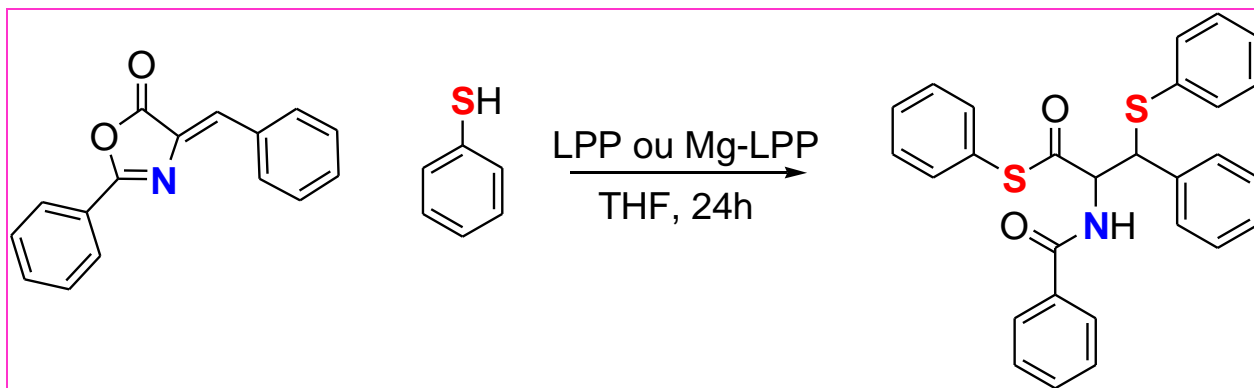


Figura 3. 2-Benzoamido-3-fenil-3-fenilsulfanil-tiopropionato de S-fenila.

Foi realizada também a tentativa de síntese de derivados de aminoácidos não naturais provenientes de reações de catálise enzimática. Para tanto realizou-se a reação envolvendo a 4-Benzilideno-2-fenil-4H-oxazol-5-ona juntamente com cinco equivalentes molar de tiofenol conforme descrito por Genget *al* (Esquema 4) ^[60].

Esquema 5. Reação biocatalizada por LPP e Mg-LPP de tio-Michael à azalactonas.



Neste processo, ocorre a adição de dois equivalentes de tiofenol tanto à dupla exocíclica quanto à carbonila levando ao produto tio-éster descrito no esquema 5.

Em um balão de uma boca de 25 mL foram adicionados 5mL de THF, 0,053 (0,212 mmol) g de 4-Benzilideno-2-fenil-4H-oxazol-5-ona, 0,109 mL (1,07 mmol) de tiofenol e 0,053 g das enzimas LPP e Mg-LPP com tempo reacional de 24 h sob agitação. Após esse período a reação foi filtrada para a retirada do biocatalisador e

rotaevaporado. O etanol não foi utilizado decorrente da não solubilidade da azalactona nesse meio.

Foi obtido ao término deste processo uma fração a qual foi purificada por coluna cromatográfica de sílica gel, sendo a razão de sílica/amostra utilizada de 30 g para cada 1 g de composto, tendo como fase móvel uma solução de hexano/acetato de etila 9:1.

Estes compostos foram analisados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Espectro de infravermelho obtido para o suporte de $MgCl_2$ e das enzimas imobilizadas

Os dados de infravermelho estão apresentados abaixo (Figura 4):

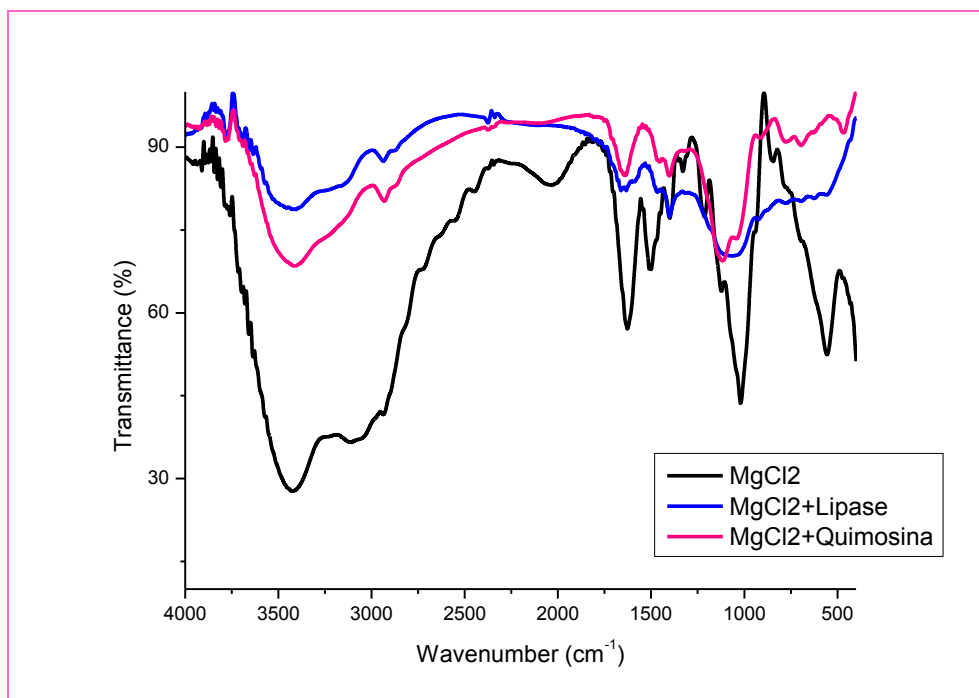


Figura 4. Espectro de infravermelho para o suporte inorgânico de $MgCl_2$ (preto); a lipase imobilizada (azul) e quimosina imobilizada (rosa) em suporte inorgânico de $MgCl_2$.

Através dos dados de infravermelho obtidos quando comparados com os dados descrito na literatura para a lipase de pâncreas suíno, pôde-se confirmar a imobilização da lipase.

Já, para a quimosina, os dados obtidos são inéditos, mas bem similares com os obtidos para a lipase.

6.2 Estudo da resolução do 3-fenil-3-feniltiopropanol

Para a resolução, foram analisados os seguintes solventes: hexano, THF, 1,2-dicloroetano e DMSO, pois cobrem uma grande gama de constante dielétrica, coeficiente de partição e momento de dipolos. Esses dados podem trazer-nos

indícios principalmente da polaridade do sítio ativo. Cada enzima possui sítio, ou sítios ativos provenientes de locais contendo porções de aminoácidos, os quais, dependendo do ambiente, podem ser mais polares ou menos. Isto será transcrito na polaridade do sítio e o mesmo, portanto, será mais efetivo dependendo do meio utilizado. Os dados contidos na tabela 1, indicaram que a quimosina imobilizada em suporte de $MgCl_2$ se mostrou promissora na resolução enzimática do referido álcool.

