

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS  
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL  
LABORATÓRIO DE MATERIAS HÍBRIDOS**

**PAULA VANESSA SOUZA RIZZO**

**INTRODUÇÃO INOVADORA DE  
BIOCATALISADORES NA REAÇÃO DE TIA-  
MICHAEL**

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

**DOURADOS/MS  
MARÇO/2013**

**PAULA VANESSA SOUZA RIZZO**

**INTRODUÇÃO INOVADORA DE  
BIOCATALISADORES NA REAÇÃO DE TIA-  
MICHAEL**

**ORIENTADOR: PROF. DR. NELSON LUIS DE CAMPOS DOMIGUES**

**Dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia na área de concentração Tecnologia Ambiental.**

**DOURADOS/MS**

**MARÇO/2013**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD**

660.2  
R627i Rizzo, Paula Vanessa Souza.  
Introdução inovadora de biocatalizadores na reação de tia-Michael / Paula Vanessa Souza Rizzo. – Dourados, MS : UFGD, 2013.  
57 f.

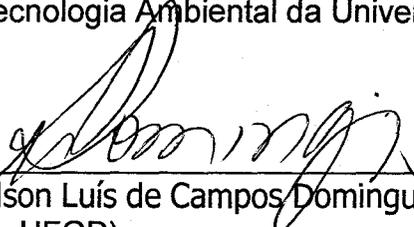
Orientador: Prof. Dr. Nelson Luis de Campos Domingues.  
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Catalisadores. 2. Reação de tia-Michael. 3. Tecnologia química. I. Título.



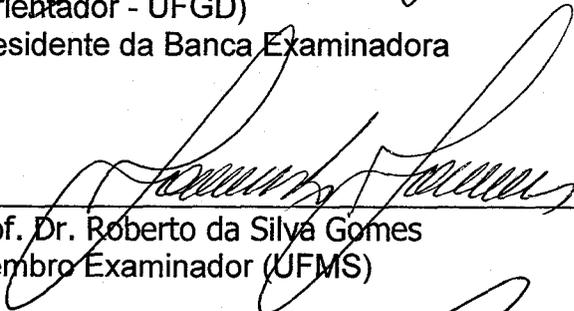
## Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Introdução Inovadora de Biocatalizadores na Reação de Tia-Michael”**, de autoria de Paula Vanessa Souza Rizzo, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



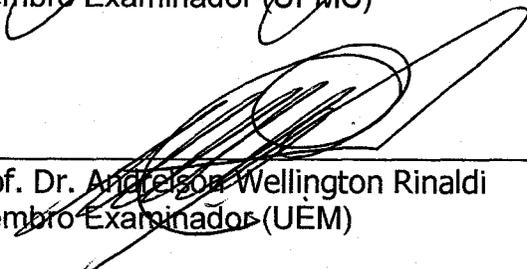
---

Prof. Dr. Nelson Luís de Campos Domingues  
(Orientador - UFGD)  
Presidente da Banca Examinadora



---

Prof. Dr. Roberto da Silva Gomes  
Membro Examinador (UFMS)



---

Prof. Dr. Anderson Wellington Rinaldi  
Membro Examinador (UEM)

Dourados/MS, 22 de março de 2013.

Ao Reis dos Reis, Senhor dos Senhores,  
pelo seu infinito amor.

"Viver pela fé não é fácil, mas essencial, é a única arma contra adversidade que não falha."

(Dorothy Kelley Patterson)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pelo dom da vida e seu infinito amor. Amor esse que não se esquece, não desampara, nunca falta e jamais falha. Agradeço à Deus por todas as bênção que derramastes e creio que inundará constantemente minha vida. Continuo a louvar à Deus por minha família maravilhosa, família que me dá suporte e imenso amor, minha preciosa mãe Cidinha, meu pai Paulo, o meu lindo irmão Thiago, minha cunhaimã Evellyn, aos meus queridos e ternos sobrinhos Thiego e Thierry, minha vó Elda ( in memoriam), minha vovuxa Eulina, meu vô Dito, tias Sandra, Deca, Lilian, tios Edimilson, Edson, Joel e pelos amorosos primos Gabriel, Cristhian, Matheus, Pedro, Edinho e terríveis primas Cibely, Gabriely e Amanda. Essa família linda, linda, linda que considero a melhor do mundo ofereço meu profundo agradecimento, por todas as risadas e piadas domingueiras que contribuíram para meu equilíbrio durante o decorrer deste trabalho, o amor de vocês embelezam a minha vida.

Não poderia deixar de agradecer e falar da dedicação, amor, que a minha beterraba Pãe (Pai e Mãe) destina a mim desde quando fui gerada. Obrigada por me dar condições que você nunca teve e espero poder retribuí-la um pouco de todo bem que me proporcionou, peço à Deus que realize todos os desejos do seu coração pois você merece. Nunca vi tanto esforço em uma só pessoa, sua amizade, seu amor, seus conselhos nos momentos de desespero ou planejamento, seus abraços são imprescindíveis para mim. Você esteve presente durante todas as etapas da minha vida e dessa dissertação, esse trabalho também é seu. TE AMO.

Ao meu amor Rudy Cortez presente de Deus para mim, obrigada por sempre me apoiar, me entender, estar presente em todos os momentos, por me acalmar, por seu carinho, afeto e amor. Esse trabalho é nosso. Também não posso deixar de agradecer aos meus queridos sogros Rubens e Nay por esse filho lindo, por todo carinho a mim dedicado e ajuda durante o decorrer do mestrado.

A minha família científica LMH. Primeiramente expresso minha profunda gratidão ao professor Nelson, por sua dedicação, extremo amor pela sua profissão e seus orientados, em 1. Coríntios 8:1 diz que a ciência incha, mas o amor edifica e eu me sinto honrada de ter feito parte do seu grupo. Agradeço a sua esposa Dani e filhos Nelson e Felipe por manter sempre o sorriso do professor Nelson de orelha a orelha. Estendo meu agradecimento a Dani também pelas super traduções no decorrer do mestrado.

Aos professores Andrelson, Adilson e Roberto pela disposição em contribuir com meu trabalho somando com o mesmo.

Agradeço aos meus irmãos científicos, Ana, Érica, Cris, Aline, Bia, Mari, Lígia Bianca, Pinduca, Elvis, Neimar e pseudoirmã Tábata. Ao meus primos científicos Keilinda, Elias, Silvia, Rafa, Boto, Persy, Cíntia, Ândria e Mirian.

Obrigada a todos os integrantes do laboratório que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho, vocês moram no meu coração e fazem parte de uma página muito linda da minha vida. Muito obrigada!

**LISTA DE ABREVIATURAS**

$\beta$ .....	Beta
$\alpha$ .....	Alfa
PPL.....	Lipase tipo II em estado bruto obtida de Pâncreas suíno
Lipozyme®.....	Lipase imobilizada em resina de troca iônica
$\text{NO}_2$ .....	Óxido de nitrogênio
$\text{Bi}(\text{OTf})_3$ .....	Trifluorometanosulfonato de Bismuto (III)
$\text{InBr}_3$ .....	Índio brometo
$\text{Hf}(\text{OTf})_3$ .....	Triflato háfnio
$\text{InCl}_3$ .....	Cloreto de índio
$\text{Cu}(\text{BF}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ .....	Tetrafluorborato de cobre
$\text{H}_2\text{O}$ .....	Água
pH.....	Potencial Hidrogeniônico
EC.....	Enzyme Commission
t.a.....	Temperatura ambiente
IUB.....	União Internacional de Bioquímica
THF.....	Tetrahidrofurano
$\text{NaBH}_4$ .....	Borohidreto de sódio
EtOH.....	Etanol
BSE.....	Encefalopatia espongiforme bovina
DMSO.....	Dimetilsulfóxido

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do medicamento Dítialzem.....	5
Figura 2: Rendimentos obtidos para as reações de tia-Michael biocatalisadas por PPL...	23
Figura 3: Dados da conversão das reações para 0,2g de produto final .....	23
Figura 4: Estudo da quantidade de enzima versus rendimentos obtidos para o produto de tia-Michael .....	25
Figura 5: Rendimentos obtidos para a reação de tia-Michael biocatalisada por Liposyme® .....	26
Figura 6: Lipozyme® em 2hs de reação com diferentes quantidades de enzima.....	27
Figura 7: Reação utilizando a quimosina em 4 horas reacionais. ....	31
Figura 8: . Otimização da reação da quimosina utilizando-se 0,2g de enzima em 2 horas reacionais conforme proposto no procedimento reacional. ....	32
Figura 9: Otimização na quantidade de Quimosina em 2 horas reacionais. ....	33
Figura 10: Testes reacionais levando em conta a quantidade enzimática na reação e solventes utilizados. ....	34
Figura 11: Estudo de catálise enzimática para a reação envolvendo a 2- cicloexen-1-ona e tiofenol por 4 horas .....	35
Figura 12: Dados da conversão para a reação com chalcona e tiofenol no solvente Clorofórmio .....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudo de custo da produção de beta-tioalcóois via biocatálise envolvendo Lipozyme® .....	28
Tabela 2: Dados envolvendo o reaproveitamento da enzima PPL.....	29

**LISTA DE ANEXOS**

Anexo I: Espectro de massas do composto 3-fenil-3-feniltio-1-propanol.....	48
Anexo II: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ , para o composto 3-fenil-3-feniltio-1-propanol.....	49
Anexo III: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ , para o composto 3-fenil-3-feniltio-1-propanol .....	50
Anexo IV: Espectro de RMN DEPT 135 para o composto 3-fenil-3-feniltio-1-propanol. ....	51
Anexo V: Espectro de massas do composto 3-feniltio-ciclohexanona .....	52
Anexo VI: Espectro de RMN $^1\text{H}$ para o composto 3-feniltio-ciclohexanona.....	53
Anexo VII: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ para o composto 3-feniltio-ciclohexanona .....	54
Anexo VIII: Espectro de RMN DEPT 135 para o composto 3-feniltio-ciclohexanona.....	55
Anexo IX: Espectro de massas do composto 1,3-difenil-3-feniltio-propanona.....	56
Anexo X: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ , para o composto 1,3-difenil-3-feniltio-1-propanona .....	57

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Reação de tia-Michael.....	4
Esquema 2: Síntese de compostos $\beta$ aminocetônicos.....	15
Esquema 3: Descrição geral da biossíntese de $\beta$ -tioalcóois.....	19
Esquema 4: Descrição geral da biossíntese de $\beta$ -cetonas com 2-cicloexen-1-ona e tiofenol .....	20
Esquema 5: Descrição geral da biossíntese de $\beta$ -tiocetonas utilizando chalcona e tiofenol.....	21

## RESUMO

A clássica reação de tia-Michael a qual envolve o átomo de enxofre com o nucleófilo da reação, o nucleófilo geralmente é ativado utilizando-se os ácidos de Lewis. Entretanto, a utilização destes é prejudicial ao meio ambiente. Nesse estudo sistemático analisaram-se as enzimas como ativadores desta reação tendo como objetivo propor uma inovação no tocante ao uso de novos catalizadores para a reação de tia-Michael sem a presença de metais. As enzimas utilizadas como biocatalizadores foram a lipase de pâncreas suíno (PPL), ou seja, a lipase em estado bruto, a Lipozyme® uma lipase imobilizada, a quimosina e a papaína. Testaram-se diferentes solventes como H<sub>2</sub>O, EtOH, DMSO e THF. Todas as reações foram realizadas à temperatura ambiente no intuito de amenizar os danos ao meio ambiente, diminuindo assim a energia utilizada e se enquadrando em mais um dos princípios da Química Verde. Os resultados observados para a reação entre cinamaldeído e tiofenol em 2 horas para a PPL no solvente EtOH com 70% de rendimento, em 4 horas para a lipozyme® com 69% de rendimento no solvente EtOH, 2 horas para a quimosina com 48% e 40% nos respectivos solventes EtOH e THF demonstraram a eficiência das enzimas como biocatalisadores. No tocante ao reaproveitamento a PPL foi reutilizada em 6 ciclos obtendo o composto esperado com rendimentos consideráveis apenas em 2 ciclos. A reação envolvendo 2-cicloexen-1-ona apresentou bons rendimentos sendo estes para a PPL 76%, Lipozyme® 68%, quimosina 70% e papaína 74%. A reação envolvendo a chalcona não apresentou o composto de interesse no solvente EtOH, entretanto no solvente clorofórmio apresentou conversões 14% para a enzima Lipozyme® utilizando 0,04g, 40% de conversão para a enzima Lipozyme® na quantidade de 0,02g de enzima, quimosina com 30% de conversão no solvente THF e a enzima papaína apresentando melhor conversão 51%. A comprovação dos dados foi obtido através de análises realizadas pelo CG-MS e FTIR. A biotransformação é uma inovação recente, sendo ainda pouco explorada em reações envolvendo adição tia-Michael e se apresenta como uma opção viável no tocante às questões ambientais.

**Palavras chaves:** Lipase, Lipozyme®, Quimosina, Papaína, tia-Michael

## ABSTRACT

The classic Ault-Michael reaction which involves the sulfur atom of the reaction with the nucleophile, the nucleophile is activated using Lewis acids, this systematic study we analyzed the enzymes as activators of this reaction, with the proposed innovative use of new catalysts for the reaction of Tia-Michael without the presence of these metals. The goal is to test the catalytic power of enzymes lipase, Lipozyme®, papain and chymosin. Tested different solvents such as H<sub>2</sub>O, EtOH, DMSO and THF. All reactions were performed at room temperature in order to minimize damage to the environment, thus reducing the energy used in framing and most of the principles of Green Chemistry. The results observed for the reaction between cinnamaldehyde and thiophenol in 2 hours for the PLP in the solvent EtOH with 70% yield in 4 hours to Lipozyme® with 69% yield in the solvent EtOH, 2 hours for the 48% chymosin and 40% in the respective solvents EtOH and THF demonstrated the effectiveness of the enzymes as biocatalysts. With regard to reuse the PPL was reused in 6 cycles getting the expected compound with considerable income in just 2 cycles. The reaction involving 2-cicloexen-1-one showed good yields these being to PPL 76% Lipozyme® 68% 70% chymosin and papain 74%. The reaction involving the chalcone not present the compound of interest in the solvent EtOH, however in chloroform solvent showed 14% conversion to using Lipozyme® 0.04 g, 40% conversion Lipozyme® in the amount of 0.02 g enzyme, chymosin with 30% conversion in THF solvent and showing better converting enzyme papain 51% proof data was obtained by analysis by GC-MS and FTIR. Biotransformation is a recent innovation, being still little explored in reactions involving addition ault, Michael and presents itself as a viable option with regard to environmental issues.

**Key words:** Lipase, Lipozyme®, Chymosin, Papain, thio-Michael

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	4
2.1. Objetivo Geral.....	4
2.2. Objetivo Específico .....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. Reação de tia-Michael .....	4
3.2. Biocatálise .....	6
3.3. Enzimas .....	8
3.3.1. Lipases .....	11
3.3.2. Peptidases ou Proteases.....	12
3.3.2.1. Quimosina.....	14
3.3.2. 2. Papaína .....	16
3.4. Influência dos solventes.....	17
4. MATERIAIS .....	17
4.1 Catalisadores.....	17
4.2 Reagentes e Solventes .....	18
4.3. Equipamentos.....	18
5. MÉTODOS.....	19
5.1. Sínteses das $\beta$ -tioalcóois utilizando cinemaldeído e tiofenol.....	19
5.2. Estudo da Reutilização do biocatalisador .....	20
5.3. Síntese das $\beta$ -tioacetonas utilizando 2-ciclohexen-1-ona e tiofenol .....	20
5.4. Síntese das $\beta$ -tioacetonas utilizando como reagentes chalcona e tiofenol.....	21

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	22
6.1. Estudo sistemático da obtenção de $\beta$ -tioalcóois com cinemaldeído e tiofenol .....	22
6.1.1. Estudo da obtenção de $\beta$ -tioalcóois de cinemaldeído e tiofenol com a PPL .....	22
6.1.2. Estudo da obtenção de $\beta$ -tioalcóois de cinemaldeído e tiofenol com Lipozyme® ....	25
6.1.3. Estudo do reaproveitamento enzimático .....	29
6.1.4. Estudo da obtenção de $\beta$ -tioalcóois de cinemaldeído e tiofenol com a enzima quimosina .....	30
6.1.5. Estudo da obtenção de $\beta$ -tioalcóois de cinemaldeído e tiofenol com a enzima Papaína .....	34
6.2. Estudo da obtenção de $\beta$ -tioacetonas de 2-ciclohexen-1-ona e tiofenol.....	35
6.3. Estuda da obtenção de $\beta$ -tioacetonas utilizando chalcona e tiofenol .....	36
7. CONCLUSÃO .....	37
8. REFERÊNCIAS .....	40
9. HISTÓRICO.....	45
9.1 Trabalhos publicados em anais de congresso .....	45
10. ANEXOS.....	46



## 1.INTRODUÇÃO

Reações com formação de compostos C-C são um dos pilares na química orgânica<sup>[1]</sup>. Adições conjugadas, tais como a adição de Michael, representam as reações fundamentais em química orgânica sintética voltadas para síntese de compostos contendo a ligação carbono-carbono e carbono-heteroátomos<sup>[2]</sup>. A reação de Michael caracteriza-se quando um nucleófilo reage com um composto carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado. Diversos são os tipos de nucleófilos que podem ser utilizados para tal reação, sendo esta vastamente utilizada para a formação de ligações entre carbono e diversos átomos<sup>[3]</sup>.

Dentre os diversos tipos de nucleófilos, podemos citar a reação de tia-Michael a qual envolve o átomo de enxofre como nucleófilo da reação. Reações que resultem na formação da ligação C-S são muito importantes, pois tal ligação é encontrada em diversos compostos que apresentam alguma ação antibiótica, antimicrobiana, anticancerígena, analgésica, anti-inflamatória, antipsicotrópica ou até mesmo anti HIV<sup>[4]</sup>.