Tabela 1. Resultados obtidos para as reações de resolução enzimática de 3-fenil-3-feniltiopropanol.

Experimento	Enzima suportada	Solventes	Rendimento (%)
1	Mg-LPP	THF	*
2	Mg-LPP	Hexano	*
3	Mg-LPP	1,2-dicloroetano	*
4	Mg-LPP	DMSO	*
5	Mg-QUI	THF	61
6	Mg-QUI	Hexano	*
7	Mg-QUI	1,2-dicloroetano	*
8	Mg-QUI	DMSO	*

Porém ao se avaliar todos os solventes utilizados pôde-se chegar a uma conclusão tendo como base a tabela 2 a seguir:

Tabela 2. Dados de log P, dipolo e constante dielétrica dos solventes utilizados na resolução do 3-fenil-3-feniltiopropanol utilizando-se enzimas suportadas.

Solvente	Log P	Dipolo (D)	Constante dielétrica (ϵ)
THF	0,46	1,63	7,52
Hexano	3,76	-	2,02
1,2-dicloroetano	1,50	1,80	7,20
DMSO	-1,3	3,96	47,2

Conforme observado na tabela 2, e através de dados de utilização, por exemplo, industrial da quimosina, a qual é empregada industrialmente na produção

de queijo, e um meio praticamente orgânico, pôde-se verificar através dos dados de Log de P que o solvente que proporcionaria uma melhor miscibilidade tanto da fase orgânica quanto do meio aquoso seriam os solventes THF e DMSO. Todavia, o solvente DMSO apresenta um momento de dipolo muito elevado em comparação com o THF, juntamente com uma elevadíssima constante dielétrica o que prejudicaria a realização da resolução. Através destes dados pôde-se, portanto, estabelecer um meio ideal para a utilização da quimosina imobilizada em suporte inorgânico. Este fato é comprovado na literatura no qual Groves *et al.* ^[61] descrevem diversas porções da estrutura da quimosina contendo sítios ativos como S1, S3, P1 e P3 os quais apresentam características hidrofóbicas.

Para descrever a especificidade de todas as classes de proteases, utiliza-se o modelo desenvolvido por Schechter e Berger ^[62]. De acordo com este modelo, os subsítios da enzima (designados pela letra “S”) são locais onde os resíduos de aminoácidos do substrato (designado pela letra “P”) se ligam ao sítio ativo, sendo que cada subsítio acomoda um único resíduo de aminoácidos (Figura 5). Os resíduos posicionados ao lado da ligação peptídica a ser clivada são numeradas P1, P2, P3... em direção ao N-terminal do substrato, e P1', P2', P3'... em direção ao C-terminal. Assim, P1 e P1' são os resíduos que formam a ligação peptídica a ser clivada no substrato da protease que acomodam os resíduos do substrato correspondentes.

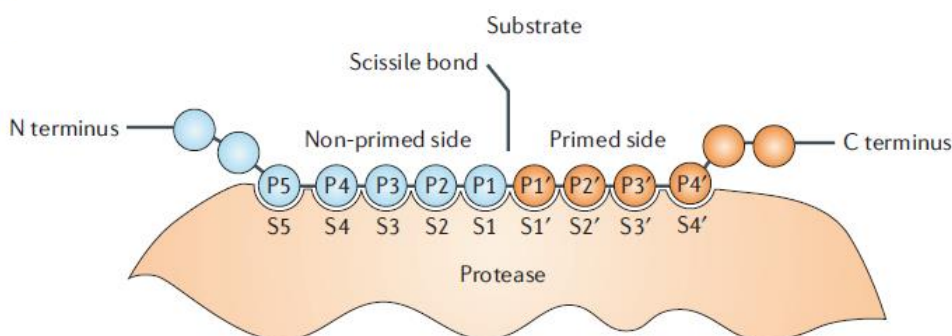


Figura 5. Modelo de Schechter e Berger ^[62]. Modelo utilizado para descrever a interação de uma protease com o substrato protéico. Adaptado de Turk ^[63].

Já para a lipase, o que se conclui, é que o suporte afetou sua estrutura e sua atividade. Isto porque na literatura há diversos manuscritos que descrevem a resolução de álcoois utilizando-se lipase. Todavia, não foi possível até o momento identificar qual foi o efeito que permitiu o decréscimo na atividade catalítica.

Posteriormente, decidiu-se realizar novos testes agora envolvendo a variação da quantidade catalisadora. Foram realizados testes fazendo-se uso da mesma metodologia acima citada, porém com o uso de 0,15 g e 0,20 g de enzima imobilizada. Os resultados estão apresentados na figura 6.

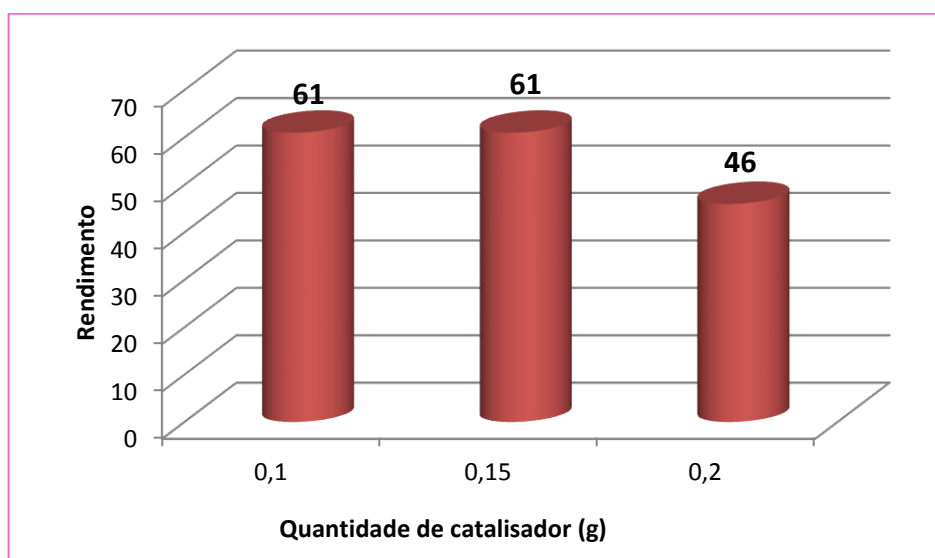


Figura 6. Rendimentos obtido para a resolução enzimática de 3-fenil-3-feniltiopropanol utilizando-se Mg-QUI em meio de THF.