A reação de tia-Michael surge como uma das mais importantes metodologias para se obter a ligação C-S. Esta também apresenta uma vasta aplicação sintética para (i) proteção quimiosseletiva da dupla ligação em compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados<sup>[5]</sup>, (ii) para gerar enolatos a partir dos compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados<sup>[6]</sup> e (iii) realizar a síntese de medicamentos importantes como Diltiazem<sup>[7]</sup>.

Nesse contexto, muitos sistemas catalíticos têm sido desenvolvidos para a adição de tióis à compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados, dentre estes inclui-se os ácidos de Lewis<sup>[8, 9]</sup>, suportes sólidos<sup>[10, 11]</sup> e líquidos iônicos<sup>[12, 13]</sup>. No entanto, esses sistemas são limitados decorrentes dos tempos de reação longos, condições relativamente severas, o uso de catalisadores caros ou não comerciais, e os rendimentos relativamente baixos de produtos<sup>[14]</sup>.

Frequentemente a reação de tia-Michael pode necessitar da ativação tanto do acceptor de Michael (composto  $\alpha,\beta$ -insaturado) quanto do nucleófilo. No tocante ao nucleófilo esta ativação pode ser realizada através da desprotonação do mesmo. Já no que se refere ao acceptor de Michael pode-se utilizar como já explicitado, por exemplo, (i) ácidos de Lewis ou (ii) pela formação de intermediários reacionais decorrentes da reação do grupamento carbonila com organocatalisadores. Para ambos os casos

apresentados à interação do grupamento carbonila com ácidos de Lewis ou com organocatalisadores conferem ao carbono  $\beta$ , quando da formação do intermediário, um aumento de sua densidade de carga, ou seja, o tornando-o mais eletrofílico.

No tocante às reações de tia-Michael que envolvem ácidos de Lewis como catalisadores, muito é descrito na literatura <sup>[15]</sup>, porém diversos também são os empecilhos que impossibilitam o emprego destes como catalisadores nestas reações, dentre os quais é possível citar a questão ambiental. Isto porque geralmente estes ácidos de Lewis são constituídos de átomos de metais.

Tendo em vista esta problemática, muita atenção vem sendo dispensada para a obtenção de organocatalisadores, pois os mesmos não apresentam toxicidade, são facilmente retirados do meio reacional e podem ser empregados não somente uma única vez. Tais princípios estão em pleno acordo com uma filosofia descrita nos anos 90 denominada Química Verde. Dentre o organocatalisador mais citado na literatura está a L-prolina.

A L-prolina é um aminoácido natural, comercializada com o centro assimétrico definido (quiralidade). Entretanto, a forma L é normalmente utilizada em uma grande variedade de reações que podem ser catalisadas através deste simples aminoácido.

Outros pontos a serem salientados no tocante ao emprego da L-prolina como organocatalisador nas reações de Michael são a seletividade presente neste tipo de reação, a estereosseletividade, as quantidades dos catalisadores utilizados (10% mol) e por fim o baixo tempo reacional <sup>[16]</sup>.

Cabe neste ponto ressaltar que poucos são os catalisadores orgânicos empregados nas reações de Michael, principalmente nas reações de tia-Michael e os mais utilizados são os que apresentam em sua estrutura a porção do aminoácido prolina.

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 <sup>[17]</sup>. 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 ordinariamente empregados em reações químicas <sup>[18]</sup>.

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 <sup>[18]</sup>.

Pesquisas na área de promiscuidade biocatalítica tem atraído grande atenção de químicos e bioquímicos e essa nova tendência tende a ascender ainda mais, pois veio de encontro à grande necessidade que é produzir uma infinidade de compostos essenciais à humanidade, buscando rotas ambientalmente corretas.

Quanto aos pontos apresentados e, com o objetivo de introduzir uma inovação no tocante ao uso de uma nova classe de biocatalisadores para reação de tia-Michael, propôs-se a utilização das enzimas PPL (lipase tipo II em estado bruto obtida de pâncreas suíno), a Lipozyme® (lipase imobilizada em resina de troca iônica), quimosina e papaína na síntese das  $\beta$ -tioalcoóis e  $\beta$ -tioacetonas. Pesquisa essa que envolveu diferentes solventes, reagentes e quantidades diferenciadas das enzimas.

A inovação para obtenção destes compostos é a utilização das enzimas, a qual é de fácil obtenção e desempenha um papel catalítico em diversos tipos de reações conforme descrito na literatura e também realizada em nosso laboratório. Além disso, a reação via enzimática é uma grande inovação que está condizendo com a filosofia de Química Verde. Esta prioriza o meio ambiente e processos químicos que não agridam, ou seja, menos agressivos dos que os tradicionais.

A síntese de compostos que possam vir a ser aplicados no combate ao câncer é de suma importância nos dias de hoje. Para tanto, a síntese de ligantes que possam vir a ser utilizados para tal fim cumpre um papel primordial neste intuito. Portanto, com esta finalidade, postulou-se inovar na obtenção seletiva de compostos derivados de  $\beta$ -tioacetonas e  $\beta$ -tioalcoóis que possam ser utilizados como ligantes para a obtenção de novos produtos.

Processos envolvendo enzimas são considerados processos ambientalmente corretos, pois o catalisador é específico, geralmente não produz subprodutos, pode ser reutilizado sem a perda da eficiência por várias vezes e seu descarte não é agressivo ao meio ambiente. Já para o processo via química clássica envolvendo tal metodologia propiciaria a sua aplicação não somente no meio acadêmico como também na indústria tendo em vista o baixo custo para a síntese proposta e a reutilização dos catalisadores, o que tornaria o processo mais barato e viável.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi de utilizar enzimas para sintetizar  $\beta$ -tioalcóois e  $\beta$ -tioacetonas em reações de tia-Michael,

### 2.2. Objetivos Específicos

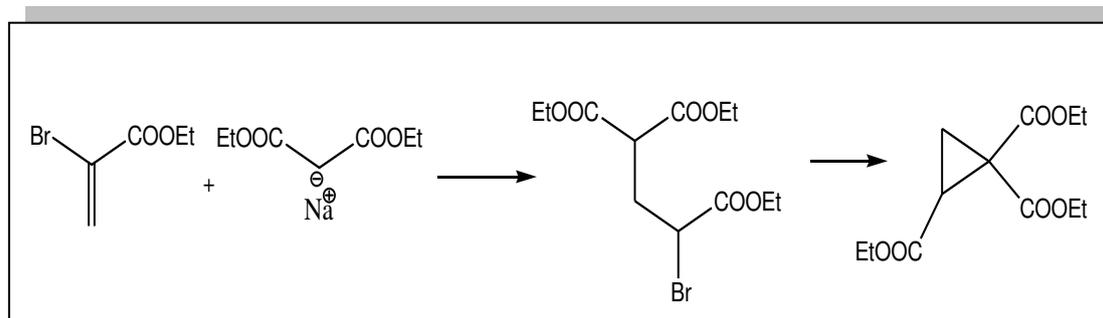
Introdução inovadora de biocatalizadores (enzimas) na reação de tia-Michael.

## 3. REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1. Reação de tia-Michael

A reação de Michael, a qual envolve uma adição de um nucleófilo (doador de Michael) a um eletrófilo (aceptor de Michael), apresentando este uma insaturação entre os carbonos  $\alpha$  e  $\beta$  referente a um grupo retirador de elétrons (exemplos:  $\text{NO}_2$ , cetona, aldeído, éster, etc.). Esta reação apresenta o nome de seu primeiro executor Arthur Michael, o qual executou em 1887 a reação entre o dietil malonato de sódio e o 2-bromoacrilato de etila para a produção de derivados do ciclopropano <sup>[19]</sup> (Esquema 1).

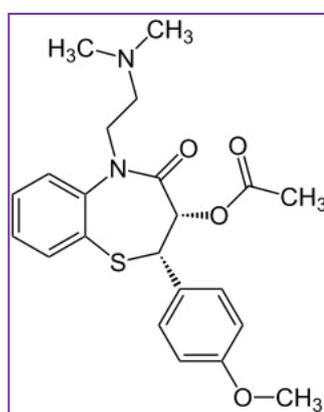
**Esquema 1.** Reação de tia-Michael.



Diversos nucleófilos foram utilizados concomitantemente com muitos aceptores de Michael <sup>[2]</sup>. Dentre estas modificações está a reação denominada tia-Michael a qual 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 para (i) proteção quimiosseletiva da dupla ligação em compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados <sup>[20]</sup>, (ii) para gerar enolatos a partir dos compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados <sup>[6]</sup> e (iii) realizar a síntese de medicamentos importantes como Ditalazem <sup>[7]</sup> (Figura 1). Este medicamento pertence ao grupo das benzotiazepinas, 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 contráctil. Assim, os seus principais efeitos são seu poder vasodilatador e depressor da função cardíaca <sup>[21]</sup>.

A reação de tia-Michael, como dito anteriormente, por muitas vezes necessita da ativação tanto do aceptor de Michael (composto  $\alpha,\beta$ -insaturado) quanto do doador de Michael ou nucleófilo. A ativação mais importante citada na literatura é quanto se trata do aceptor de Michael. Este, quando apresenta o grupamento carbonila, pode ser ativado com organocatalisadores ou através de ácidos de Lewis. A ativação do aceptor de Michael por ácidos de Lewis vem sendo muito estudado e dentre os exemplos de ácidos de Lewis utilizados na reação de tia-Michael podemos citar  $\text{Bi}(\text{OTf})_3$  <sup>[15a]</sup>,  $\text{InBr}_3$  <sup>[15b]</sup>,  $\text{Hf}(\text{OTf})_3$  <sup>[15c]</sup>, alumina em DMSO <sup>[22]</sup>,  $\text{InCl}_3$  <sup>[23]</sup> e  $\text{Cu}(\text{BF}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  <sup>[15d]</sup>.



**Figura 1:** Estrutura do medicamento Ditalazem.

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, à necessidade de condições reacionais anidras, rendimentos dos produtos apenas moderado, utilização de

quantidade estequiométrica do catalisador e estes sais são agressivos ao meio ambiente [24].

Um fator importante apresentado pela reação de tia-Michael são seus produtos. Alguns compostos obtidos através deste tipo de reação são utilizados como precursores de derivados pirazolínicos e isoxazolínicos [25]. Tais compostos são de grande valia, pois estão presentes em diversos compostos que apresentem alguma atividade biológica vincula, como por exemplo, à anti-inflamatórios [26] e inibidores de leucócito elastase humana [27].

Do exposto, fica evidente a necessidade de se obter esses importantes compostos porem com a utilização de novos tipos de catalisadores sem a presença de metais. Atualmente dentre os catalisadores que vem ganhando atenção mundialmente são os biocatalisadores (enzimas, microorganismos e etc.)

### 3.2. Biocatálise

Os microorganismos são responsáveis por uma série de transformações químicas com as quais o ser humano tem contato desde sua primitiva existência, mesmo sem qualquer consciência disto. A preparação de vinhos, queijos, massas de pães e outros produtos empregados no cotidiano do ser humano são exemplos de transformações químicas realizadas por microorganismos [18].

Muito se tem descrito sobre a capacidade dos microorganismos, plantas e animais, como biocatalisadores, entretanto o uso destes sempre esteve presente em nossas vidas cotidianas e atualmente estão envolvidos em processos aprimorados sendo explorados economicamente tanto em escala laboratorial quanto em escala industrial, para a produção de produtos essenciais à humanidade como alimentos, medicamentos entre outros [28].

Uma das primeiras transformações químicas conscientes que empregou microorganismos foi a produção da penicilina pelo fungo *Penicillium notatum* a qual foi empregada como um potente bactericida em 1928 por Alexander Fleming [18].

A biotransformação, que é a alteração química de algumas substâncias utilizando microorganismos ou enzimas isoladas, vem ganhando muita atenção, projetos que focam esta temática vem obtendo espaço no meio científico decorrente de alguns fatores como citado a seguir:

- 1) transformações químicas tradicionais empregam solventes e até mesmo alguns reagentes nocivos ao meio ambiente;
- 2) as biotransformações promovem produtos com alto grau de quimio-, regio- e estereosseletividade em condições reacionais muito brandas;
- 3) reações biocatalisadas são aceleradas na ordem de  $10^8 - 10^9$  do que as mesmas reações catalisadas quimicamente;
- 4) os catalisadores empregados em biotransformações são biodegradáveis.

No tocante à questão ambiental, as biotransformações estão inseridas no contexto de uma nova filosofia denominada Química Verde. Esta pode ser definida como a utilização de técnicas químicas e metodologias que reduzam ou eliminem os usos solventes, reagentes ou a geração de produtos e subprodutos que são nocivos à saúde humana ou ao ambiente <sup>[18]</sup>.

A química verde para a síntese química aborda os desafios futuros em trabalhar com processos e produtos químicos inventando novas reações que possam maximizar os produtos desejados e minimizar subprodutos, concepção de novos esquemas sintéticos que possam simplificar as operações em produções químicas, buscando soluções verdes inerentemente ambiental e ecologicamente benignas <sup>[1]</sup>.

Sabe-se, que a área da química é responsável por uma grande parcela da contaminação ambiental atual. Fica, portanto, evidente que o químico deve procurar empregar cada vez mais esta tal filosofia em seu cotidiano para produzir o composto de seu interesse e não agravar mais o processo de contaminação já existente no planeta.

Nesse sentido os biocatalisadores surgem como uma nova tendência na área da química moderna.

Segundo Aires-Barros <sup>[29]</sup> para a realização da biocatálise, é necessário um planejamento levando em conta algumas etapas, sendo que, uma vez identificada a matéria prima mais adequada para substrato da bioconversão pretendida, deve selecionar o biocatalisador que apresente níveis adequados de atividade catalítica, seletividade e estabilidade para operar nas condições selecionadas de temperatura, força iônica, pH e natureza da solução tampão, concentração de substrato e produto e ainda na eventual presença de solventes orgânicos.

A biocatálise é uma ferramenta importante na síntese orgânica, especialmente na obtenção de moléculas quirais por sínteses assimétricas ou por resolução de racematos. O procedimento mais comumente utilizado é feito através de células totais de

microrganismos cultivados em meios apropriados, onde todo o maquinário enzimático está disponível, o que pode gerar uma mistura de produtos biotransformados <sup>[30]</sup>.

O progresso no uso de enzimas e/ou células integrais na Química Orgânica Sintética foi relativamente lento até os anos 50, quando o uso de microrganismos para modificação de núcleos estereoidais foi estudado em laboratórios industriais e acadêmicos <sup>[31]</sup>.

Entretanto o interesse por biocatálise tem crescido nas últimas décadas principalmente em relação às enzimas isto porque estas são catalisadores altamente seletivos que podem executar eficientes modificações químicas de substratos em meios não aquosos e não necessitam de cofatores na reação <sup>[32]</sup>.

Nesse enfoque, a biocatálise tem recebido grande atenção como uma ferramenta eficaz e verde para a síntese de produtos farmacêuticos, produtos químicos, agrícolas e intermediários <sup>[1]</sup>.

### 3.3. Enzimas

Foi somente no final do século XIX que surgiram as primeiras evidências científicas de que os microrganismos possuem enzimas capazes de catalisar reações químicas. Assim sendo, Eduard Buchner recebeu o prêmio Nobel de química em 1907 por ter descrito o processo de fermentação na ausência de células integras <sup>[33]</sup>.

As enzimas são proteínas naturais responsáveis por catalisar reações químicas que ocorre 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 <sup>[34]</sup>. Elas são formadas por subunidades de aminoácidos e possuem em sua estrutura grupos polares tais como COOH, OH, NH<sub>2</sub>, SH e CONH<sub>2</sub>. 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 <sup>[35]</sup>.

Fatibello-Filho e Vieira <sup>[36]</sup> descreve que no processo de ação das enzimas, há um centro ativo, local onde se processam as reações com determinados substratos. Esse centro ativo é geralmente constituído de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia de proteína e um grupo não-protéico, sendo responsável pela atividade biológica da enzima. Algumas enzimas dependem da sua própria estrutura protéica (apoenzima) para

exercer atividade, enquanto outras necessitam também de um ou mais componentes não proteicos chamados de cofatores. Os autores citam que esses cofatores podem ser íons metálicos ou moléculas orgânicas denominadas de coenzimas, sendo que muitas enzimas dependem de ambos. Outras enzimas possuem um grupo prostético que é similar ao cofator, mas está firmemente ligado à apoenzima. O complexo cataliticamente ativo enzima-cofator é denominado de haloenzima.

As razões pelo quais as enzimas são amplamente empregadas em síntese estereosseletivas são inúmeras. Elas 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 1mol para os catalisadores químicos <sup>[34]</sup>.

Em 1961 a Comissão para enzimas (Enzyme Commission – EC) da União Internacional de Bioquímica (IUB), estabeleceu uma classificação e dividiu em seis classes, de acordo com a reação catalisada <sup>[37]</sup>. São elas:

- 1º 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.
- 2º Transferases: São enzimas que intervêm em reações de transferência de diversos grupos funcionais, como aldeído, cetona, acila, amina, carboxila, etc.
- 3º Hidrolases: São enzimas que catalisam reações de hidrólise. A extensão de grupos hidrolisáveis é muito grande, e incluem ésteres, amidas, peptídeos e outras funções que contem grupos C-N, anidridos e muitos outros
- 4º 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 Dehidratases e as Descarboxilases.
- 5º Isomerasas: Catalisam diversos tipos de isomerização, incluindo a racemização.
- 6º Ligases: São enzimas que catalisam reações de formação e novas moléculas a partir de duas já existentes. Nesta classe são denominadas freqüentemente sintetases, que produzem a formação C-O, C-S e C-N.

Sendo que as oxidorrredutases e as hidrolases são as mais empregadas em síntese na área de catálise enzimática.