Através da observação dos dados reacionais para a resolução descrita na figura 6, pode-se observar que o aumento da quantidade de catalisador de 0,1 g para 0,15 g (50% de aumento) não confere nenhum aumento nos rendimentos. Pôde-se verificar também que com a utilização do dobro de enzima, foi identificado um efeito inverso, ou seja, um decréscimo nos rendimentos. Tal fato foi descrito por Rizzo ^[59] como um efeito de decomposição do material obtido (a reversibilidade da reação). Ou seja, através de outro mecanismo reacional a enzima, provavelmente, utiliza o composto sintetizado para realizar uma reação lateral. Dados preliminares indicam que para a quimosina, observa-se um processo de oxidação do enxofre, mas até o presente momento essa hipótese não foi totalmente confirmada ^[64].

No tocante à determinação do estereoisômero obtido, não foi possível sua verificação decorrente da ausência de colunas quirais na UFGD. Tais resultados estão sendo realizados em instituições de ensino parceiras, mas até o presente momento os dados não estavam disponíveis.

6.3 Estudo de síntese do 3-fenil-3-feniltiopropanol via enzimática

Foram realizadas as sínteses do 3-fenil-3-feniltiopropanol partindo-se da reação entre o cinamaldeído (103 μL , 0,82 mmol), tiofenol (92,3 μL , 0,9 mmol) variando a quantidade de enzima como descrito na figura 7 a seguir.

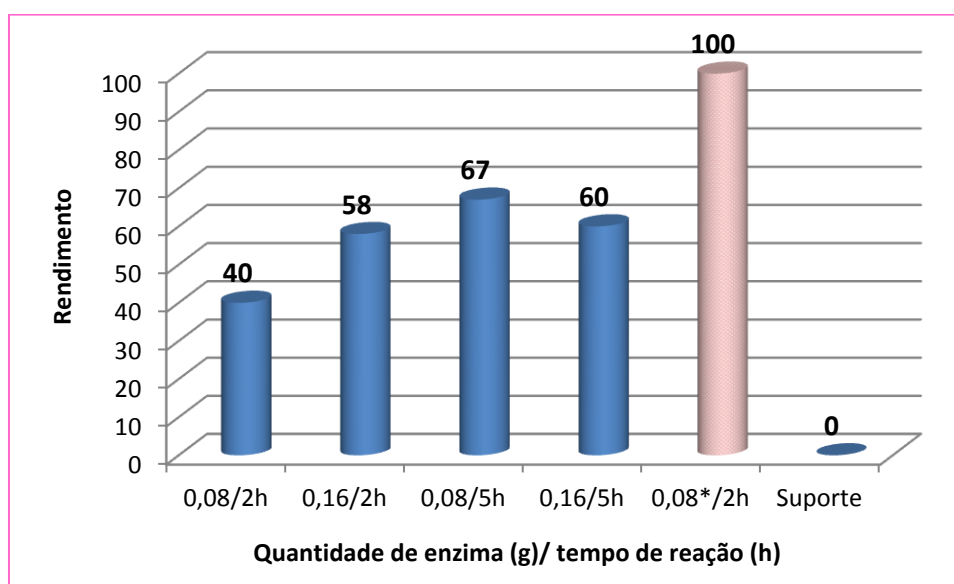


Figura 7. Testes de atividade catalítica da lipase de pâncreas suíno imobilizadas em suporte de MgCl_2 nas reações de tio-Michael. *Rizzo ^[59]

Estas reações foram executadas para se verificar a mudança ou não da atividade enzimática. Primeiramente pode-se avaliar a comparação da mesma quantidade de catalisador descrito no trabalho de Rizzo ^[59] em comparação com a enzima imobilizada em suporte inorgânico.

Como podemos verificar através da análise dos dados, verificou-se um declínio na atividade da enzima comparando a mesma quantidade de catalisador (0,08 g em 2 h). Para o trabalho descrito por Rizzo ^[59], esta quantidade de enzima proporciona a obtenção de 100% do composto de interesse, mas a mesma

quantidade de enzima imobilizada não produz o mesmo rendimento. Aliás, produz apenas 40% do rendimento. Este fato pode ser explicado através da alteração que o suporte produz na conformação quaternária da enzima. Tal alteração pode diminuir a ação catalítica da enzima. Além disso, a inserção do suporte é um fator importante porque diminui a quantidade de enzima no meio reacional. Isto também pode ser um fator que pode explicar a diminuição dos rendimentos obtidos. Este fato pode ser comprovado pelo dado que foi obtido através do aumento da quantidade de catalisador (0,16 g) que foi traduzido com um aumento de 45%. Este dado foi importante porque se pôde verificar também a influência do tempo reacional no processo catalítico. Utilizando-se 0,08 g de enzima imobilizada e com um tempo reacional de 5 h houve um aumento de 67,5% no rendimento da reação. Todavia, com o aumento do catalisador (0,16g) utilizando-se o mesmo período de 5 horas, houve um decréscimo no rendimento em comparação com o dado obtido para 0,08 g por 5 h. Este dado novamente é explicado pela reação inversa de decomposição do produto obtido.

Cumprir informar que, para os processos de imobilização de enzimas o suporte pode afetar sua conformação e, provavelmente sua atividade. Este efeito foi observado quando se utilizou o suporte de $MgCl_2$ e a lipase quando da comparação dos dados da enzima livre comparado com os dados de catálise com a enzima imobilizada. Portanto, conclui-se que, através da modificação conformacional da enzima decorrente da imobilização e da menor quantidade de enzima presente no suporte comparado com a enzima livre utilizada no meio reacional por Rizzo ^[59], pôde-se verificar uma diminuição da efetividade catalítica no processo imobilizado.

Além disso, tentando evidenciar que a imobilização permitiria a reutilização da enzima mesmo obtendo-se rendimentos não tão grandes, realizou-se tal processo para verificação. Os dados estão apresentados na figura 8 a seguir:

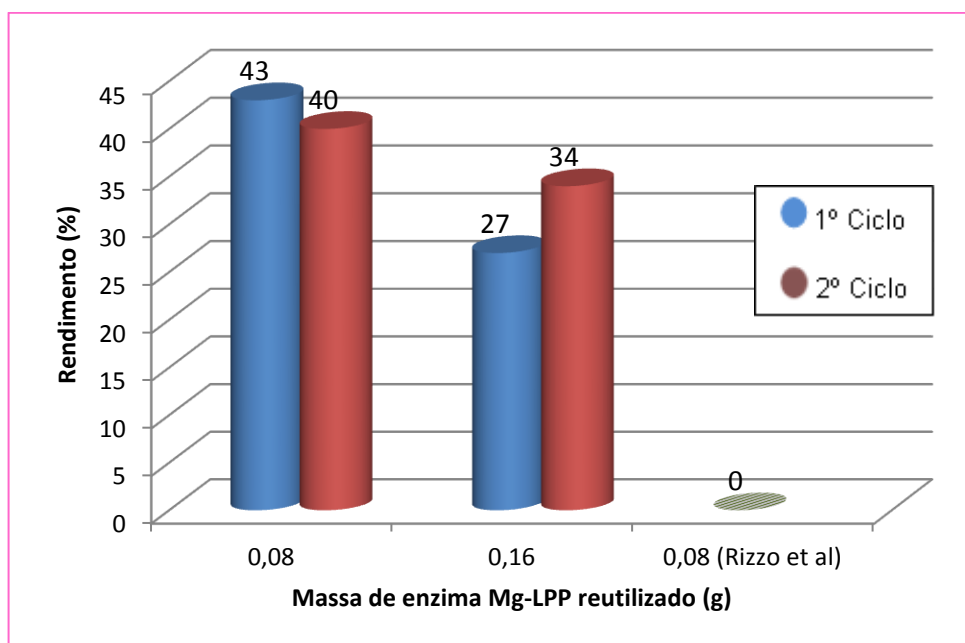


Figura 8. Rendimentos para a reutilização da Mg-LPP em seu primeiro ciclo e segundo ciclo de reutilização na reação de tio-Michael juntamente com o dado descrito por Rizzo ^[59].

É importante notar que para a reação envolvendo a enzima imobilizada, foi possível a retirada do catalisador sem perda de material. Já na mesma reação realizada por Rizzo ^[59] a reutilização da enzima não ocorreu decorrente da perda total da atividade catalítica da LPP livre no segundo ciclo reacional. Este dado pode ser explicado através de inativações em decorrência do choque do processo de agitação magnética. Essa agitação é criada pela barra magnética a qual, através de choques com as enzimas, age prejudicialmente afetando a atividade das mesmas. Este fator é primariamente observado em lipases. Já a presença do suporte, juntamente com a não utilização de agitação magnética (agitação via orbital), como proposto neste projeto, possibilitou a reutilização da enzima bem como a obtenção de baixos rendimentos, mas indicando a evidência de que o suporte proporcionou uma estabilização da enzima no meio reacional. Portanto, mesmo com a perda da atividade enzimática, no que tange à proteção da enzima pelo suporte e reutilização das mesmas, podemos concluir que a inserção do $MgCl_2$ confere maior estabilidade à LPP. Este dado pode evidenciar que o suporte, em trabalhos futuros pode ser de extrema valia na imobilização de enzimas.

6.4 Estudo de síntese do 2-Benzamido-3-fenil-3-fenilsulfanil-tiopropionato de S-fenila

A reação biocatalizada por LPP e Mg-LPP de tio-Michael envolvendo a 4-Benzilideno-2-fenil-4H-oxazol-5-ona juntamente com cinco equivalentes molar de tiofenol conforme descrito por Genget *al.* (Esquema 4) ^[64], após 24 horas verificou-se rendimentos quantitativos para ambas as reações.

Todavia, no que tange aos excessos diastereoméricos, pode-se verificar diferenciações demonstradas nos espectros de RMN de ¹H a seguir:

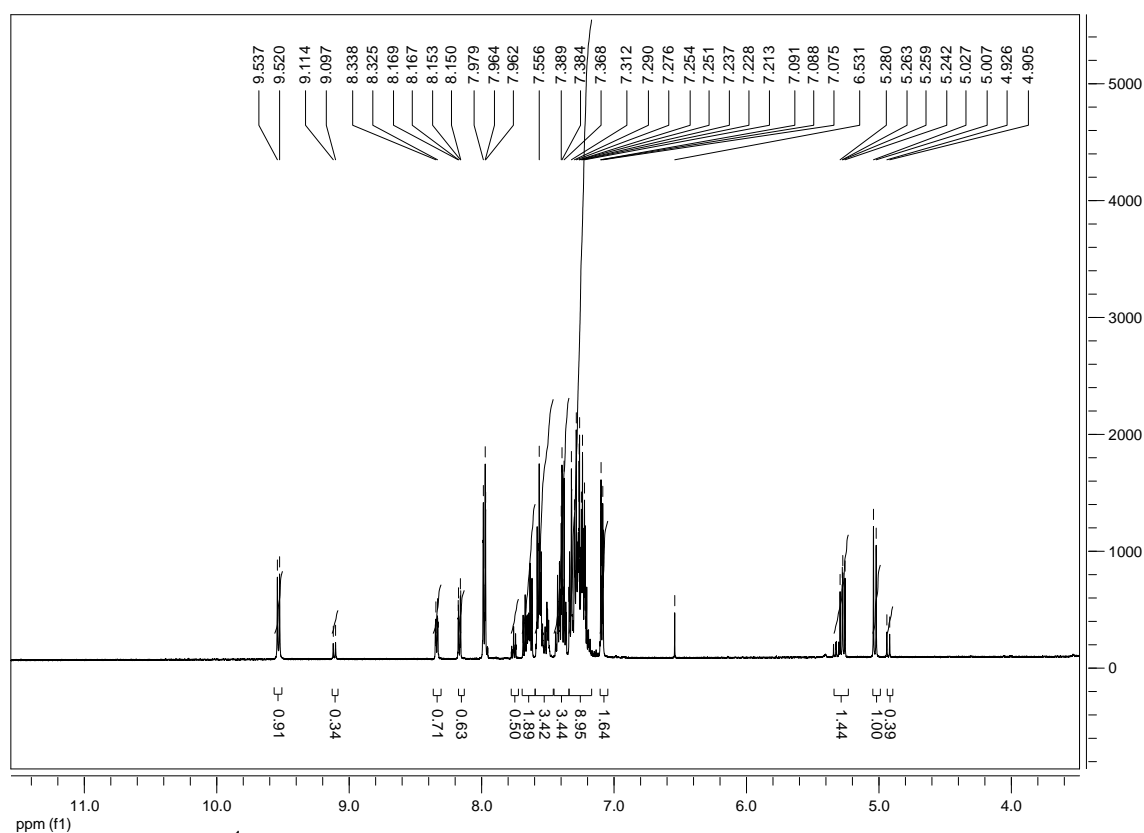


Figura 9. Espectro de RMN ¹H para o composto 2-Benzamido-3-fenil-3-fenilsulfanil-tiopropionato de S-fenila obtido pela biocatálise com Mg-LPP.