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

A extraordinária seletividade das enzimas passou a ser explorada de forma cada vez mais intensa, onde as características mais importantes são:

- Quimiosseletividade - atuam sobre um determinado grupamento químico.
- 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.
- Enantiosseletividade - as enzimas são feitas de L-aminoácidos e, portanto, são catalisadores quirais. Como consequência, qualquer tipo de quiralidade presentena molécula do substrato é reconhecida na formação do complexo enzima substrato<sup>[38]</sup>.

Entre as teorias desenvolvidas para explicar a catálise enzimática, um dos modelos mais ilustrativos continua sendo a clássica hipótese “chave-fechadura”, desenvolvida por Fisher (1894), todavia, este modelo falha ao não explicar porque muitas enzimas podem converter não apenas substratos naturais, mas também compostos não naturais possuindo algumas vezes estruturas bem distintas<sup>[35]</sup>.

A regra de três pontos foi outra teoria criada por A. G. Ogston (1948) para explicar a enantiosseletividade das enzimas<sup>[38]</sup>, considerando-se que a quiralidade é um atributo espacial, para que a enantiosseletividade seja máxima, o substrato precisa estar firmemente posicionado em três dimensões no sitio enzimático. Para tal é necessário que existam pelo menos três pontos de ligação entre o substrato e o sitio ativo da enzima<sup>[37]</sup>.

Em 1958 Koshland propôs o modelo do ajuste induzido para explicar o poder catalítico e especificidade apresentada por enzimas. Segundo essa teoria, em alguns casos, o sítio ativo adota a conformação idônea só em presença do substrato e a união do substrato ao sítio ativo da enzima, desencadeia uma troca conformacional (arranjo espacial dos grupamentos R dos aminoácidos) que dá lugar a formação do produto<sup>[38]</sup>.

Na tentativa de explicar esse fenômeno Dewar postulou uma teoria conhecida como “teoria da desolvatação”, quando o substrato entra no sítio ativo da enzima, esta

expulsa todas as moléculas de água presentes, sendo que num ambiente anidro as reações ocorrem mais facilmente, levando a um aumento da velocidade da reação [35].

A teoria apresentada anteriormente foi estendida à outra sendo esta “teoria da solvatação-substituição”. Essa se baseia no fato de que a enzima não poderia simplesmente expulsar todas as moléculas de água, pois esse processo seria energeticamente desfavorável, neste caso as moléculas de água seriam acomodadas em outras partes da enzima liberando os possíveis substratos hidrofóbicos e o sítio hidrofóbico das enzimas, favorecendo a formação do complexo enzima-substrato [35].

Tendo em vista esse crescente interesse nas enzimas os que mais se destacam entre as maiores empresas produtoras de enzimas está a Amano Pharmaceuticals (Japão), Novozyme (Dinamarca), Genencor International (USA), Unilever (Holanda), Biocatalysts (Inglaterra) e MeitoSankyo (Japão) [39].

Atualmente as enzimas estão envolvidas em inúmeros processos entre eles os que mais as utilizam são na área alimentícia na produção de alimentos e bebidas, no processamento de fibras têxteis, na indústria de polpa e papel, na produção de etanol, em medicamentos e diagnósticos, na indústria de cosméticos e como o foco deste trabalho na síntese orgânica [28].

Dentre as enzimas a mais utilizada na literatura de síntese de química orgânica por apresentar melhores resultados e por não necessitar de cofatores são as lipases, que catalisa a hidrólise de ésteres de ácidos carboxílicos em meio aquoso ou a reação inversa em solventes orgânicos [40].

### 3.3.1. Lipases

Lipases (hidrolases de ésteres de triacilglicerol, EC 3.1.1.3) são enzimas ubíquas que podem catalisar a hidrólise de gorduras e óleos [41]. Elas são muito utilizadas devido à sua versatilidade catalítica, disponibilidade comercial e baixo custo, além de não requererem cofatores [35].

Os estudos de raio-X apresentaram que a estrutura tridimensional das lipases de eucariotos e procariotos apresenta um padrão conformacional comum, denominado de conformação  $\alpha,\beta$ -hidrolase, composto de uma sequência de  $\alpha$ -hélices e folhas  $\beta$ -pregueadas [41].

Este grupo de enzimas é uma ferramenta poderosa para catalisar não só a hidrólise, mas 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 este tipo de catalisadores <sup>[41]</sup>, sendo também as enzimas mais empregadas nos processos biocatalíticos.

As lipases têm recebido uma grande atenção como biocatalisadores industriais, incluindo áreas 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 <sup>[40]</sup>.

A estrutura tridimensional da lipase fúngica de *Rhizomucor miehei* e da lipase pancreática (PPL) 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 <sup>[42]</sup> sendo que a PPL não necessita de cofatores, fato esse que a torna mais atrativa, pois os mesmos são de alto custo.

A Lipozyme® é uma lipase imobilizada em resina de troca catiônica (triacilglicerolhidrolases, CE 3.1.1.3; Lipozyme IM-77, 7,7 Baun / g) obtida de *Rhizomucor miehei* imobilizada pela Novozyme <sup>[43]</sup>.

Nesse presente trabalho a preferência foi para a lipase de pâncreas de suíno em estado bruto (PPL), a qual é uma mistura de várias proteínas principalmente lipases e esterases <sup>[44]</sup> e a Liposyme® (lipase imobilizada em resina de troca catiônica) obtida de *Rhizomucor miehei* com o intuito de desenvolver catalisadores enzimáticos para a reação de tia-Michael no desenvolvimento de  $\beta$ - tialcoóis e de  $\beta$ - tiocetonas.

### 3.3.2. Peptidases ou Proteases

As peptidases ou proteases são uma classe única se enzimas que catalisam a hidrólise das proteínas através da clivagem das ligações peptídicas. As enzimas proteolíticas sintetizadas por microrganismos tornaram-se atraentes para pesquisas devidas sua ampla aplicação nas diferentes áreas da indústria e medicina <sup>[28]</sup>.

Na nomenclatura internacional de classificação de enzimas (EC), as peptidases pertencem à classe 3 e subclasse 3.4, que ainda está dividida em dois grandes grupos: as exopeptidases e as endopeptidases. Exoproteases foram diferenciadas de acordo com a sua especificidade de substrato, como aminopeptidases, que são capazes de clivar os péptidos do terminal N, e carboxipeptidases, que degradam os péptidos no terminal C. Endoproteases são classificados de acordo com seu mecanismo catalítico, o que implica especificidade no sítio ativo da enzima <sup>[45]</sup>.

A base de dados MEROPS <sup>[46]</sup> (<http://merops.sanger.ac.uk/>), considera sete famílias de peptidases: aspártico, cisteína, ácido glutâmico, metalo, asparagina, serina e treonina, nas plantas, cinco classes de endoproteases foram descritos: serina, cisteína, aspártico, treonina e metalo. Assim as peptidases constituem um grupo importante de enzimas industriais atualmente em utilização, sendo utilizado em indústrias alimentares, de detergente, mais recentemente, no processamento do couro e como agentes terapêuticos <sup>[47]</sup>.

A pesquisa de López et al. (2010) <sup>[45]</sup> investiga a protease de Leishmania para o desenvolvimento de novos fármacos, pois nota-se que estas enzimas desempenham importantes funções na fisiologia destes organismos, bem como na patologia por eles causada e que a inibição destas enzimas por inibidores específicos pode constituir uma importante estratégia para a produção de potentes fármacos.

Em seu trabalho Suzuki et al.(2006) <sup>[48]</sup>, pesquisou sobre o bloqueio dos alérgenos como inibidores de protease onde em estes reduziram as respostas alérgicas nos casos de rinite alérgica e outras doenças alérgicas. As doenças alérgicas, como rinite alérgica, são causadas pelo excesso de produção de anticorpos IgE para vários alérgenos, a pesquisa se desenvolveu pois muitos alérgenos relatados são as proteases que são cisteína, serina, ácido aspártico (ácido) proteases e metaloproteases, assim a utilização da conjugação de E64 inibidor de protease de cisteína inibe a resposta de IgE para os alérgenos.

Proteases ocupa o primeiro lugar no mercado mundial de enzimas, estimado em EUA \$ 3 bilhões, já que estas desempenham um papel importante na área de biotecnologia, dadas as propriedades das mudanças físicas, químicas, biológicas e imunológicas das proteínas sendo que a hidrólise de proteínas é realizada para melhoria das características nutricionais, retardando deterioração, de diferentes propriedades funcionais <sup>[47]</sup>.

Dentre as peptidases as mais utilizadas no setor industrial são a quimosina principalmente para a fabricação de queijos e a papaína como amaciante de carne [49].

Ainda não se encontra relatos do uso das peptidases ou proteases como biocatalizadores em reações químicas de tia-Michael, sendo que esta pesquisa iniciou-se em nosso laboratório de materiais híbridos (LMH) na Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) no ano de 2010 com Ana Silva Lima [50].

### 3.3.2.1. Quimosina

A quimosina (EC 3.4.23.4), também conhecida como renina, é um aspartil protease encontrada no abomasso (quarto estômago dos ruminantes) de bezerros lactantes ou de outros ruminantes jovens [51], é secretada na sua forma natural, como um precursor inativo, proquimosina, que é irreversivelmente convertida em quimosina ativa através de proteólise limitada [52].

É a enzima preferida para produção de queijo, sendo que o papel desta enzima na digestão é o de coagular o leite ingerido e produzir uma massa semilíquida aumentando o tempo de permanência do leite no organismo e permitindo a ação das enzimas proteolíticas [53]. A indústria dos laticínios utiliza renina microbiana produzida a partir de fontes de fungos, especialmente *Rhizomucor pusillus*, *Rhizomucor miehei*, *Endothica parasitica*, *Aspergillus oryzae*, e *Irpex lactis*. Mais da metade da produção mundial de queijo baseia-se coalho microbiano. No entanto, a quimosina de animais, o qual dá um sabor característico ao queijo nativo, continua a aumentar uma vez que existem problemas associados com queijos fabricados a partir de renina microbiana [54].

A engenharia de microrganismos modificados geneticamente pela técnica de DNA recombinante foi realizada com a introdução do gene proquimosina de bovídeos, onde o mesmo foi expresso na bactéria *Escherichia coli* K2, esta foi a primeira enzima de DNA recombinante aprovada pelo FDA para o uso em alimentos nos Estados Unidos [28].

Bioquimicamente é uma proteína com cadeia polipeptídica única de 323 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 35600 Da [55].

Há muito que se sabe que a quimosina é segregada como um zimogénio inativo chamado proquimosina, que possui um peso molecular de 40777 Da, cujo estado inativo é mantido pelo propeptídeo N-terminal. 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 <sup>[54]</sup>.

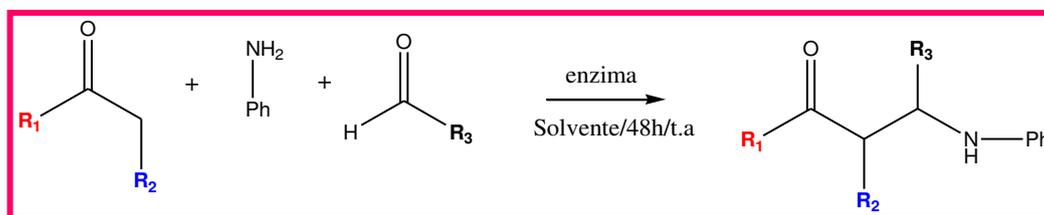
A presença desse aminoácidos garante uma maior afinidade da quimosina A pela caseína k devido a uma estabilização adicional eletrostática adicional do complexo caseína-k-quimosina, e uma maior estabilidade da quimosina B em pH baixos <sup>[56]</sup>.

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 <sup>[57]</sup>.

Segundo a revista Food Ingredients Brasil (2011) <sup>[49]</sup> essa enzima é uma proteinase ácida que é um subproduto tradicional da indústria láctea e bovina, sendo que mesmo antes da disseminação da encefalopatia espongiforme bovina (BSE) e sua forma humana CID, o fornecimento da enzima quimosina de abomaso de bezerro pela indústria da carne era imprevisível e insuficiente para atender a demanda global da indústria de queijo, o que contribuiu segundo a mesma revista para a utilização de alternativas microbiais produzidas pela indústria de enzimas alimentícias que vão desde proteinases ácidas fúngicas (principalmente a partir de *Rhizomucor miehei* até a quimosina de bezerro produzida por tecnologia de clonagem de genes <sup>[49]</sup>.

Silva <sup>[50]</sup>, integrante do laboratório LMH, realizou a primeira síntese utilizando-se quimosina como catalisador aplicando esta enzima como biocatalisador na reação de Mannich obtendo bons resultados. Em sua pesquisa Silva apresentou a síntese dos compostos  $\beta$ -aminocetônicos (Esquema 2).

**Esquema 2:** Síntese de compostos  $\beta$ -aminocetônicos.



Os resultados para a quimosina variaram entre 43 e 80% de rendimento. Na utilização dos reagentes acetofenona e benzaldeído com solvente DMSO/H<sub>2</sub>O (50% v/v) o rendimento foi de 60%, em ciclohexanona e formaldeído em DMSO apresentou o

mesmo rendimento de 60%, já em ciclohexanona e formaldeído em THF apresentou o melhor rendimento sendo este de 80% e com ciclohexanona e benzaldeído apresentou o menor rendimento sendo este de 43%.

### 3.3.2.2. Papaína

A papaína (E.C. 3.4.22.2) é uma enzima proteolítica com massa molecular de 23406 Da, a qual possui uma cadeia de polipeptídeos de 212 aminoácidos. Sua importância comercial deve-se aos variados usos nas indústrias têxteis, farmacêutica, cosmética e alimentícia <sup>[58]</sup>.

Na indústria alimentícia, destaca-se sua ação como amaciante de carnes, agindo nas fibras musculares e nos componentes do tecido conectivo e na indústria de bebidas é usada para hidrolisar as proteínas de alto peso molecular na clarificação da cerveja, evitando a turbidez deste produto durante seu armazenamento e refrigeração prolongada <sup>[49]</sup>.

O látex obtido de frutos verdes do mamoeiro (*Carica papaya*) corresponde a uma mistura de enzimas proteolíticas que incluem papaína, quimopapaína A e B (EC 3.4.22.6), papaína endopeptidase III, papaína endopeptidase IV, e papaína endopeptidase ômega <sup>[59]</sup>.

A papaína é muito utilizada no tratamento de feridas, pois a mesma trata-se de uma mistura complexa de enzimas proteolíticas e peroxidases, que causam a proteólise, degradação de proteínas em aminoácidos, do tecido desvitalizado e da necrose, sem alterar o tecido sadio, devido a uma antiprotease plasmática a  $\alpha$ 1-antitripsina, uma globulina humana, presente somente no tecido sadio que inativa as proteases, impedindo a degradação do tecido sadio <sup>[59]</sup>.

A papaína é solúvel em água e glicerol e pouco solúvel em etanol, éter e clorofórmio é inativa ao reagir com agentes oxidantes como o ferro, oxigênio, derivados de iodo, água oxigenada e nitrato de prata <sup>[45]</sup>, esses fatos explicam os rendimentos consideráveis das reações deste trabalho com esta enzima.

### 3.4. Influência do solvente

Em solventes orgânicos anidros de alta polaridade, as enzimas permanecem cineticamente aprisionadas a sua conformação nativa <sup>[60]</sup>. Já em solventes orgânicos de baixa constante dielétrica proporciona um aumento nas interações eletrostáticas dos resíduos carregados das proteínas o que causa diminuição da flexibilidade interna, tornando as enzimas menos ativas e preservando a integridade estrutural da proteína <sup>[61]</sup>.

As propriedades dos solventes como polaridade ( $1/\epsilon$ ), hidrofobicidade (geralmente determinada como  $\log P$ <sup>[1]</sup>), geometria molecular e habilidade de solvatação são essenciais à biocatálise em meio orgânico. No entanto, não existem correlações de caráter geral entre essas propriedades e a atividade e estabilidade enzimática. O efeito dos solventes é distinto para cada enzima. Enquanto lipases são mais estáveis em solventes hidrofóbicos ( $\log P > 2$ ), a quimotripsina é mais estável em solventes relativamente hidrofílicos e não foi notada nenhuma correlação entre a atividade da polifenol oxidase e a hidrofobicidade de solventes desde que a atividade de água no meio tivesse sido controlada <sup>[62]</sup>.

Apesar das numerosas exceções, o parâmetro Log P é o que apresenta melhor correlação com a atividade de enzimas e, geralmente, as enzimas são mais estáveis em solventes com caráter hidrofóbico.

A forma como os solventes afetam a atividade enzimática e a enantiosseletividade ainda não é bem compreendida e as hipóteses sugeridas para explicar esse fenômeno apresentam discrepâncias entre si <sup>[63]</sup>. Pode-se observar nos trabalhos que exploram esse tema a preocupação em salientar que os resultados alcançados são restritos aos sistemas estudados, evitando-se generalizações.

## 4. MATERIAIS

### 4.1. Catalisadores

Os biocatalisadores utilizados para obtenção dos  $\beta$ -tioalcoóis e  $\beta$ -tioacetonas foram a lipase tipo II em estado bruto obtida de pâncreas suíno (PPL) (Sigma-Aldrich),

---

<sup>1</sup>Log P é definido como o logaritmo do coeficiente de partição de uma substância em um sistema padrão de duas fases água/1-octanol.

Liposyme® (lipase imobilizada em resina de troca catiônica) obtida de Rhizomucor miehei da Sigma Chemical Company (St. Louis. USA), quimosina obtida de Aspergillus niger var. awamori cedida pela empresa internacional Chr-Hansen e a papaína da empresa INLAB.

#### **4.2. Reagentes e solventes**

Os reagentes empregados neste estudo foram: cinamaldeído (Vetec), tiofenol (Sigma-Aldrich), borohidreto (Sigma-Aldrich), tetrahydrofurano (Vetec), dimetilsulfóxido (Vetec), hexano (Dinâmica), etanol (CRQ), acetato de etila (Vetec), todos com grau de pureza PA. Como secante nas reações foi utilizado o sulfato de sódio (Proquímios) grau de pureza PA. Para separação em coluna cromatográfica foi usada sílica gel PA 70-230 Mesh.

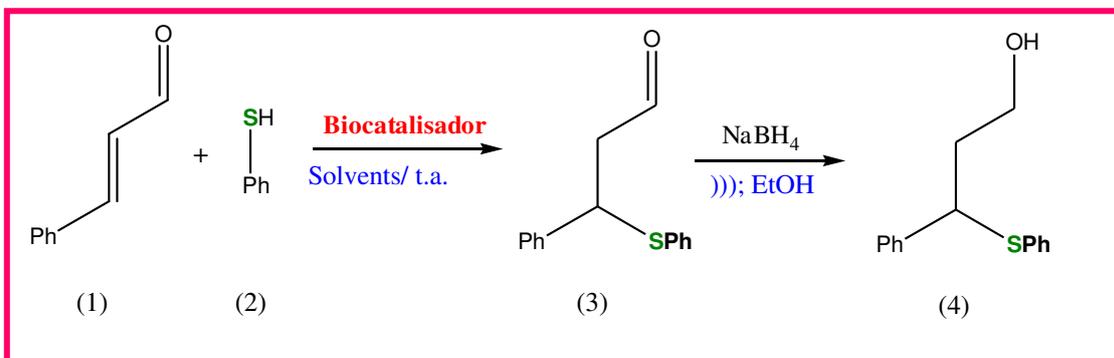
#### **4.3. Equipamentos**

Os compostos obtidos foram caracterizados por RMN e por um cromatógrafo gasoso modelo 431 GC (Varian) com as seguintes condições de operação: temperatura do injetor: 280 °C, temperatura do detector: 280 °C, fluxo do gás de arraste: (He) 80 kPa de pressão, razão de split: splitless 1/25, fluxo na coluna: 1mL/min, temperatura do forno: 250 °C e RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, 300 MHz e 75 MHz, respectivamente, foram registrados no espectrômetro DPX-300 – Bruker

## 5. MÉTODOS

### 5.1. Síntese das $\beta$ -tioalcóois com cinamaldeído e tiofenol.

**Esquema 3.** Descrição geral da biossíntese de  $\beta$ -tioalcóois.



Em um balão de uma boca de 50 mL, adicionou-se 1,0 mL (8,25mmol) do cinamaldeído(1), 1,0 mL (8,18mmol) do tiofenol (2), e quantidades variáveis de biocatalisador em 15,0 mL de solvente. A reação processou-se com agitação por quatro e duas horas dependendo do biocatalisador e à temperatura ambiente. Após esse tempo filtrou-se a reação para retirada do biocatalisador. Para as reações executadas em meio de outros solventes que não o etanol (EtOH) o bruto de reação foi rotoevaporado (3). Somente quando a reação era executada em meio de EtOH processava-se apenas a filtração. Para as reações executadas em outros solventes que não o EtOH e que foram rotoevaporados foram adicionados 10 mL de EtOH. A todas 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 1g de composto tendo como fase móvel uma solução de hexano/acetato de etila 8:2. Este compostofoi 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.

CG/MS [M(%]): 344 (4,1); 135 (15,4); 105 (100)- (Anexo I).

RMN<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT 135- (Anexo II ao IV).

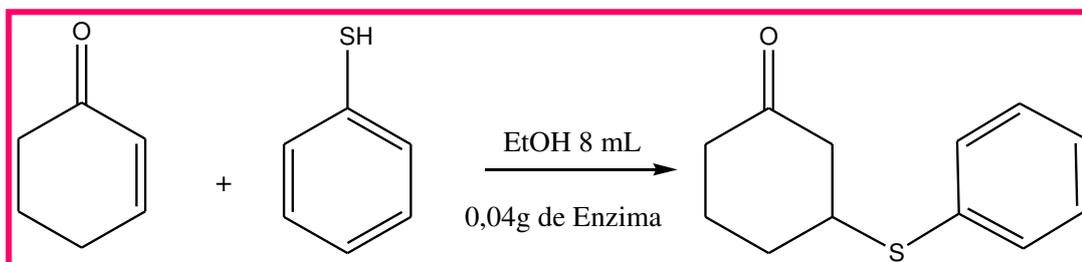
## 5.2. Estudo de Reutilização do biocatalisador

O estudo da reutilização do biocatalisador se processou com a lipase (PPL) nas mesmas condições e em 2 horas. Para 2 g de produto utilizou-se as seguintes quantidades dos reagentes: 1,0 mL de tiofenol, 1,0 mL de cinamaldeído e 0,4 g de enzima lipase (PPL). A enzima foi reutilizada em seis ciclos sendo que em apenas dois ciclos apresentaram rendimentos consideráveis.

No primeiro reaproveitamento obteve-se 0,236 g de enzima onde a reação foi realizada para 1,18 g de produto com as seguintes quantidades de reagentes; 0,7 mL de tiofenol e 0,6 mL de cinamaldeído, com rendimento de 24,4% (0,29 g). Para o segundo reaproveitamento obteve-se 0,174 g de enzima sendo que a reação foi realizada para 0,87g de produto com as seguintes quantidades de reagentes 0,47 mL de tiofenol e 0,45 mL de cinamaldeído, com rendimento de 31,0% (0,27 g). No terceiro reaproveitamento obteve-se 0,095g de enzima onde a reação foi realizada para 0,475 g do produto com as seguintes quantidades de reagentes: 0,4 mL de tiofenol e 0,3 mL de cinamaldeído, com rendimento de 2,9% (0,014 g). No quarto ciclo realizou-se a reação com 0,066 g de enzima para realização de 0,33 do produto de reação, com as seguintes quantidades de reagentes 0,2 mL de tiofenol e 0,2 mL de cinamaldeido, com rendimento de 6,3% (0,021g). O quinto e sexto ciclo não se obteve o composto de interesse esperado.

## 5.3. Síntese das $\beta$ -tioacetonas com 2- ciclohexen-1-ona e tiofenol

**Esquema 4.** Descrição geral da biossíntese de  $\beta$ -tioacetonas com 2- ciclohexen-1-ona e tiofenol.



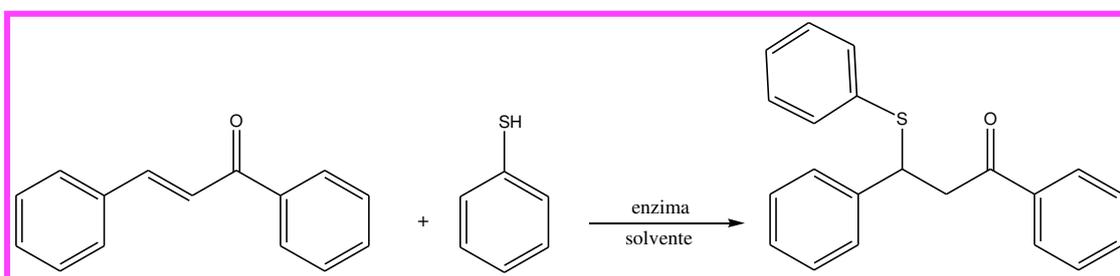
Em um balão de uma boca de 50 mL adicionou-se 0,9 g (9,38mmol) de 2-ciclohexenona, 1,24 mL de tiofenol (12,17 mmol) em 15 mL de EtOH e 0,4 das respectivas enzimas: lipase (PPL), quimosina, Lipozyme® e papaína em 4 horas reacionais.

CG/MS [M(%)]: 206 (100); 97 (85,3) – (Anexo V).

RMN<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT 135- (Anexo VI ao VIII).

#### 5.4. Síntese das $\beta$ -tioacetonas utilizando como reagentes chalcona e tiofenol

**Esquema 5.** Descrição geral da biossíntese de  $\beta$ -tioacetonas utilizando chalcona e tiofenol.



No estudo da síntese de  $\beta$ -tioacetonas utilizando como reagentes chalcona e tiofenol utilizou-se um balão de reação de uma boca de 50 mL, adicionando-se 0,135 g de chalcona (0,65mmol), 0,06 mL de tiofenol (0,58mmol) e 0,04 g das seguintes enzimas lipase (PPL), Lipozyme®, quimosina e papaína, em 2 horas reacionais para 0,2 g de reação, utilizado como solventes o EtOH ou clorofórmio. A reação se procedeu em temperatura ambiente e em rotação com barra magnética.

CG/MS [M(%)]: 207 (64,7); 131 (24,9); 105 (90,2); 77 (100) – (Anexo IX).

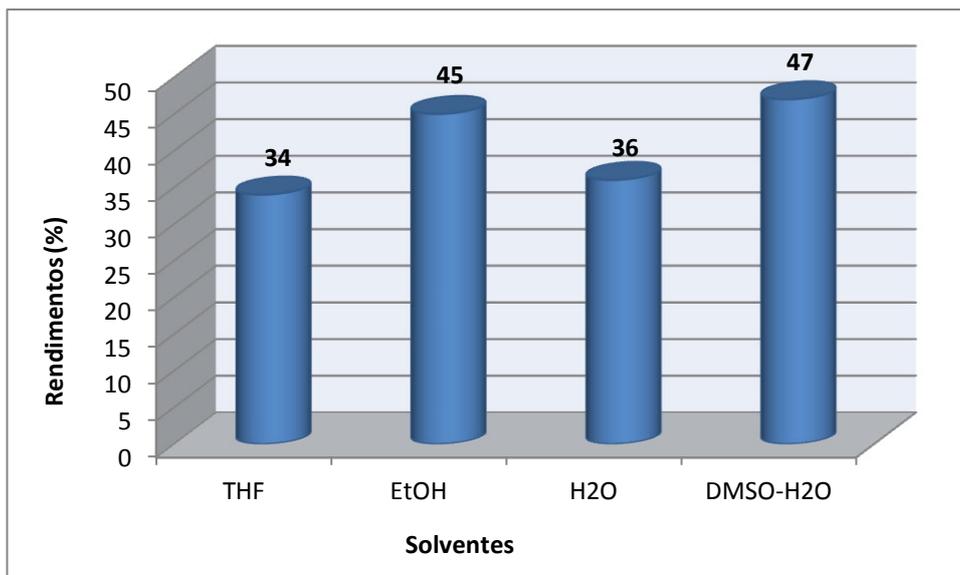
RMN<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT 135- (Anexo X).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1. Estudo sistemático da obtenção de $\beta$ -tioalcóois com cinamaldeído e tiofenol.

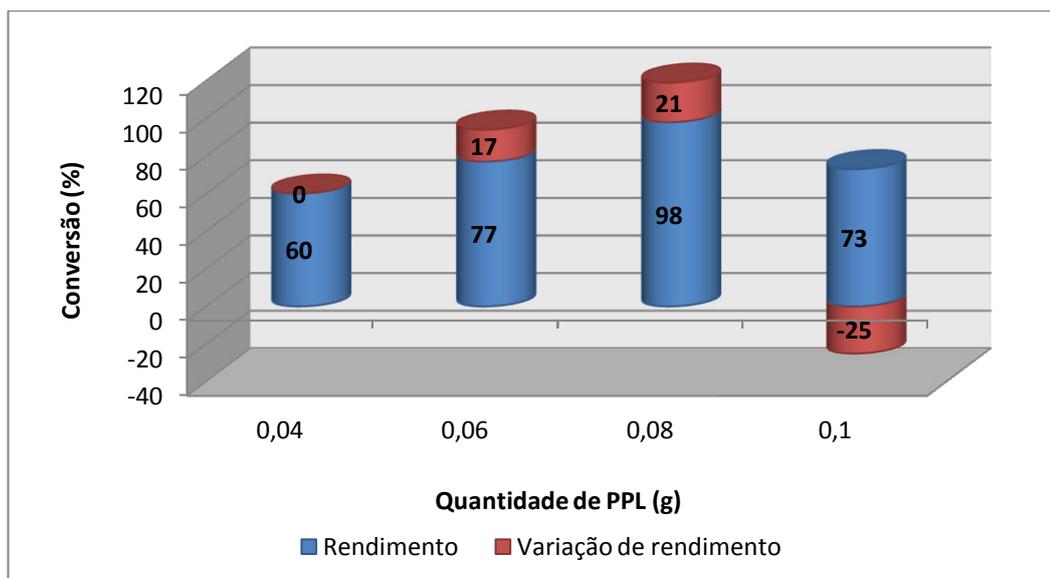
#### 6.1.1. Estudo da obtenção de $\beta$ -tioalcóois com cinamaldeído e tiofenol com lipase (PPL).

Em primeiro lugar, examinou-se a eficiência catalítica de lipase de pâncreas suíno (PPL) em diversos sistemas solventes. Foi testado tetrahidrofurano (THF), etanol (EtOH), água (H<sub>2</sub>O) e uma mistura de 50% v/v de dimetilsulfóxido e água (DMSO/H<sub>2</sub>O). (EtOH constante dielétrica 24,3; THF: constante dielétrica 7,52 ; DMSO constante dielétrica 46,7 e a H<sub>2</sub>O constante dielétrica 78,39) <sup>[64]</sup>. Curiosamente, foi observado que as constantes dielétricas dos solventes apresentaram um efeito notável sobre a reação de tia-Michael biocatalisada (Figura 2). Pôde-se observar uma preferência da atividade catalítica da enzima em solventes com alta constante dielétrica (Figura 2). Verificou-se que os rendimentos mais elevados foram obtidos utilizando o EtOH e DMSO/H<sub>2</sub>O (Figura 2). A reação em água não produziu um bom rendimento do produto desejável, devido à imiscibilidade dos materiais de partida em água. Uma explicação para tal é que a apesar da adição de água possibilitar uma melhor solvatação sob a estrutura da enzima, e assim, ativar seu sítio reacional, esta adição diminui drasticamente a solubilidade dos compostos orgânicos no meio reacional <sup>[50]</sup>. A mistura de DMSO/H<sub>2</sub>O proporcionou melhor rendimento seguida da reação realizada no meio de EtOH. Os correspondentes  $\beta$ -tio-adutos de Michael foram isolados em rendimentos consideráveis sem qualquer cetona protegida como subproduto. Assim, decidiu-se utilizar como solvente padrão o EtOH isto porque o EtOH é um solvente ambientalmente correto.



**Figura 2.** Rendimentos obtidos para as reações de tia-Michael biocatalisadas por PPL.

O efeito da quantidade de enzima na reação tia-Michael foi também investigado. Como mostrado na Figura 3, intentou-se um procedimento reacional utilizando-se 0,2mL de cinamaldeído (1,59 mmol), 0,1 mL de tiofenol (0,98 mmol), 8 mL de EtOH, com variadas quantidades de PPL em 2 horas. Os resultados da conversão estão apresentados na Figura 3.



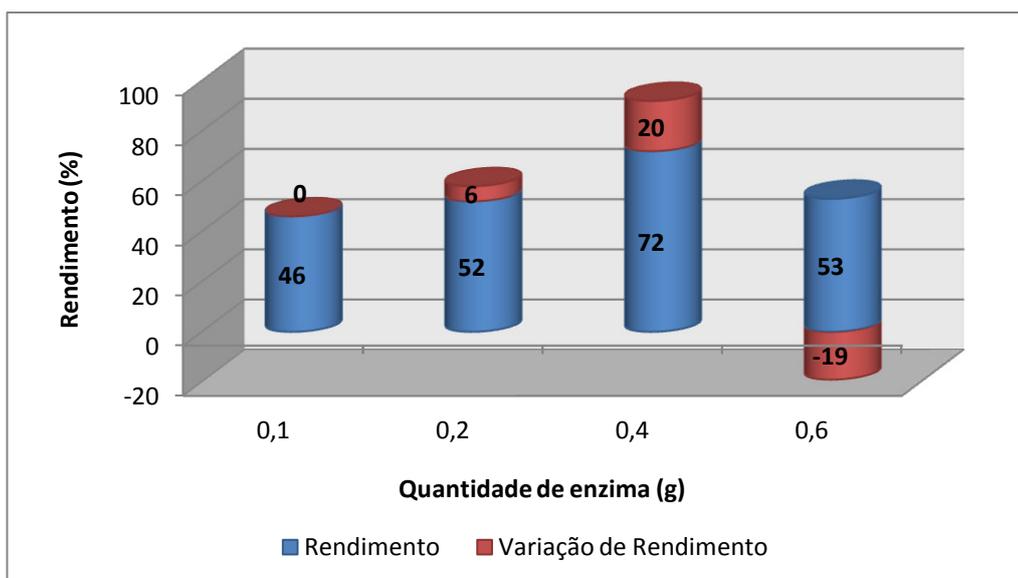
**Figura 3.** Dados da conversão das reações para 0,2 g de produto final.

A maior porcentagem de conversão foi utilizando-se 0,08 g de PPL. É notável que com uma quantidade a mais de enzima na reação (0,1 g) de enzima sofre uma queda diminuindo para 73% de conversão, isso se deve pela formação de subprodutos reacionais, adicionando-se tióis à carbonila. Além disso, quando se utiliza um processo enzimático deve-se levar em conta a atividade enzimática ao longo do tempo. Segundo Bon<sup>[28]</sup> a catálise enzimática é dirigida cineticamente pelo modelo de Michaelis-Menten o qual prediz que o processo enzimático inicia-se conforme uma exponencial, com velocidades reacionais e conversão altíssimas no que tange a interconversão do complexo ativado enzima-substrato a produto, um segundo estágio no qual observa-se um equilíbrio cinético desta mesma conversão e posterior, se assim for possível, uma degradação do produto a outro sub-produto. A primeira fase do processo enzimático denomina-se fase log, e a última denominada fase lag.

Analisando-se os dados apresentados na Figura 3, pode-se observar que o aumento da quantidade enzimática presente no meio reacional até a quantidade de 0,08g proporciona um aumento na porcentagem de conversão. Todavia, ao utilizarmos 0,1g desta mesma enzima pelo mesmo período de tempo, observa-se o decaimento na conversão. Isto pode ser explicado, pois o equilíbrio cinético é atingido mais rapidamente com essa maior quantidade enzimática e, portanto, o produto de interesse é obtido mais rapidamente. Todavia, com o passar do tempo, a fase lag também é mais rapidamente atingida e o composto de interesse consumido diminuindo assim a porcentagem de conversão.