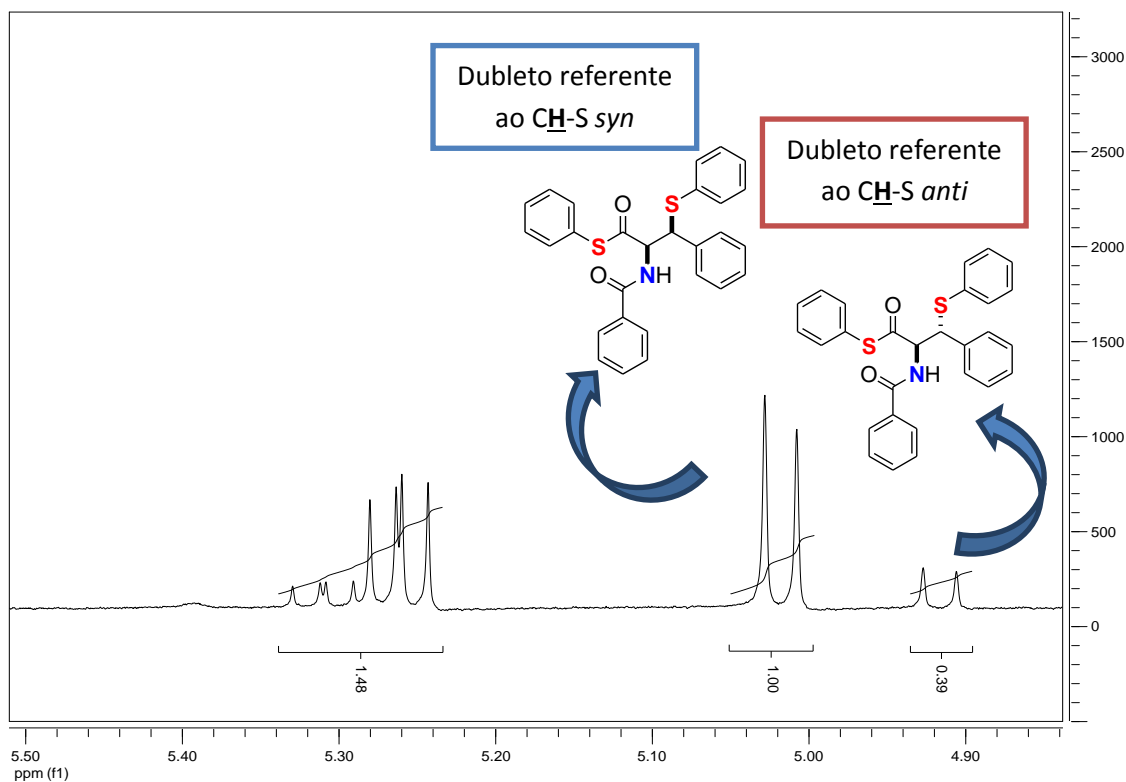


Figura 10. Ampliação do espectro de RMN ^1H para o composto 2-Benzoamido-3-fenil-3-fenilsulfanil-tiopropionato de S-fenila obtido pela biocatálise com Mg-LPP.

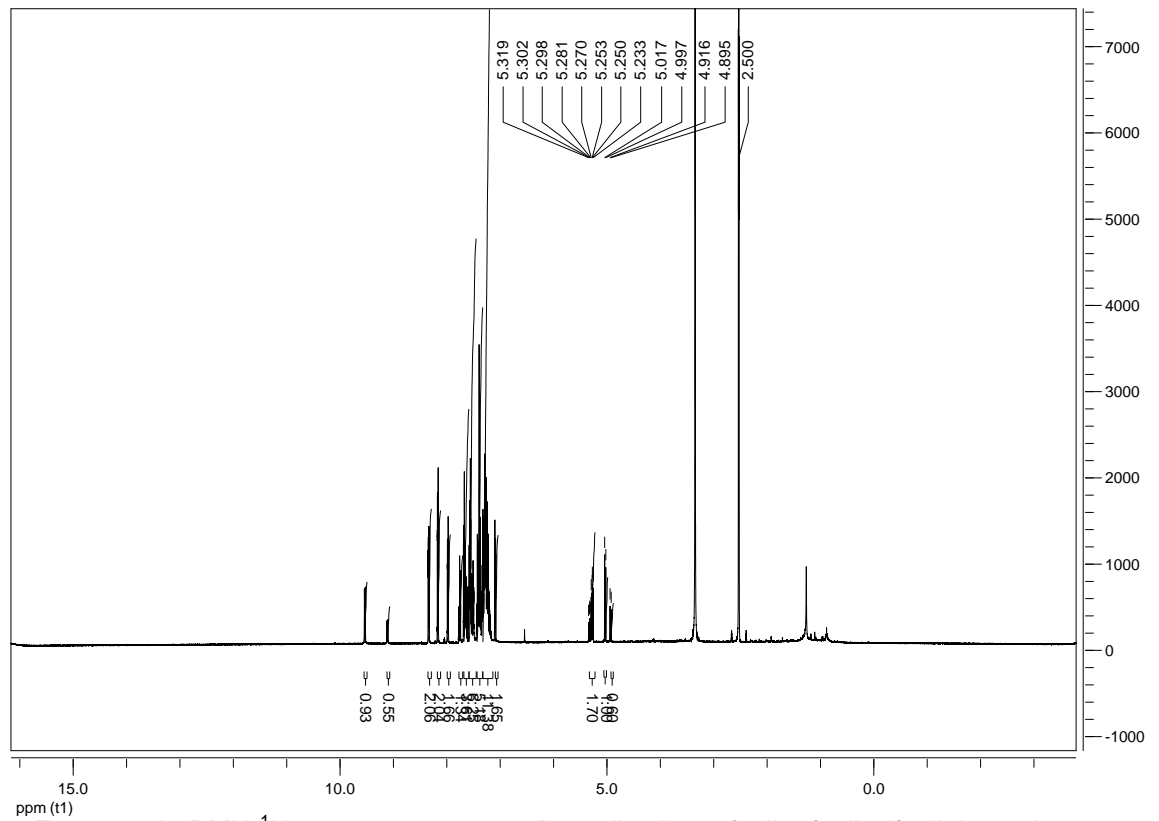


Figura 11. Espectro de RMN ^1H para o composto 2-Benzoilamino-3-fenil-3-phenilsulfanyl-tiopropionato de S-phenila obtido pela biocatálise com LPP.