Realizou-se uma nova abordagem para a produção em escala de 0,5 g.

A reação se processou nas mesmas condições apresentadas no procedimento geral de obtenção de  $\beta$ -tioalcoóis alterando-se apenas as quantidades em gramas e não alterando-se a quantidade molar. A análise dos dados indicou que a quantidade de enzima que produz o maior rendimento reacional é 0,2 g (rendimento 98%) sendo que este procedimento não passou a ser padrão pelo fato das outras enzimas não apresentarem melhorias nestas condições. Cumpre informar que com o aumento da quantidade de enzima o rendimento diminuiu. Este está em plena conformidade com a hipótese apresentada anteriormente quanto à cinética reacional (Figura 3).



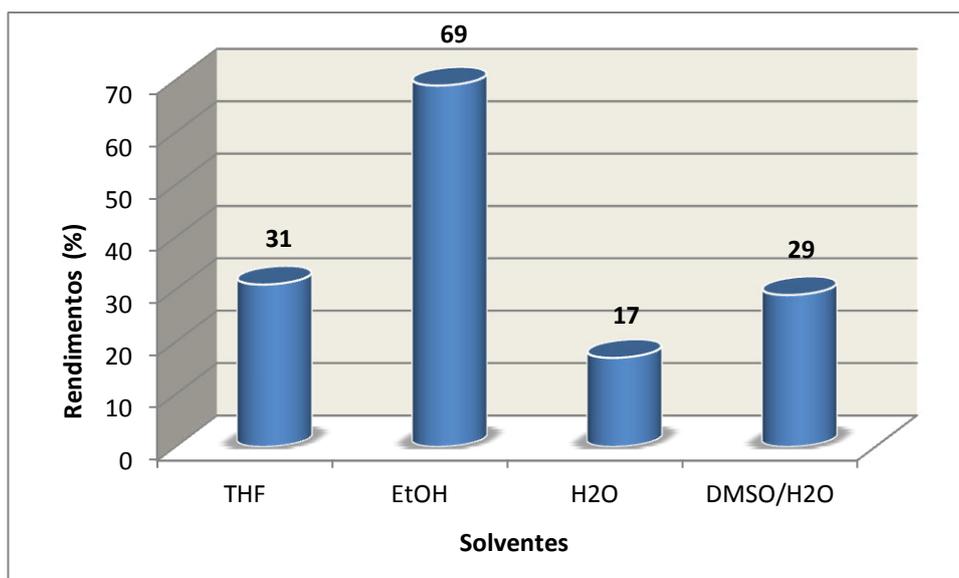
**Figura 4.** Estudo da quantidade de enzima versus rendimentos obtidos para o produto de tia-Michael.

Verificou-se, portanto, que o rendimento mais elevado foi obtido utilizando-se 0,2g para 0,5g de reação final com 98% de rendimento e 0,4 g da PPL para 2g durante 2 horas com 70% de rendimento, todavia a porcentagem de conversão obtida e identificada no cromatógrafo GC/MS para a mesma foi de 94%.

Estas condições foram estabelecidas como uma condição padrão como sendo EtOH como solvente, 2 horas e 0,4 g do biocatalisador para então reproduzi-las com as outras enzimas.

#### **6.1.2. Estudo da obtenção de $\beta$ -tioalcoóis com cinamaldeído e tiofenol com a Lypozime®.**

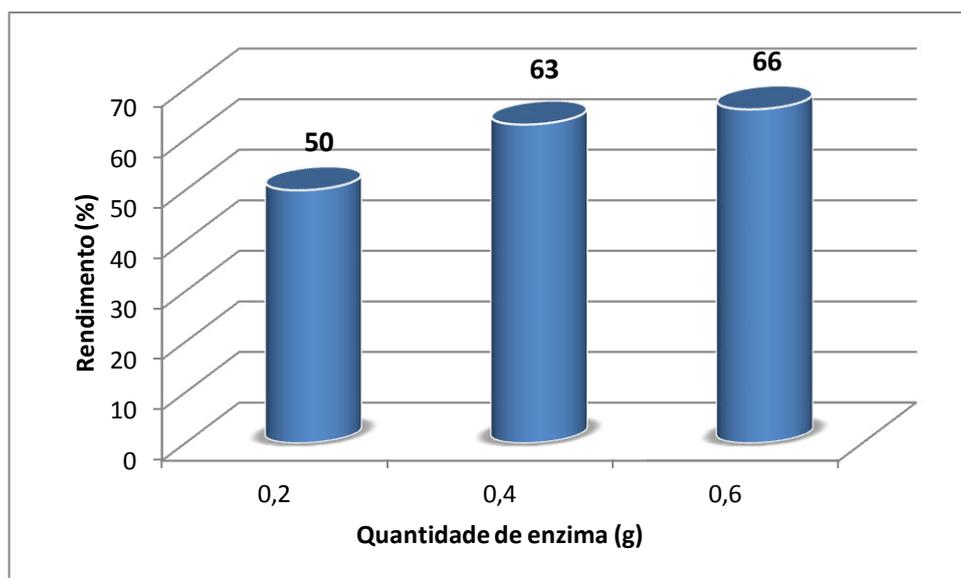
Decidiu-se, para o prosseguimento dos estudos, utilizar uma lipase imobilizada, a Liposyme® na reação de tia-Michael. As reações foram realizadas utilizando o cinamaldeído e 0,1 g de tiofenol e Liposyme® da mesma maneira do que a lipase de pâncreas suíno (PPL) foi usada. O único parâmetro mudado, neste momento, foi o tempo e a concentração de enzima que, quando usado PPL foi de 2 horas com 0,4 g de enzima e, quando empregado Liposyme®, foi utilizado 4 horas a 0,2 g de enzima. Os dados são apresentados na Figura 5.



**Figura 5.** Rendimentos obtidos para a reação de tia-Michael biocatalisada por Liposyme®

Como notado para a PPL, a Liposyme® apresentou o maior rendimento em EtOH conforme apresentado na Figura 5. No entanto, ao contrário do que foi encontrado para a PPL, meios reacionais de H<sub>2</sub>O ou DMSO/H<sub>2</sub>O diminuem drasticamente os rendimentos. Mais uma vez pôde-se verificar a grande influência do efeito solvente na biocatálise. Há também para a Liposyme® a preferência por solventes polares próticos (EtOH). Todavia, outros solventes polares como o DMSO e a água não proporcionaram rendimentos comparáveis com os obtidos em EtOH. Isto porque, no tocante à água, há novamente a insolubilidade dos reagentes neste meio, já no DMSO, além de conter quantidade substancial de água, o mesmo não é um solvente prótico mas sim polar. Todos esses fatores caracterizam a preferência por solventes polares próticos pela Lyposime® como citado anteriormente.

Outro estudo realizado que envolveu a Liposyme® foi à avaliação da quantidade de enzima no meio reacional frente ao rendimento apresentado por esta juntamente com o fator temporal. Neste estudo, decorrente do valor agregado à enzima Liposyme® realizou-se a reação agora em 2 horas em etanol variando-se a quantidade de enzima adicionada no meio reacional. (Figura 6). Na Figura 6, pode-se observar que o melhor resultado no tocante ao rendimento foi obtido com a utilização de 0,6g de enzima (66% de rendimento).



**Figura 6.** Lipozyme® em 2hs de reação com diferentes quantidades de enzima.

Cumpra informar, através da análise das Figuras 5 e 6 que há algumas possibilidades de obtenção do composto utilizando-se a Liposyme® variando-se a quantidade de enzima e o tempo reacional. Esta análise está resumida na Tabela 1.

Analisando-se a Tabela 1, podemos observar que a entrada 1 é a que produziu o maior rendimento, porém em um tempo de 4 horas, o maior tempo realizado para a reação de tia-Michael envolvendo a Liposyme®. Todavia, a entrada 2 já nos revela que a reação contendo a mesma quantidade de enzima, quando comparada com a entrada 1, proporciona um rendimento menor ( $\Delta$ Rendimento de 19 unidades a menos). Todavia o custo necessário para a execução da reação para a entrada 2 foi de R\$ 6,304 enquanto para a entrada 1 foi de R\$ 6,308. Portanto um  $\Delta$ R\$ de 0,004. Neste caso o fator primordial é o valor numérico do rendimento que nos imporia realizarmos esta reação através da metodologia descrita na entrada 1.

Porém, se compararmos a entrada 1 com a entrada 3, a qual foi realizada com 0,4g de Liposyme® porém em um tempo reacional de 2 horas, podemos correlacionar e concluir que a reação descrita na entrada 1 é a mais eficaz no tocante a valores de rendimentos, na qual foi obtido um  $\Delta$ Rendimento de 6 unidades e com custo reacional menor por um fator igual a duas vezes.

Por fim, a comparação entre a entrada 1 e a entrada 4 nos revela que a entrada um mais uma vez é a metodologia mais correta a ser utilizada por ser esta a que envolve um fator de três vezes menos o valor obtido para a entrada 4. Apenas este valor é

suficiente para garantir-nos uma confiabilidade na escolha da metodologia, isto porque os rendimentos são praticamente os mesmos ( $\Delta$ Rendimento = 3 unidades).

**Tabela 1.** Estudo comparativo de custo da produção de  $\beta$ -tioalcóois via biocatálise envolvendo a Liposyme®.

Entrada	Quantidade de enzima (g)	Rendimento (%)	Tempo (h)	Consumo do agitador (W/h)	Valor do KW/h (R\$)	Preço da Enzima (R\$/0,1g)	Custo total da Síntese (R\$)
1	0,2	69	4	5	0,4408	3,15	0,008(Consumo) +6,30 (enzima) Total = 6,308
2	0,2	50	2	5	0,4408	3,15	0,004(Consumo) +6,30 (enzima) Total = 6,304
3	0,4	63	2	5	0,4408	3,15	0,004 (Consumo) +12,6 (enzima) Total =12,604
4	0,6	66	2	5	0,4408	3,15	0,004(Consumo) +18,9 (enzima) Total =18,904

### 6.1.3. Estudo de reaproveitamento enzimático.

Os dados para as reações que envolveram o reaproveitamento estão contidos na Tabela 2:

**TABELA 2.** Dados envolvendo o reaproveitamento da enzima PPL.

<b>Experimento</b>	<b>Quantidade de enzima por ciclo (g)</b>	<b><math>\Delta</math>Reaproveitamento enzimático (g)*</b>	<b>Rend.</b>	<b>Custo da quantidade de enzima na reação<sup>‡</sup></b>	<b>Custo por grama de produto (R\$/g)</b>
<b>1</b>	0,400	-	70% (1,4g)	0,93	<b>0,65</b>
<b>2</b>	0,236	0,164 (-41%)	24,4% (0,29g)	-0,38	<b>1,31</b>
<b>3</b>	0,174	0,062 (-26%)	31,0% (0,27g)	-0,14-0,38 = -0,52	<b>1,93</b>
<b>4</b>	0,095	0,079 (-45%)	2,9% (0,014g)	-0,18-0,52 = -0,70	<b>50,0</b>
<b>5</b>	0,066	0,0029 (-3%)	6,3% (0,021g)	-0,006-0,70 = -0,706	<b>33,6</b>

\*  $\Delta$ Reaproveitamento = Quantidade de enzima obtida – Quantidade de enzima obtida no passo anterior

‡ Custo da lipase = R\$ 233,00/ 100g

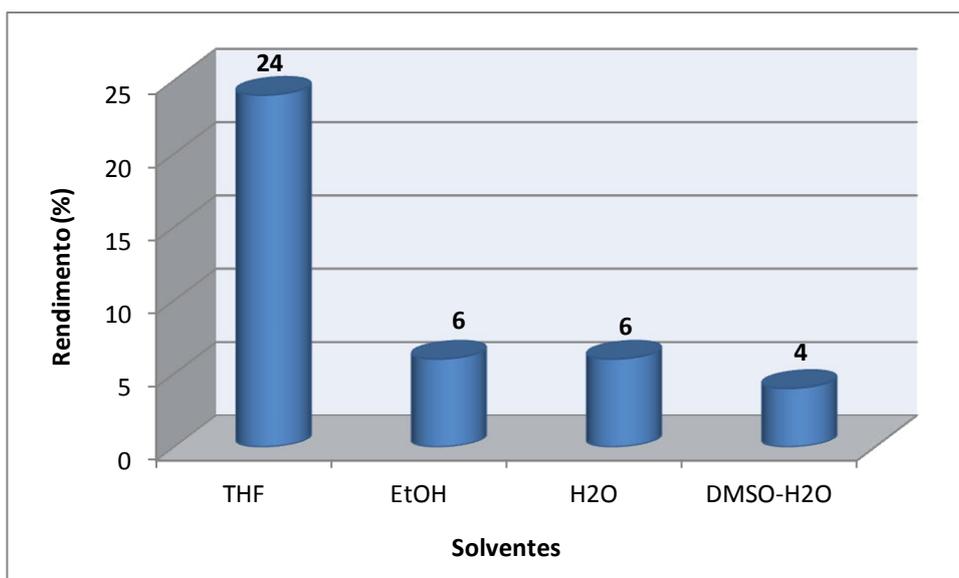
‡ Perda do quantitativo de lipase em reais (R\$) acumulativo

Através dos dados apresentados na Tabela 2, o reaproveitamento apresenta custo total da reação variável. A primeira reação (experimento 1, Tabela 2) apresenta o custo da reação no tocante à quantidade de enzima utilizada e um dado de suma importância que o custo em R\$ para cada grama de composto obtido para os passos. No experimento 1 podemos observar que o custo enzimático, em reais, é de R\$ 0,93, todavia o custo

para cada grama de composto produzido neste experimento, dado este que envolve o rendimento obtido em cada experimento é de R\$ 0,65. Já para o segundo experimento (Tabela 2) o custo com a perda da quantidade de enzima para o primeiro reaproveitamento é de R\$ 0,38 e que o custo de cada grama de composto produzido é de R\$ 1,31. Isto nos indica que há uma perda da capacidade catalítica da enzima na passagem do experimento 1 para o primeiro reaproveitamento além da perda do quantitativo em massa da enzima (-41%, Tabela 2). Todavia, o segundo reaproveitamento (experimento 3, Tabela 2) nos indica que há uma perda no quantitativo enzimático de 26% e que há também uma perda na eficiência catalítica da enzima o que se reflete no custo para a produção de cada grama do produto de interesse (R\$ 1,93). No terceiro reaproveitamento (entrada 4, Tabela 2) podemos observar que há uma perda do quantitativo em massa da enzima (-45%) todavia há também um decréscimo abrupto no rendimento reacional o que indica em um quase inativação da enzima (2,9% rendimento). Estas problemáticas são totalmente transferidas para o custo de produção de cada grama de produto, tornando, assim, o grama de produto mais caro para todos os rendimentos (R\$ 50,0). Por fim, o último ciclo de reaproveitamento também nos gera custos adicionais que tornaria este quarto ciclo economicamente desfavorável.

#### **6.1.4. Estudo da obtenção de $\beta$ -tioalcóois com cinamaldeído e tiofenol com a enzima quimosina.**

A pesquisa envolvendo a quimosina como catalisador em quatro horas reacionais esta representada pela Figura 7.



**Figura 7.** Reação utilizando a quimosina em 4 horas reacionais

A priori, como foi realizada com as enzimas lipase PPL e Lipozyme®, examinou-se a eficiência catalítica de quimosina em diversos sistemas solventes.

Foi testado tetrahydrofurano (THF), etanol (EtOH), água (H<sub>2</sub>O) e uma mistura de 50% v/v de dimetilsulfóxido e água (DMSO/H<sub>2</sub>O). Os rendimentos apresentados para 4 horas de reação com 10% (0,2 g) de quimosina após a purificação via coluna cromatográfica foram baixos ficando 26,7% no solvente THF, 6,2% no solvente EtOH, 6,2% no solvente água e 3,4% na mistura dos solventes DMSO 50%/ H<sub>2</sub>O 50%.

Para tentar melhorar o rendimento decidiu-se aumentar a quantidade de enzima para 60% (0,8 g) de enzima no solvente que melhor obteve rendimento, curiosamente o rendimento abaixou ficando com 15% de rendimento em 4 horas reacionais isso deve-se provavelmente pela adição de tióis à carbonila formando assim subprodutos indesejáveis.

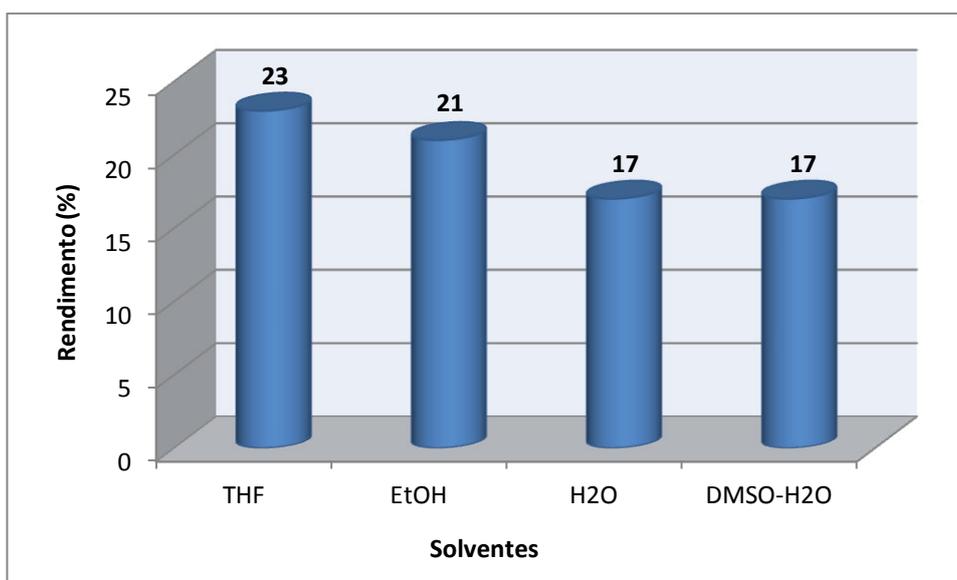
A constante dielétrica é um ponto importante a se observar (EtOH constante dielétrica 24,3; THF: constante dielétrica 7,52 ; DMSO constante dielétrica 46,7 e a H<sub>2</sub>O constante dielétrica 78,39) <sup>[64]</sup>, sendo que foi observado que as constantes dielétricas dos solventes apresentaram um efeito notável sobre a reação de tia-Michael biocatalisada (Figura 7).

Pôde-se observar uma preferência da atividade catalítica da enzima quimosina em solventes com baixa constante dielétrica o que difere grandemente do resultado observado para as enzimas lipase PPL e Lipozyme® onde as mesmas possuem uma

preferência por constantes dielétricas altas. Curiosamente nota-se que no trabalho apresentado por Lima <sup>[50]</sup> que utilizou a quimosina como catalisador na reação de Mannich os melhores rendimentos foram obtidos em THF (80%), confirmando assim a preferência desta enzima para o solvente THF.

A reação em água não produziu um bom rendimento do produto desejável, devido à imiscibilidade dos materiais de partida em água e a alta constante dielétrica. A mistura de DMSO/H<sub>2</sub>O não favoreceu a reação devido provavelmente às suas altas constantes dielétricas.

Para uma otimização do processo reacional passou-se a pesquisar a capacidade catalítica da quimosina utilizando-se o procedimento reacional para a obtenção de 2 g de produto final e 0,2 g de enzima em 2 horas reacionais conforme apresentado pela Figura 8.

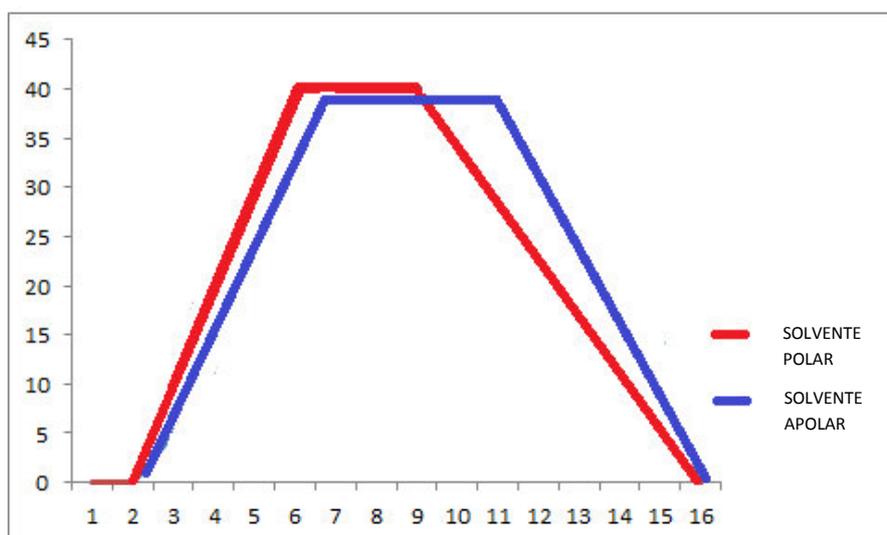


**Figura 8.** Otimização da reação da quimosina utilizando-se 0,2 g de enzima em 2 horas reacionais conforme proposto no procedimento reacional.

Em 2 horas os melhores resultados, utilizando a quimosina como catalisador, foram nos solventes EtOH e no THF, com 21 e 23% de rendimento respectivamente. Confirmando assim a preferência desta enzima em THF.

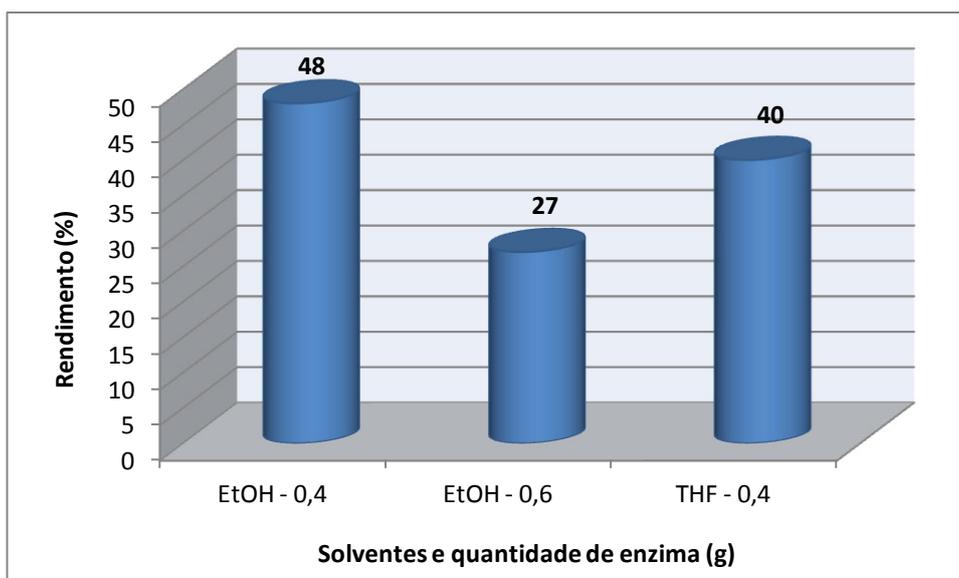
Notavelmente em 2 horas os rendimentos para os solventes DMSO/H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O e EtOH melhoraram os rendimentos apresentando acréscimos de 15, 11 e 13% respectivamente no rendimento. Este fato pode ser explicado pelo modelo anteriormente

citado referente à Michaelis-Menten. A quimosina, em THF, não apresentou alteração no rendimento reacional com a alteração do tempo reacional, indicando assim que, possivelmente esta enzima neste meio reacional atinja o equilíbrio cinético mais tardiamente. Logo, a velocidade de formação do produto (colapso do complexo enzima-substrato) é a mesma referente à decomposição ou degradação do composto final. Já os demais meios reacionais (EtOH, H<sub>2</sub>O e DMSO/H<sub>2</sub>O) que são solventes polares, devem proporcionar uma diminuição tanto da false log quanto da fase de equilíbrio cinético desta enzima. Isto fica evidente, pois ao diminuirmos o tempo reacional para a mesma quantidade de reagentes, em um menor tempo, obtém-se um maior rendimento. Portanto, solventes de alta polaridade aceleram o processo, todavia com o tempo reacional de 4 horas, o processo já se encontra na fase lag (Figura 9).



**Figura 9.** Otimização na quantidade de Quimosina em 2 horas reacionais.

Assim passamos a testar para uma otimização uma quantidade maior de enzima com os solventes que obtiveram melhores resultados sendo estes o EtOH e o THF. Conforme informa a Figura 10.



**Figura 10.** Testes reacionais levando em conta a quantidade enzimática na reação e solventes utilizados.

Na busca por melhorar os rendimentos reacionais da quimosina como catalisador, testou-se também o EtOH com 0,4 g e 0,6 g da enzima proposta juntamente com 0,4 g desta em meio de THF. Todavia, os dados obtidos para o EtOH e THF são muito semelhantes.

#### **6.1.5. Estudo da obtenção de $\beta$ -tioalcóois com cinamaldeído e tiofenol com a enzima Papaína.**

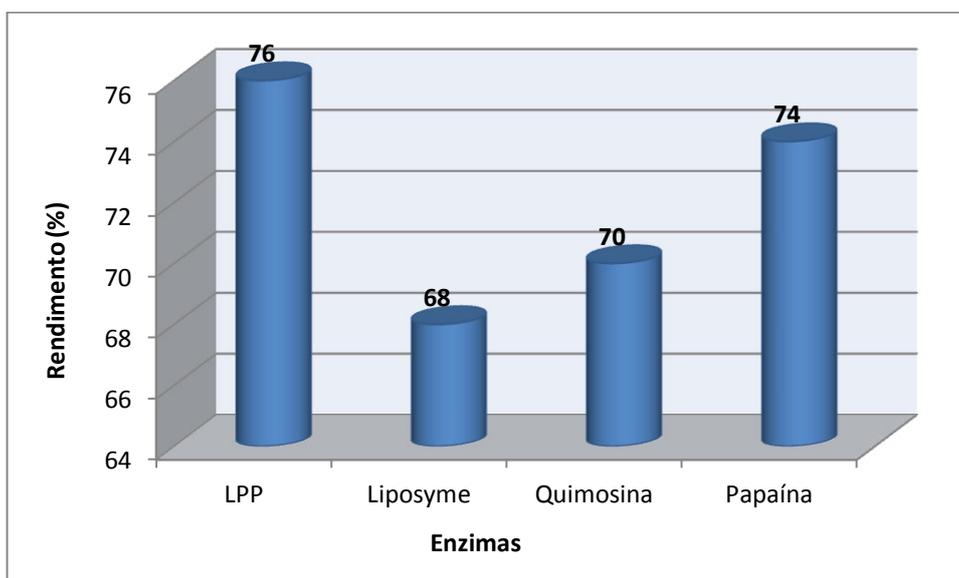
Mesmo a papaína sendo uma protease e desse modo pudesse obter resultados similares ao da quimosina, tal premissa não foi observada. Testou-se esta enzima em meio de EtOH em 2 horas, utilizando-se 0,4 g de enzima, entretanto, não houve a produção do composto de interesse.

Como será apresentado adiante nas reações nas quais se utilizou mesma quantidade de enzima PPL, solvente EtOH, tiofenol juntamente com a 2-cicloexen-1-ona, esta enzima apresentou bons rendimentos.

## 6.2. Estudo sistemático da obtenção de $\beta$ -tioacetonas com 2-cicloexen-1-ona e tiofenol.

Estabelecido os padrões através das reações com cinamaldeído e tiofenol descrita como sendo 0,4 g de todas as enzimas anteriormente testadas, juntamente com o solvente EtOH, procedeu-se a reação agora para a síntese de  $\beta$ -tioacetonas partindo-se do tiofenol e da 2-cicloexen-1-ona por um período de 4 horas.

As reações foram processadas em um balão de reação de 50 mL, onde adicionou-se 0,9 g de 2-cicloexen-1-ona , 1,24 mL de tiofenol e 0,4 das respectivas enzimas: lipase (PPL), quimosina, Lipozyme® e papaína, para 2 g de reação final em 4 horas. Os resultados apresentados foram bons, conforme representado na Figura 11.



**Figura 11.** Estudo de catálise enzimática para a reação envolvendo a 2- cicloexen-1-ona e tiofenol por 4 horas.

A Figura 11 apresenta que todas as reações apresentaram bons rendimentos, sendo que novamente a lipase a mais pronunciada.

Um fato interessante a ser ressaltado é a presença da atividade catalítica apresentada pela papaína. Divergindo com a utilização do cinamaldeídoetiofenol na qual a papaína não apresentou atividade, com o 2-cicloexen-1-ona e tiofenol a mesma forneceu rendimento de 74%.

### 6.3. Estudo da obtenção de $\beta$ -tioacetonas a partir da reação entre a chalcona e tiofenol.

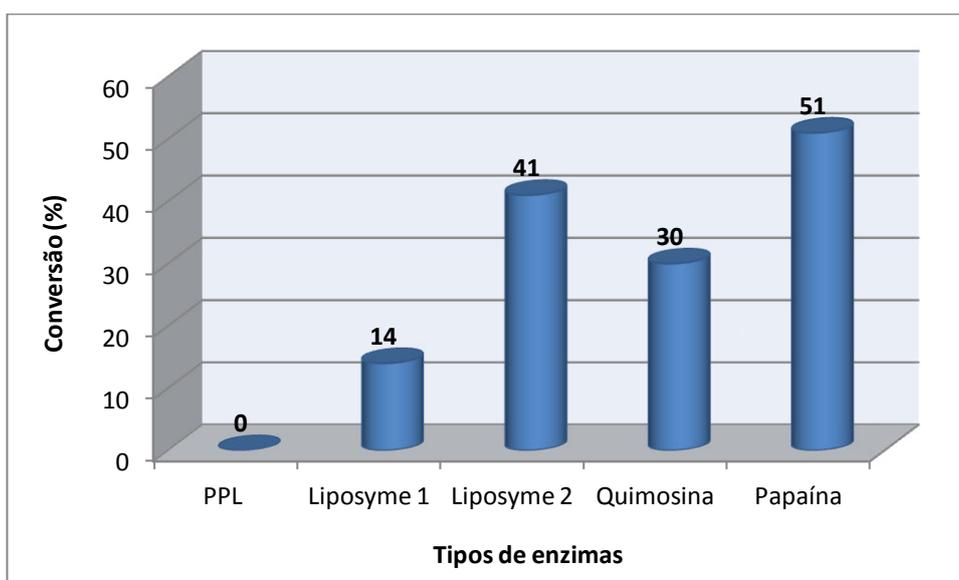
As chalconas são moléculas abundantemente encontradas em diversas espécies de plantas, têm apresentado intensa atividade farmacêutica (anti-inflamatórias, antitumorais, antimicrobiana, antiviral etc.), onde a mesma apresenta como característica peculiar sua pigmentação amarelada [61]. Assim apresentando esses atributos tornou-se um reagente interessante na substituição do grupo cetônico acarretando, portanto na pesquisa da chalcona para a reação de tia-Michael.

Para tal adicionou-se em um balão reacional de 50 mL, 0,135 g de chalcona, 0,06 mL de tiofenol e 0,04 g das seguintes enzimas: PPL, Lipozyme®, quimosina e papaína, em 10 mL de EtOH para 0,2 g de reação total.

O resultado da ação das enzimas para a reação não produziu o composto de interesse, dado esse confirmado por análise espectrométrica via CG/MS.

Acreditou-se que o motivo de não formar o composto de interesse se procedia da pouca solubilidade da chalcona em EtOH e nesse sentido testou-se novamente a reação nessas mesmas condições apenas mudando o solvente para o clorofórmio.

Em clorofórmio as reações apresentaram um melhoramento nos resultados. Os dados estão inseridos na Figura 12.



**Figura 12.** Dados da conversão para a reação com chalcona e tiofenol no solvente Clorofórmio

Ao contrário do que acontece com as demais reações anteriormente apresentadas, a reação envolvendo a PPL e chalcona não apresentou rendimento.

A Lipozyme® foi testada em duas quantidades enzimática. Na que envolveu 0,04g de enzima (situação Liposyme 1) a reação apresentou apenas 14% de conversão referente ao composto de interesse. Todavia, quando há uma diminuição na quantidade enzimática para 0,02 g (situação Liposyme 2) houve um aumento da porcentagem de conversão para 41% corroborando com os dados anteriormente apresentado que indicam que para a Liposyme quantidades menores de enzima fornecem maiores rendimentos reacionais. Isto porque, como explicado anteriormente esta enzima atinge a fase lag muita mais rapidamente muito provavelmente decorrente de sua imobilização.

A quimosina, que geralmente proporciona melhores rendimentos no solvente THF, exibiu a conversão de 30%, provavelmente por causa do solvente clorofórmio que apresenta constante dielétrica baixa de 4,8. Reforçando a preferência da quimosina por solventes com baixa constantes dielétricas.

Entres as enzimas a que melhor apresentou conversão foi à papaína, a qual forneceu 51% de conversão do composto final.

## 7.CONCLUSÃO

As enzimas testadas apresentaram potencial biocatalítico, porém a concentração das mesmas, o tempo de reação e o solvente utilizado são fundamentais para que a sua atividade catalítica seja desencadeada com rendimentos apropriados.

Nas reações de cinamaldeído e tofenol utilizando a PPL em 4 horas reacionais observa-se que o rendimento do composto de interesse foi maior em solventes como EtOH e DMSO/H<sub>2</sub>O. A reação com DMSO foi melhorada inserindo-se uma porcentagem (50%) de água no meio reacional. Isto porque dados na literatura evidenciam indícios que as reações envolvendo catalisadores enzimáticos são melhores executadas quando é inserida uma porcentagem de água ao solvente orgânico <sup>[65]</sup>. Entretanto é sabido que o DMSO é um solvente tóxico. Portanto, houve a preferênciada troca desse solvente tóxico por um não tóxico e como o EtOH também apresentou melhor desempenho juntamente com o DMSO, na otimização do processo reacional foi priorizado o solvente EtOH com o propósito de estimular os princípios da química verde e contribuir com o ambiente.

Posteriormente analisou a porcentagem ótima para essa enzima, sendo que a mesma proporcionou melhores rendimentos quando se utilizou 0,2 para 0,5g de reação final e 0,4 g de enzima em para 2 g de reação final as reações foram realizadas em 2 horas reacionais apresentando 98% e 70% de rendimento via coluna cromatográfica, e o seu uso em quantidades diferentes desta resultou em uma diminuição no rendimento por surgimentos de subprodutos.

Verificou-se a conversão para produção do composto de interesse em quantidades menores, na qual para 0,2 g de reação final o melhor resultado apresentado foi para a quantidade de 40 % de PPL com 98% de conversão.

O estudo do reaproveitamento enzimático não apresentou muitas vantagens quanto, sugerindo e incentivando assim futuros trabalhos com a PPL imobilizada.

No tocante a análise do uso da Liposyme ® como biocatalisadores nas reações de tia-Michael foi obtido melhores resultados utilizando-se 0,2 g de enzima no tempo de 4 horas reacionais no solvente EtOH.

Através do estudo de custo para as reações pôde-se verificar que a melhor metodologia, no tocante a custos reacionais e rendimentos, foi a que envolveu 0,2 g de Liposyme® por um período de 4 horas em meio de etanol.