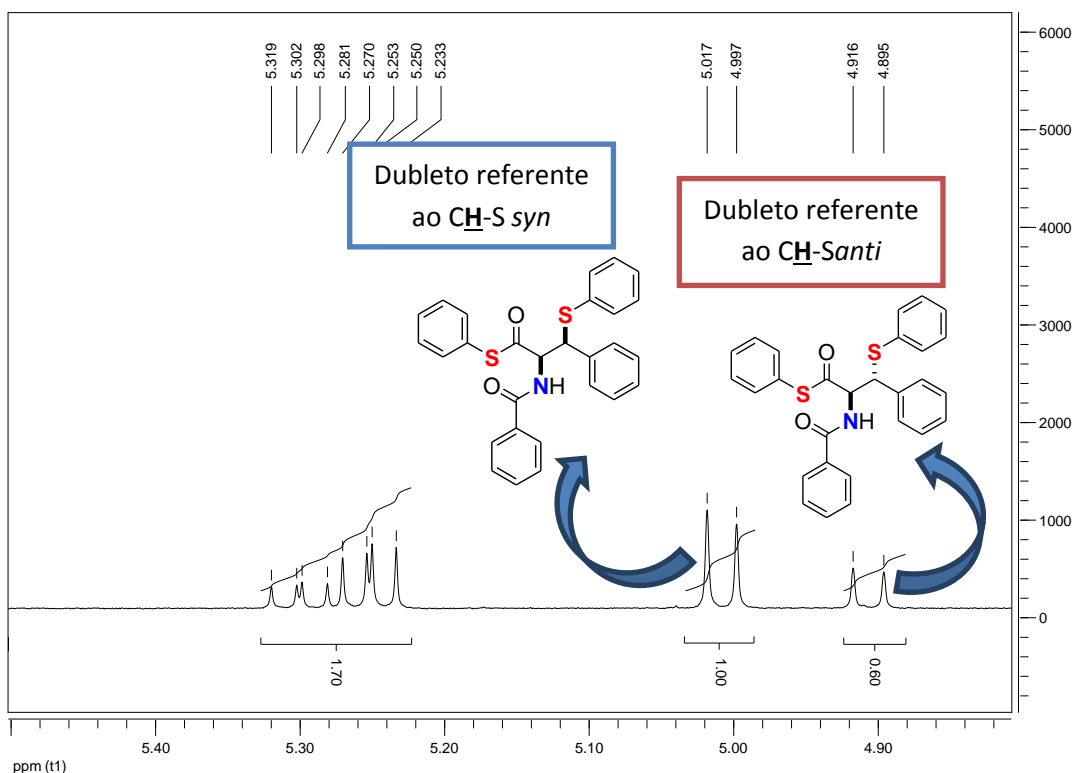


Figura 12. Ampliação do espectro de RMN ^1H para o composto 2-Benzoamido-3-fenil-3-fenilsulfanilpropionato de S-fenila obtido pela biocatálise com LPP.

Observando-se as figuras 10 e 12, pôde-se concluir que o excesso diastereomérico (*d.e.*) obtido quando do uso da enzima lipase de pâncreas suíno livre (LPP) foi menor de que quando utilizado essa mesma enzima imobilizada em MgCl_2 (Mg-LPP). Isto se deve a modificações estruturais da conformação enzimática proporcionada pelo suporte, tornando o sítio ativo da enzima mais seletivo do que quando a mesma apresenta-se de forma livre. Essa informação possibilita trabalhos futuros já em andamento para verificar a diastereosseletividade dessas reações contendo outros suportes enzimáticos. Decorrente da análise das constantes de acoplamento descritos no trabalho de Genget *al.* ^[64] pôde-se determinar o par enantioméricos *syn* tendo prevalência ao *anti*. Cumpre informar que este tipo de reação não foi descrito na literatura via biocatálise.

7 CONCLUSÃO

Através da análise dos dados obtidos, pôde-se concluir que o suporte inorgânico influenciou a atividade da enzima lipase de pâncreas suíno de forma a reduzir sua atividade nas reações de tio-Michael. Porém, a existência do suporte possibilitou a reutilização do catalisador, mesmo em baixos rendimentos, mas com perspectivas futuras de outros estudos que possam proporcionar, já no primeiro ciclo, rendimentos excelentes e, assim, possibilitando a reutilização do biocatalisador.

Já para o processo de resolução do 3-fenil-3-feniltiopropanol, os dados indicaram que a resolução foi possível, mas ainda necessita da comprovação de qual enantiômero foi acetilado e qual permaneceu intacto. É necessário a otimização da reação em novos solventes, o que está em andamento juntamente com a verificação dos enantiômeros mencionados anteriormente.

Cumprir informar que a resolução enzimática de álcoois sulfurados ainda não foi objeto de estudo na literatura.

Conclui-se também que para a síntese de novos compostos que poderão vir a produzir novos aminoácidos não naturais, as biocatálises envolvendo a LPP e Mg-LPP foram satisfatórias produzindo rendimentos quantitativos dos produtos. Todavia, para a reação que fora utilizado a Mg-LPP, o excesso diastereomérico obtido para o composto *syn* foi maior quando comparado com o composto *anti*. É importante citar que estas reações, envolvendo biocatálise, são inéditas.