Na reação de cinamaldeído e tiofenol com a enzima quimosina os melhores resultados apresentados foram com 20% de enzima em 2 horas reacionais. Como a quimosina reagiu em mais tempo (4 horas), melhor com o solvente THF, esperava-se que a mesma com 0,4 g de enzima obtivesse melhores rendimentos otimizando assim o processo, entretanto nessas condições a enzima reagiu menos do que no solvente EtOH ficando com 47,5% de rendimento em EtOH e 39,93% de rendimento em THF. Provavelmente isso se deve pelo fato de surgir subprodutos reacionais quando se aumenta a quantidade enzimática, diminuindo assim o rendimento esperado.

A reação de cinamaldeído e Tiofenol com a enzima papaína não obteve o composto esperado possivelmente por inativação da enzima pelo cinamaldeído, pois na mesma situação reacional apenas trocando-se as cetonas, a mesma apresenta bons resultados sendo 2- cicloexen-1-ona com 72,55% de conversão em 4 horas reacionais e 60% de conversão em 2 horas reacionais. Como a chalcona é pouco solúvel em EtOH no solvente clorofórmio entretanto com mesma quantidade de enzima a conversão foi de 51%.

As reações com cinamaldeído e tiofenol chegaram ao composto de interesse conforme comprovado pelos espectros de massas (Anexo I) e no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Anexo II ao IV).

A reação com 2-cicloexen-1-ona e tiofenol obteve melhores resultados com a enzima quimosina a 20% tanto em 4 horas reacionais com 75% de conversão quanto para 2 horas reacionais obtendo 72% de conversão. Seguida da PPL com 74,5% de conversão em 4 horas reacionais e 65,5% de conversão em 2 horas reacionais.

Assim as enzimas mostraram poder catalítico também nas reações com 2-cicloexen-1-ona e tiofenol conforme demonstra os anexos V ao VIII.

Com a chalcona e o tiofenol em EtOH as reações não obtiveram sucesso, entretanto quando trocou-se o solvente ocorreu um aumento de rendimento nas conversões. Sendo que para essa situação reacional a melhor enzima catalítica foi a Papaína com 51% de conversão, seguida pela Lipozyme® a 10% com 41% de conversão. Corroborando assim para entender a preferência da papaína por baixas constantes dielétricas. Portanto confirmando a atividade catalítica das enzimas nos reagentes chalcona e o tiofenol esta os anexos IX e X.

Em suma no desafio da química moderna em encontrar meios reacionais mais brandos e catalisadores ambientalmente corretos, observa-se que todas as enzimas apresentadas proporcionaram bons rendimentos dependendo do meio reacional. Os biocatalisadores proporcionaram rendimentos entre ótimos e consideráveis em tempo reacionais curtos e em temperatura ambiente. A despeito disso, cumpre informar que esta é a primeira descrição de reação de tia-Michael biocatalisada.

## 8.REFERÊNCIAS

- [1] CAI, J.F.; GUAN, Z.; HE, Y-H. J. Mol. Catal. B: Enzym.68,240–244 (2011).
- [2] STROHMEIER, G.A.; SOVIC', T.; STEINKELLNER, G.; HARTNER, F.S.; ANDRYUSHKOVA, A.; PURKARTHOFFER, T.; GLIEDER, A.; GRUBER, K.; GRIENGL, H. Tetrahedron.65, 5663–5668 (2009).
- [3](a) FUJITA, E.; NAGAO, Y.; Bioorg. Chem. 6, 287 (1977); (b) LING, R.; YOSHIDA, M.; MARIANO, P. S. J. Org. Chem.61, 4439 (1996).
- [4](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.; MedicinalNatural Products, 2nd ed.; John Wiley & Sons: West Sussex, England (2002); (e) VARDANYAN, R. S.; HRUBY, V. J. Synthesis of Essential Drugs; Elsevier: Amsterdam (2006).
- [5] TROST, B. M.; KEELEY, D. E. J. Org. Chem. 40, 2013 (1975).
- [6] CHERKAUSKAS, J. P.; COHEN, T. J. Org. Chem. 57, 6 (1992).
- [7](a) FLUHARTY, A. L.; The Chemistry of the Thiol Group; 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).
- [8] SAITO, M.; NAKAJIMA, M.; HASHIMOTO, S. Tetrahedron.56, 9589-9594 (2000).
- [9] GARG, SK; KUMAR, R.; CHAKRABORTI, A.K. Synlett. 1370-1374 (2005).
- [10] KHAN, A.T.; GHOSH, S.; CHOUDHURY, L.H. Eur.J. Org. Chem.Chem. 2226-2231 (2006).
- [11] BANERJEE, S.; DAS, J.; ALVAREZA, R.P.; SANTRA, S.; New J. Chem. 34, 302-306 (2010).
- [12] YADAV, J.S.; REDDY, B.V.S.; BAISHYA, G.J. Org.Chem. 68, 7098-7100, (2003).
- [13] RANU, B.C.; DEY, S.S. Tetrahedron. 60, 4183-4188 (2004).
- [14] SAEED ABAEE, M.; CHERAGHI, S.; NAVIDIPOOR, S.; MOJTAHEDI, M.M.; FORGHANI, S. Tetrahedron Lett.(2012).
- [15](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).

[16]<sup>(a)</sup>HAJOS, Z. G.; PARRISH, D. R.; J. Org. Chem. 39, 1615 (1974). <sup>(b)</sup>RIZZI, G. P. J. Org. Chem. 35, 2069 (1970).

[17]WU, M-Y.; LI, K.; HE, T.; FENG, X-W.; WANG, X-Y.; YU, X-Q. Tetrahedron 67. 2681-2688 (2011).

[18]CORRÊA, A. G.; ZUIM, V. G. Química Verde (2009).

[19]MICHAEL, A.; J. Prakt. Chem. 35 (1): 349-356 (1887).

[20]TROST, B. M.; KEELEY, D. E. J. Org. Chem. 40, 2013 (1975).

[21]O'CONNOR, S. E.; GROSSET, A.; JANIÁK, P. Fundam. Clin. Pharmacol.13 (2): 145-153 (1999).

[22]CHENG, S.; COMER, D. D. Tetrahedron Lett. 43, 1179 (2002).

[23]RANU, B. C.; DEY, S. S.; SAMANTA, S. Arkivoc. iii, 44 (2005).

[24]KUMAR, A.; AKANKSHA. Tetrahedron. 67, 11086-11092 (2007).

[25]<sup>(a)</sup>CHEM, Y.; LAM, Y.; LAI, Y-H.; Org. Lett. 5( 7), 1067-1069 (2003). <sup>(b)</sup>SKAR\_EWSKI, J.; SIEDLECKA, R.; WOJACZYŃSKA, E.; ZIELINSKA-BŁAJET, M. Tetrahedron: Asymmetry. 13, 2105–2111 (2002);

[26]<sup>(a)</sup>FRIGOLA, J.; COLOMBO, A.; PARES, J.; MARTINEZ, L.; SAGARRA, R.; ROSTER, R.; Eur. J. Med. Chem.24, 435-445 (1989). <sup>(b)</sup>COPP, F. C.; ISLIP, P. J.; TATESON, J. E. Biochem. Pharmacol.33, 339-340 (1984).

[27]GROUTAS, W. C.; VENKATAMAN, R.; CHONG, L. S.; YODER, J. E.; EPP, J. B.; STANGA, M. A.; KIM, E. Bioorg. Med. Chem.3, 125-128 (1995).

[28]BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicação e mercado. Editora: Interciências. Rio de Janeiro: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT: Portugal (2008).

[29]AIRES-BARROS, M.R. Bol. Biotecnologia. Instituto Superior Técnico, 1049-001 Lisboa Portugal (2004).

[30]BEATRIZ, A.; LIMA, D. P.; MARQUES, M.R. Revista Ágora. Campo Grande. (2005)

[31]HOLLAND, H. L. Organic Synthesis with Oxidative Enzymes. Editora Wiley-VCH, Weinheim. (1992).

[32]BOYÈRE, C.; FAVRELLE, A.; BROZE, G.; LAURENT, P.; NOTT, K.; PAQUOT, M.; BLECKER, C.; JÉRÔME, C.; DEBUIGNE, A. Carbohydr. Res. 346, 2121–2125 (2011).

[33] SÁ PEREIRA, P.; DUARTE, J.C.; FERRARA, M.A.; LACERDA, P.S.B.; ALVES, F.C. Biocatálise: Estratégias de Inovação e Criação de Mercados. Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado cap.19. Editora Interciências. Rio de Janeiro Brasil . (2010).

[34] 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).

[35] CLOSOSKI, G.C. *Aplicação da biocatálise na síntese de  $\gamma$ -butirolactonas bioativas quirais*. Novos reagentes visando a preparação estereosseletiva de análogos da vitamina A. Universidade de São Paulo. São Paulo, SP. (2005).

[36] FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I.C. Quim. Nova. 25,3, 455-464 (2002).

[37] CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. Engenharia Enzimática. Editora LIDEL Edições Técnicas, Lisboa Portugal, p.121-140, setembro. (2003).

[38] MARTINI, V.Q. Resolução do ( $\pm$ )-citronelol e ácido ( $\pm$ )-citronélico via Esterificação enantiosseletiva catalisada pela lípase de *Candida Antarctica*. Universidade Regional de Blumenau. Blumenau. (2007).

[39] FERNANDES, M.L.M. Produção de lípases por fermentação no Estado sólido e sua utilização em Biocatálise. Universidade Federal do Paraná. (2007).

[40] REETZ, M. T. Curr. Opin. Chem. Biol. 6,145–150 (2002).

[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] CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C.; AGUIAR, C.L. Quim. Nova, 27, 1, 146-156 (2004).

[43] CHANG, S. W.; SHAW, J. F.; SHIEH, C. J. Food Technol. Biotechnol. 41 (3) 237–242 (2003).

[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] LÓPEZ, R. E. S. Quim. Nova, Vol. 33, 7, 1541-1548 (2010).

[46] RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J.; BATEMAN, A. MEROPS. (2012).

[47] GONZÁLEZ-RÁBADE, N.; BADILLO-CORONA, J. A.; ARANDA-BARRADAS, J. S.; OLIVER-SALVADOR, M. C. Biotechnol. Advances. 29, 983–996 (2011).

[48]SUZUKI, M.; ITOH, M.; OHTA, N.; NAKAMURA, Y.; MORIYAMA, A.; MATSUMOTO, T.; OHASHI, T.; MURAKAMI, S. Acta Oto-Laryngol. 126, 746-751(2006).

[49]FOOD INGREDIENTS BRASIL.; 16 (2011). Disponível em: <http://www.revista-fi.com>. Acesso em 06/11/2012.

[50]LIMA, A. C. S. *Síntese de Derivados de  $\beta$ -Aminocetônicos via Reação de Mannich Utilizando Biocatalisadores*. UFGD, Dourados, MS. (2012).

[51]TURHAN, M.; MUTLU, M. Enzyme Microb.Technol. vol. 22, April (1998).

[52]MOHANTY, A.K.; MUKHOPADHYAY, U.K.; GROVER, S.; BATISH, V.K. Biotech.Adv. 17, 205–217 (1999).

[53]ARAÚJO, J. A. *Produção de Quimosina B de Bos taurus em Pichia pastoris*. Universidade de Brasília. Brasília, DF. (2008).

[54](a) GILLILAND, G. L.; WINBORNE, E. L.; NACHMAN, J.; WLO-DAWER, A.; The three- dimensional structure of recom- binant bovine chymosin at 2.3 Å resolution. Proteins: Structure, Function and Genetics. 8,82-101 (1990). (b)NEWMAN, M.; SAFRO, M.; FRAZAO, C.; KHAN, G.; ZDANOV, A.; TICKLE, I. J.; BLUNDELL, T. L.;ANDREEVA, N. Journal Mol. Biol. 221,1259-1309 (1991).

[55]CHITPINITYOL, S.; CRABBE, M. J. C. Food Chemistry. 61,4, 395-418 (1998).

[56]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).

[57]MAHECHA1, M. M. A.; RODRÍGUEZ,O. M.; CORREA, H. A. M. Acta Agron. 60, 219-225 (2011).

[58]LEITE, A. P.; OLIVEIRA, B. G. R. B.; SOARES, M. F.; BARROCAS, D. L. R. Rev.Gaúcha Enferm. 33(3):198-207 (2012).

[59]NETO, R. S.; BARONE, B.; TEVES, D. C.; SIMÕES, M. J.; NOVO, N. F.; JULIANO, Y. Acta Cir. Bras. 8 (1) (1993).

[60]YANG, RUSSEL. Enzymatic reactions in organic media, Eds: Koskinen e Klibanov, Ed.Blackie academic & professional, Great Britain (1996).

[61] CONTI, R. M.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. Quim. Nova, 24, 672 (2001).

[62] COSTA, V.E.U., AMORIN, H.L. Quím. Nova,v. 22, n. 6, 863-873 (1999).

[63]PIRES, J.M.; JORGE, F.E.; MACHADO, L.C.; MARINS, A.A.L. *Quim. Nova*, 29, 5, 977-982 (2006).

[64]DOMENEGLINI, L. C. *Obtenção de Chalconas Sintéticas com Potencial Atividade Biológica*. Florianópolis. 199. Universidade Federal de Santa Catarina. (2006).

[65]HE, T.; LI, K.; , M. Y.; FENG, X. W.; WANG, N.; WANG, H. Y.; LI, C.; YU, X. *Q. J. Mol. Catal. B: Enzymatic*. 67,189–194 (2010).

## 9.HISTÓRICO

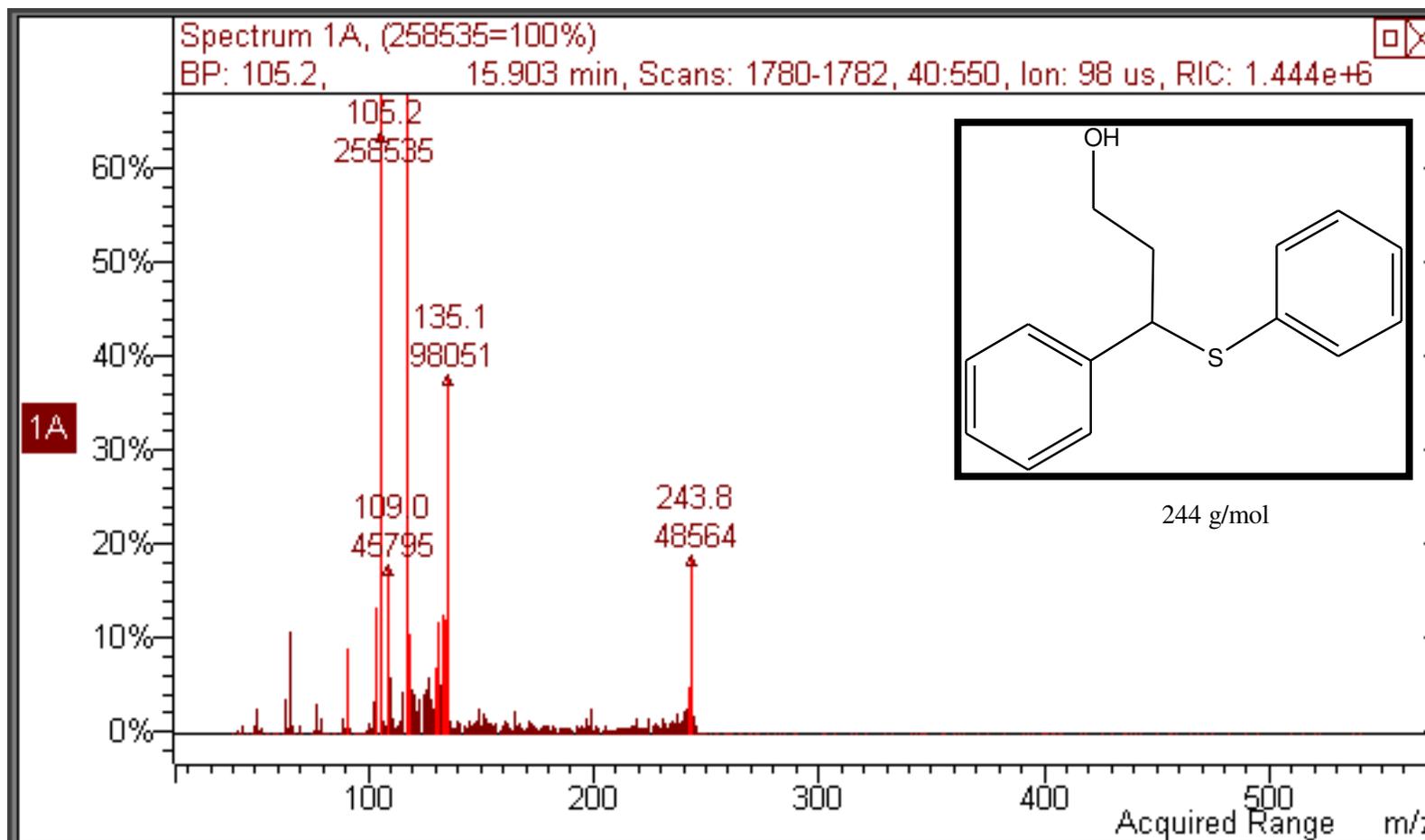
Disciplinas Cursadas	Créditos	Conceitos
<b>Obrigatórias</b>		
Inovação Biotecnológica	02	A
Meio Ambiente e Tecnologia	02	B
Estágio e Docência	02	A
Seminário	02	A
<b>Optativas</b>		
Fundamentos de Química Verde	04	A
Microbiologia Ambiental	03	B
Determinação Estrutural de Compostos Orgânicos	04	A
Aplicação Ambiental e Industrial de Enzimas Microbianas	04	A
Dissertação	06	
<b>Total de Créditos Cursados</b>	<b>29</b>	