8 REFERÊNCIAS

- ¹ FUJITA, E.; NAGAO, Y. *Bioorg. Chem.* 6, 287(1977); (b) LING, R.; YOSHIDA, M.; MARIANO, P. S. *J. Org. Chem.* 61, 4439 (1996).
- ²(a) CZARNIK, A. W. *Acc. Chem. Res.* 29, 112 (1996); (b) NGUYEN-BA, N.; BROWN, W. L.; CHAN, L.; LEE, N.; BRASILI, L.; LAFLEUR, D.; ZACHARIE, B. *Chem. Commun.* 1245 (1999); (c) ASHIZAWA, T.; KAWASHIMA, K.; KANDA, Y.; GOMI, K.; OKABE, M.; UEDA, K.; TAMAOKI, T. *Anticancer Drugs*.10, 829 (1999); (d) DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products*. 2nd ed.; John Wiley & Sons: West Sussex, England (2002); (e) VARDANYAN, R. S.; HRUBY, V. J. *Synthesis of Essential Drugs*. Elsevier: Amsterdam (2006).
- ³TROST, B. M.; KEELEY, D. E. *J. Org. Chem.* 40, 2013 (1975).
- ⁴CHERKAUSKAS, J. P.; COHEN, T. *J. Org. Chem.* 57, 6 (1992).
- ⁵ (a) FLUHARTY, A. L. *The Chemistry of the ThiolGroup*.Patai, S., Ed.; Wiley Interscience: New York, NY, 589 (1974); (b) KUMAR, A.; SALUNKHE, R. V.; RANE, R. A.; DIKE, S. Y. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 485 (1991).
- ⁶ O'CONNOR, S. E.; GROSSET, A.; JANIAC, P. *Fundam.Clin. Pharmacol.*13 (2): 145-153 (1999).
- ⁷ SAITO, M.; NAKAJIMA, M.; HASHIMOTO, S. *Tetrahedron* 56, 9589-9594 (2000).
- ⁸ GARG, S. K; KUMAR, R.; CHAKRABORTI, A. K. *Synlett*1370-1374 (2005).
- ⁹ KHAN, A. T.; GHOSH, S.; CHOUDHURY, L. H. *Eur. J. Org. Chem. Chem.* 2226-2231 (2006).
- ¹⁰ BANERJEE, S.; DAS, J.; ALVAREZA, R. P.; SANTRA, S.; *New J. Chem.* 34, 302-306 (2010).
- ¹¹ YADAV, J.S.; REDDY, B.V.S.; BAISHYA, G.J. *Org. Chem.* 68, 7098-7100 (2003).
- ¹² RANU, B. C.; DEY, S. S. *Tetrahedron* 60, 4183-4188 (2004).
- ¹³ SAEED ABAEE, M.; CHERAGHI, S.; NAVIDIPOOR, S.; MOJTAHEDI, M. M.; FORGHANI, S. *Tetrahedron Lett.*53, 4405 (2012).
- ¹⁴ WU, M-Y.; LI, K.; HE, T.; FENG, X-W.; WANG, X-Y.; YU, X-Q. *Tetrahedron*.67, 2681-2688 (2011).
- ¹⁵ CORRÊA, A. G.; ZUIM, V. G. *Princípios da Química Verde. Química Verde: Fundamentos e Aplicações*. 1 ed. São Carlos: EDUFSCar, v. 1, 9-22 (2009).

- ¹⁶ GUISAN, J. M. *Immobilization of Enzymes and Cells*. Guisan J. M., ed; Humana Press: Towata, cap. 1 (2006).
- ¹⁷ HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E.; *Chem. Soc. Rev.* 38, 453 (2009).
- ¹⁸ LOPEZ-GALLEGO, F.; MONTES, T.; FUENTES, M.; ALONSO, N.; GRAZU, V.; BETANCOR, L.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; *J. Biotechnol.* 116, 1 (2005).
- ¹⁹ VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 9, 113 (2000).
- ²⁰ DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. *Quim. Nova*, 27, 623 (2004).
- ²¹ DEMIR, S.; GÖK, S. B.; KAHRAMAN, M. V. *Starch/Starke*, 64, 3–9 (2012).
- ²² PATEL, H.A.; SHARMA, S.K.; JASRA, R. V. *J. Molec. Catal. A: Chem.* 286, 31-40 (2008).
- ²³ MICHAEL, A.; *J. Prakt. Chem.* 35 (1): 349-356 (1887).
- ²⁴ STROHMEIER, G. A.; SOVIC´, T.; STEINKELLNER, G.; HARTNER, F. S.; ANDRYUSHKOVA, A.; PURKARTHOFER, T.; GLIEDER, A.; GRUBER, K.; GRIENGL, H. *Tetrahedron* 65, 5663–5668 (2009).
- ²⁵ (a) ALAM, M. M.; VARALA, R.; ADAPA, S. R.; *Tetrahedron Lett.* 44, 5115, (2003). (b) BANDINI, M.; COZZI, P. G.; GIACOMINI, M.; MELCHIORRE, P.; SELVA, S.; UMANI-RONCHI, A.; *J. Org. Chem.* 67, 3700 (2002). (c) KOBAYASHI, S.; OGAWA, C.; KAWAMURA, M.; SUGIURA, M.; *Synlett.* 983 (2001). (d) GARG, S. K.; KUMAR, R.; CHAKRABORTI, A. K. *Tetrahedron Lett.* 46, 1721 (2005).
- ²⁶ CHENG, S.; COMER, D. D. *Tetrahedron Lett.* 43, 1179 (2002).
- ²⁷ RANU, B. C.; DEY, S. S.; SAMANTA, S. *Arkivoc.* iii, 44 (2005).
- ²⁸ KUMAR, A.; AKANKSHA. *Tetrahedron.* 67, 11086-11092 (2007).
- ²⁹ WANG, Z.; DAÍ, Z. *Enzyme and Microbial Technology.* v. 46, 407–418 (2010).
- ³⁰ FABER, K.; PATEL, R. *Current Opinion. Biotechnoogy*, v.11, 517-519 (2000).
- ³¹ TEMBA, E. S. C.; OLIVEIRA, I. M. F.; DONNICI, C. L. *Química Nova*, v. 26, n. 1, 112-122 (2003).
- ³² FERREIRA, H. V. *Resolução enzimática de alcoóis racêmicos com lipase de Candida antarctica e redução de cetonas com fungos de origem marinha*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos (2008).

- ³³ CHAMPE, C. P.; HARVEY A. A.; FERRIER, R. D. *Bioquímica Ilustrada*: Trad. Carla Dalmaz. 3. ed. Porto Alegre, Artmed(2006).
- ³⁴ TRAMPER, J. *Chemical versus biochemical conversion: when and how to use biocatalysts*. *Biochemistry and Bioengineering*, v. 52(2), 345-376 (1996).
- ³⁵ SHELDON, R. A.; *Chirotechnology, Industrial Synthesis of Optically Active Compounds*, Marcel Dekker: New York (1993).
- ³⁶ OMORI, A. T. *Derivados aromáticos de selênio e telúrio. Aplicação da biocatálise na preparação de selenetos e teluretos aromáticos enantiomericamente enriquecido*. Universidade de São Paulo. São Paulo, SP. (2005).
- ³⁷ CLOSOSKI, G.C. *Aplicação da biocatálise na síntese de γ -butirolactonas bioativas quirais. Novos reagentes visando a preparação estereosseletiva de análogos da vitamina A*. Universidade de São Paulo. São Paulo, SP. (2005).
- ³⁸ CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. *Engenharia Enzimática LIDEL*. Edições Técnicas, Lisboa PT. 121-140 (2003).
- ³⁹ MARTINI, V. Q. *Resolução do (\pm)-citronelol e ácido (\pm)-citronílico via Esterificação enantiosseletiva catalisada pela lipase de *Candida antarctica**. Universidade Regional de Blumenau. Blumenau. (2007).
- ⁴⁰ PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. *Kinetics and mechanics of reactions catalysed by immobilized lipases*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, 187-204 (2000).
- ⁴¹ BIZERRA, A. M. C.; MONTENEGRO, T. G. C.; LEMOS, T. L. G.; DE OLIVEIRA, M. C. F.; DE MATTOS, M. C.; LAVANDERA, I.; GOTOR-FERNANDEZ, V.; DE GONZALO, G.; GOTOR, V. *Tetrahedron* 67, 2858-2862 (2011).
- ⁴² REETZ, M. T. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 145–150 (2002).
- ⁴³ CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. *Quim. Nova*, 27, 1, 146-156 (2004).
- ⁴⁴ PREGNOLATO, M.; TERRENI, M.; DE FUENTES, I. E.; LEON, A. R. A.; SABUQUILLO, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. *J. Mol. Catal. B: enzymatic*. 11, 757–763 (2001).
- ⁴⁵ CHITPINITYOL, S.; CRABBE, M. J. C. *Chymosin and aspartic proteinases*. *Food Chemistry*, v. 61, n. 4, 395-418 (1998).

- ⁴⁶ GILLILAND, G. L.; WINBORNE, E. L.; NACHMAN, J.; WLO-DAWER, A. *The three-dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.3 Å resolution*. *Proteins: Structure, Function and Genetics* v. 8, 82-101 (1990).
- ⁴⁷ NEWMAN, M.; SAFRO, M.; FRAZAO, C.; KHAN, G.; ZDANOV, A.; TICKLE, I. J.; BLUNDELL, T. L.; ANDREEVA, N. *X-ray analyses of aspartic proteinases IV: Structure and refinement at 2.2 Å resolution of bovine chymosin*. *Journal of Molecular Biology*, v. 221, 1259-1309 (1991).
- ⁴⁸ FOLTMANN, B. *Ontogeny and characterization of porcine prochymosin, pepsinogen B, progastricsin and pepsinogen A*. In Abstract of the Fifth International Conference on Aspartic Proteinases'. Gifu, Japão. L5/5 (1993).
- ⁴⁹ MARTIN, P.; RAYMOND, M. N.; BRICAS, E.; DUMAS, B. R. *Kinetic studies on the action of Mucorpusillus, Mucormiehei acid proteases and chymosins A and B on a synthetic chromophoric hexapeptide*. *Biochemistry Biophysical Acta*, v. 612, 410-420 (1980).
- ⁵⁰ CHRISTENSEN, T.; WOELDIKE, H.; BOEL, E.; MORTENSEN, S. B.; HJORTSHOEJ, K.; THIM, L.; HANSEN, M. T. *High level expression of recombinant genes in Aspergillus oryzae*. *Biotechnology*, v. 6, 1419-1422 (1988).
- ⁵¹ MOHANTY, A. K.; MUKHOPADHYAY, U. K.; KAUSHIK, J. K.; GROVER, S.; BATISH, V. K. *Isolation, purification and characterization of chymosin from riverine buffalo (Bubalobubalis)*. *Journal of Dairy Science*, v. 70, 37-43 (2003).
- ⁵² JOHNSON, M. E.; LUCEY, J. *A Major technological advances and trends in cheese*. *Journal of Dairy Science*, v. 89, 1174-1178 (2006).
- ⁵³ GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. *Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, 15-32, (2002).
- ⁵⁴ VICENTE, A. A. *Preparação de açúcar invertido por meio de invertase imobilizada em sílica*. Instituto de Química. Universidade Estadual Paulista (UNESP) (2000).
- ⁵⁵ FREITAS, L.; PEREZ, V. H.; SANTOS, J. C.; de CASTRO, H. F.; BRAZ, J. *Chem. Soc.* 18, 1360 (2007).
- ⁵⁶ JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P.; *Crit. Rev. Biotechnol.* 28, 253 (2008).
- ⁵⁷ DARBEM, M. P. *Hybrid material from Zn[aminoacid]₂ applied in the thio-Michael synthesis*. UFGD, Dourados, MS (2014).
- ⁵⁸ PATEL, R. N.; BANERJEE, A.; NANDURI, V.; GOSWAMI, A.; COMEZOGU, F. T. *J. Am. Org. Chem. Soc.* v. 77, 1015-1019 (2000).

- ⁵⁹ RIZZO, P. V. S. *Síntese de Beta-Tioaldeídos Via Reação de Tio-Michael Utilizando Biocatalisadores*. UFGD, Dourados, MS. **(2013)**.
- ⁶⁰ GENG, Zhi-cong, et. al. *Enantioselective synthesis of optically active cis- β -thio- α -amino acid derivatives through an organocatalytic cascade thio-Michael/ring opening process*. Chem. Commun. 48, 4713-4715 **(2012)**.
- ⁶¹ GROVES, M. R., et.al. *Protein Engineering*.11(10), 833-840 **(1998)**.
- ⁶² SCHECHTER, I.; BERGER, A. on the size of the active site in proteases. *Biochemical and Biophysical Reserch Communications*, v. 27, 157-162 **(1967)**.
- ⁶³ TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *NatureReviewsDrugdiscovery*, v. 5, n. 9, 785-799 **(2006)**.
- ⁶⁴ RIZZO, P. V. S.; DOMINGUES, N. L. C. Dados não publicados **(2013)**.

9 MEMORIAL DAS ATIVIDADES

9.1 Créditos exigidos pelo programa

Total de créditos exigidos pelo programa: 24

- **Disciplinas obrigatórias: 4**
- **Disciplinas optativas: 12**
- **Seminários: 2**
- **Estágio Docência: 2**
- **Dissertação: 4**

9.2 CRÉDITOS CUMPRIDOS

- **Total de créditos cumpridos: 24**
- **Disciplinas obrigatórias: 4**

Disciplinas Cursadas	Créditos	Conceitos
Obrigatórias		
Inovação Biotecnológica	02	A
Meio Ambiente e Tecnologia	02	B
Estágio e Docência	02	A
Seminário	02	A
Optativas		
Ecologia de Ecossistemas	04	A
Fundamentos de Química Verde	04	A
Processamento de Alimentos Naturais do Cerrado	04	A
Total de Créditos Cursados	20	
Dissertação	04	