### 9.1.Trabalhos publicados em anais de congresso

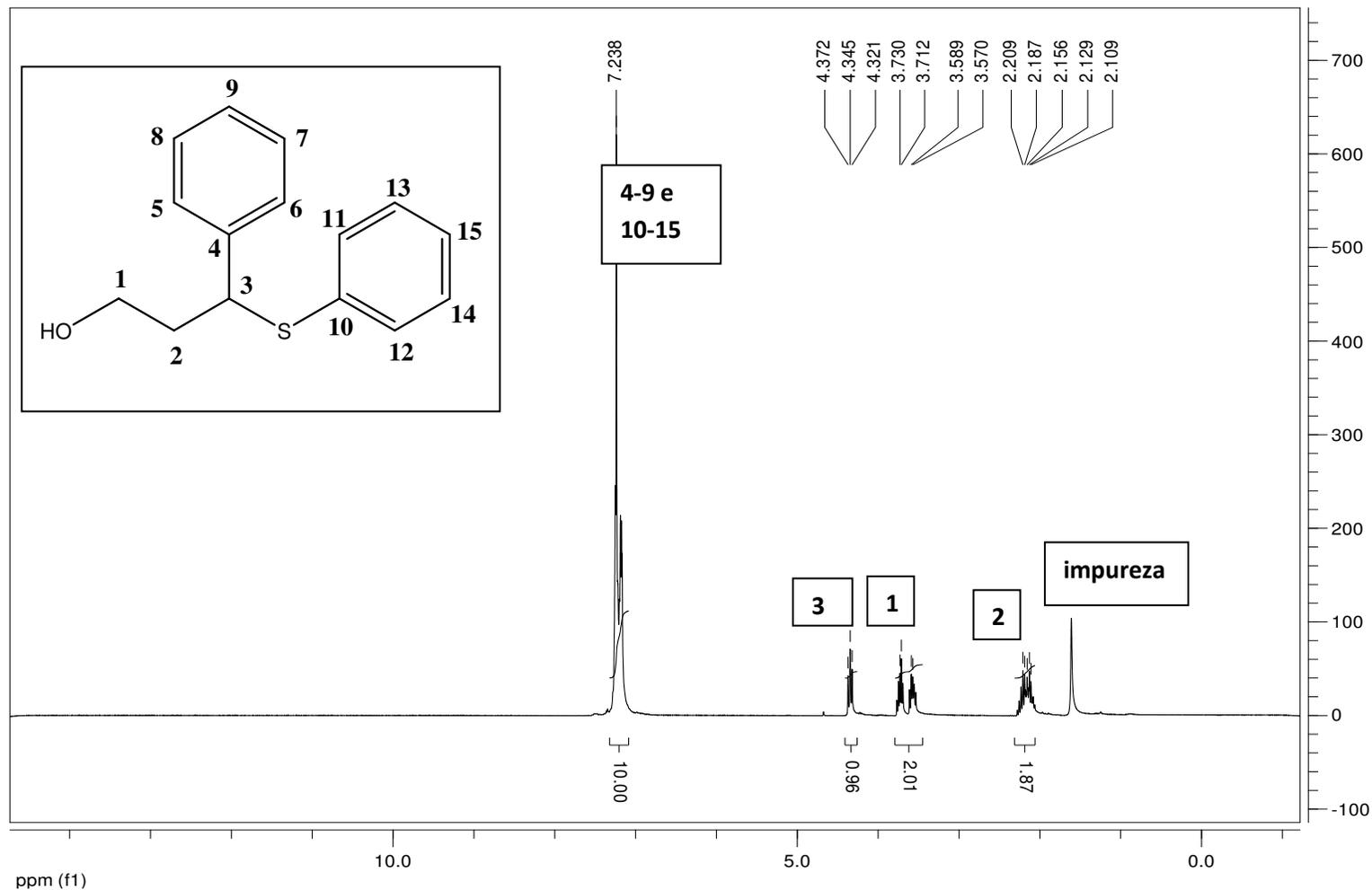
- IV Workshop Norte, Nordeste e Centro-Oeste de Síntese Orgânica (WSO). Estudo sistemático do emprego de catalisadores enzimáticos na formação de ligações carbono-heteroátomos. 10-12 de abril, **2012**. Bonito MS.
- IV Workshop Norte, Nordeste e Centro-Oeste de Síntese Orgânica (WSO). Síntese de alguns derivados de beta-aminocetônicos via reação de Mannich utilizando biocatalisadores. 10-12 de abril, **2012**. Bonito MS.
- IV Workshop Norte, Nordeste e Centro-Oeste de Síntese Orgânica (WSO). Estudo sintético de algumas beta-aminocetonas empregando a tiazolidina como catalisador. 10-12 de abril, **2012**. Bonito MS.
- IV Workshop Norte, Nordeste e Centro-Oeste de Síntese Orgânica (WSO). Aplicação do bis-(L) prolinato de zinco (II) nas reações de síntese de algumas 1,4-Dihidropiridinas. 10-12 de abril, **2012**. Bonito MS.
- 3º Encontro de ensino de graduação, 5º Encontro de pós-graduação, 6º Encontro de iniciação científica e 6º Encontro de extensão (ENEPE). Utilização de biocatalisadores na formação de compostos de enxofre. 22-24 de outubro, **2012**. Dourados MS.

- 3º Encontro de ensino de graduação, 5º Encontro de pós-graduação, 6º Encontro de iniciação científica e 6º Encontro de extensão (ENEPE). Síntese de compostos azadielsalder utilizando como catalisador o bis-L-prolinato de zinco (ii). 22-24 de outubro, **2012**. Dourados MS.
- 8 th National Cancer Research Institute (NCRI). Growth inhibition of HePG2 and HTC hepatic tumor cells by Nickel (II) Complex derived from Schiff base. 4-7 November, **2012**. Liverpool UK.
- 8th National Cancer Research Institute (NCRI). Schiff base nickel (II) complex inhibit Lucena-1 proliferation. 4-7 November, **2012**. Liverpool UK.
- 8th National Cancer Research Institute (NCRI). Inhibition of K562 leukemia cells proliferation by complex of Schiff base with Nickel (II) ion. 4-7 November, **2012**. Liverpool UK.
- Revista Orbital. Synthetic study of some beta-aminoketones using thiazolidine as catalyst. Pag.80-81. Vol. 4 No. Suppl. 1 - APRIL **2012**.
- Revista Orbital. Systematic study of the employment of enzymatic catalysts on the formation of carbon-heteroatoms. Pag.94-95. Vol. 4 No. Suppl. 1 - APRIL **2012**.
- Revista Orbital. Application of bis-(L) zinc proline (II) on the synthesis reactions of some 1,4-dihydropyridines. Pag.96-97. Vol. 4 No. Suppl. 1 - APRIL **2012**.
- Revista Orbital. Synthesis of some derivatives of compounds  $\beta$ -aminoketonic through Mannich reaction by using biocatalysts. Pag.110-112. Vol. 4 No. Suppl. 1 - APRIL **2012**.

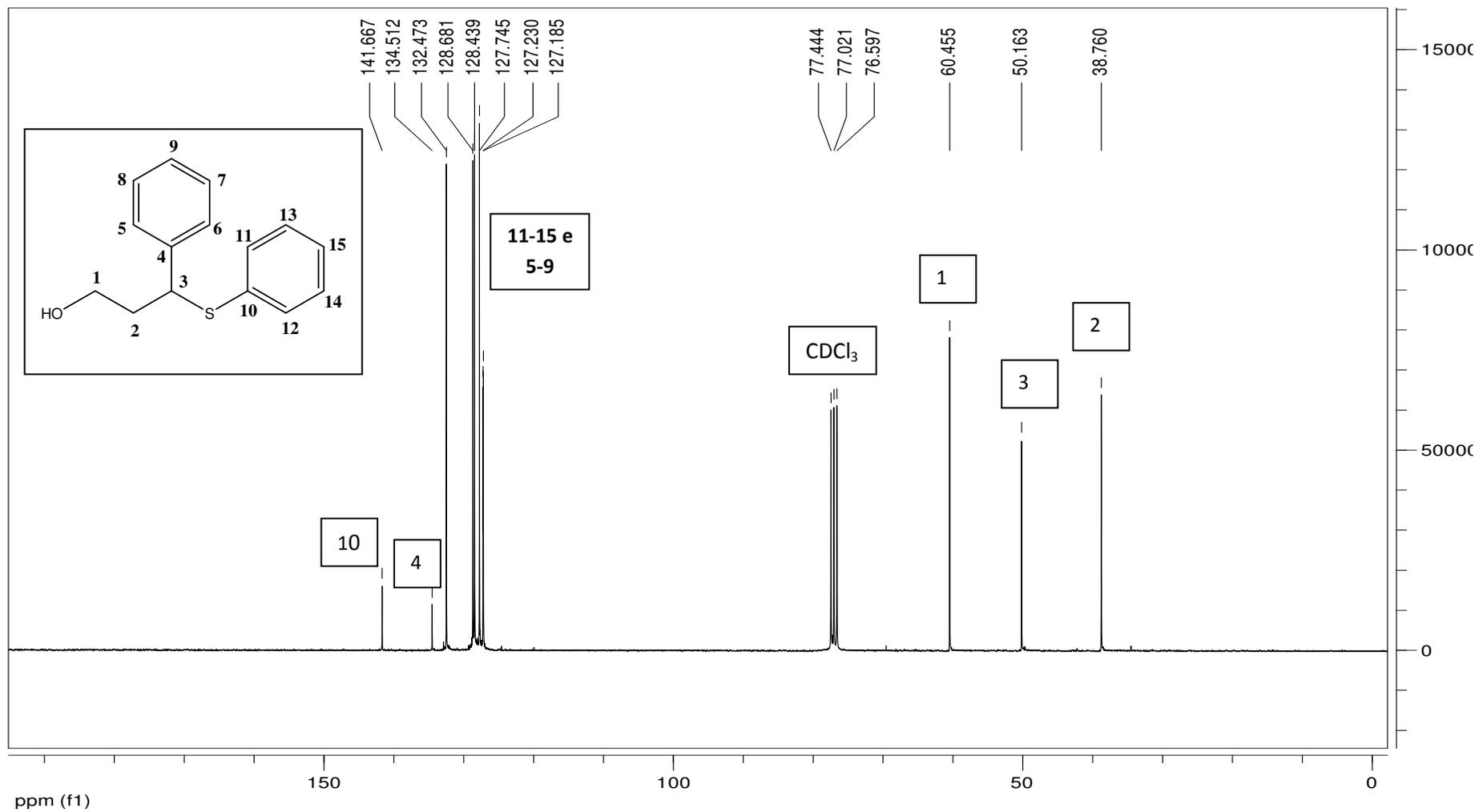
# 10. ANEXOS



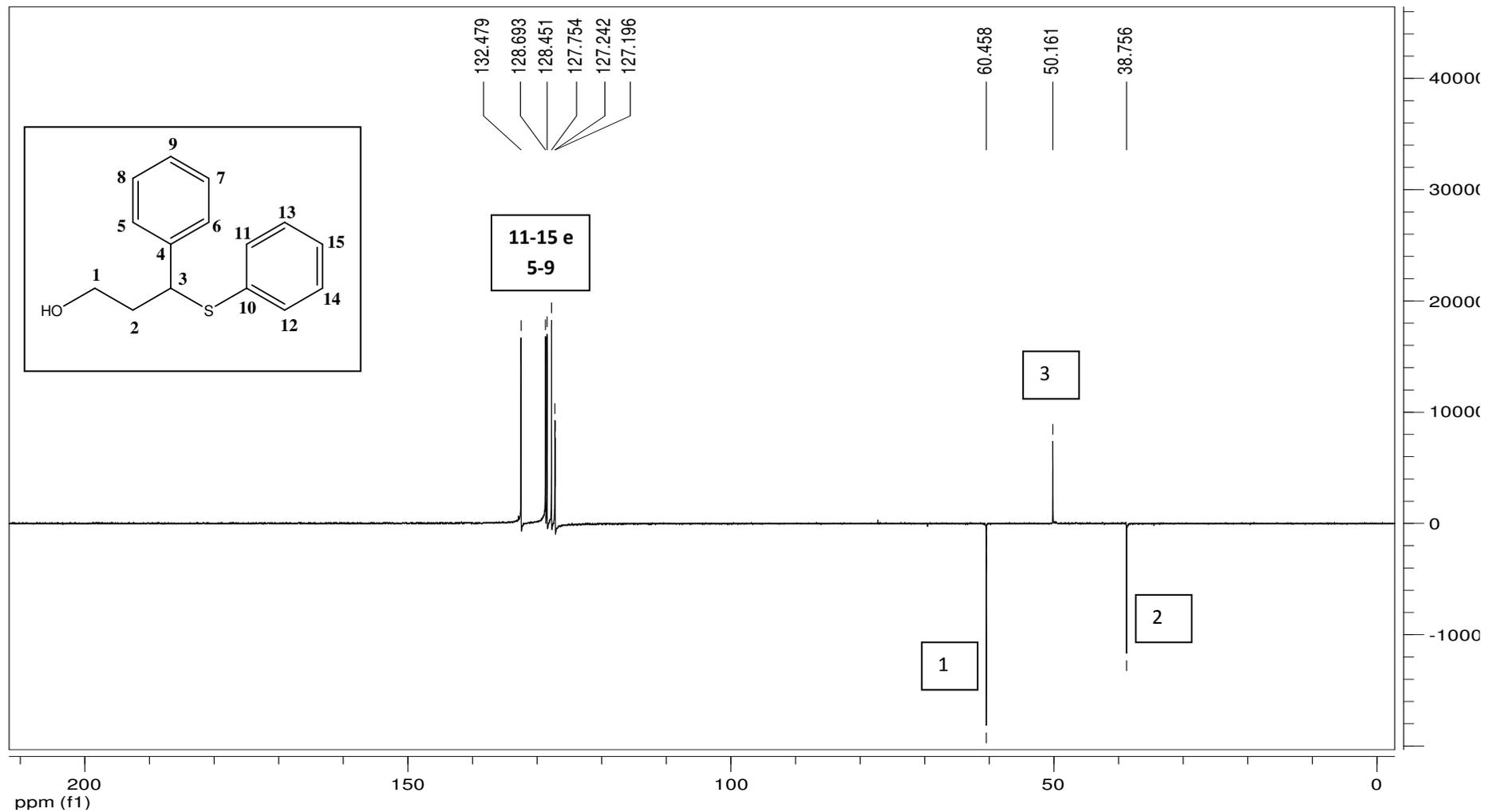
Anexo I: Espectro de massas do composto 3-fenil-3-feniltio-1-propanol



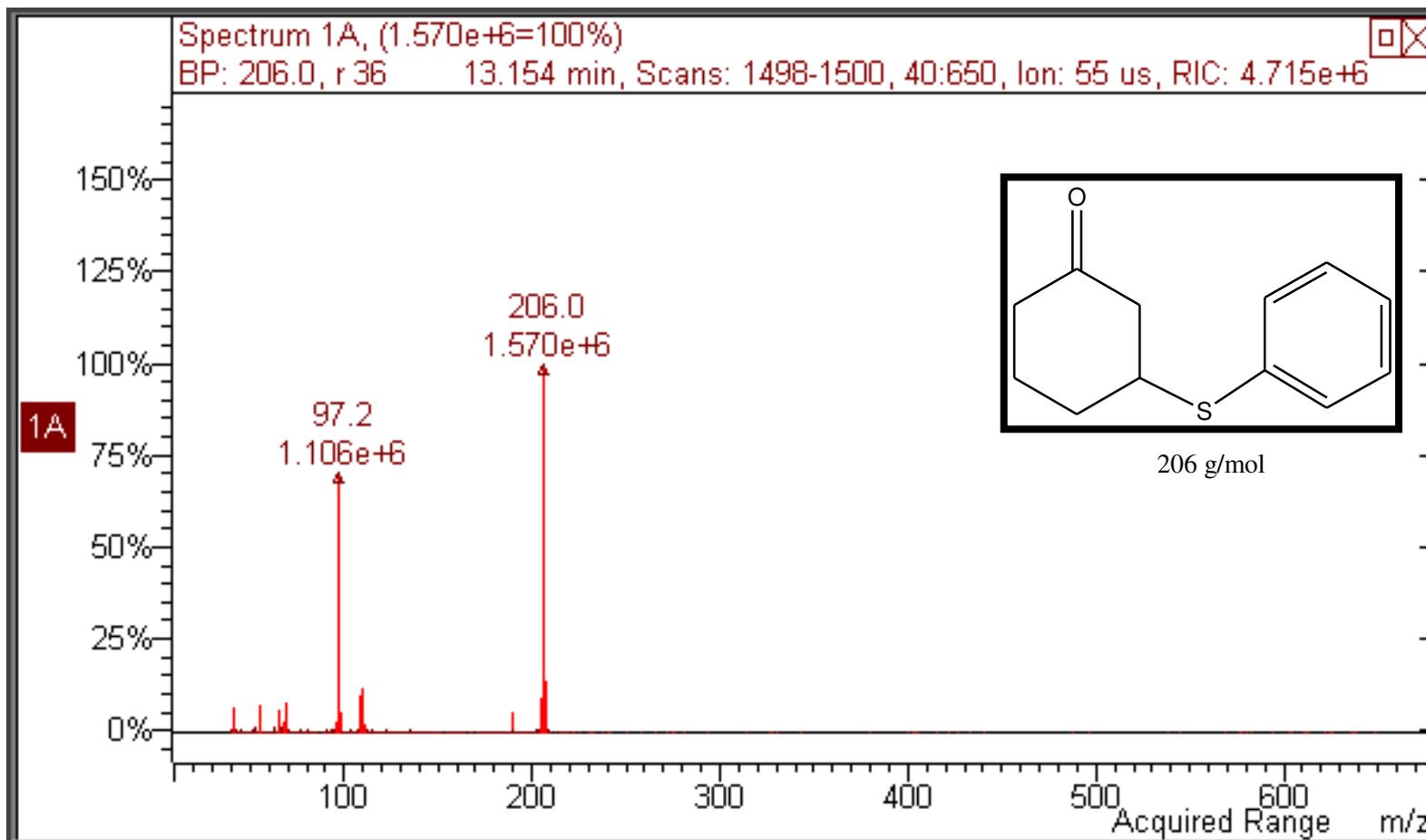
**Anexo II:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , para o composto 3-fenil-3-feniltio-1-propanol.



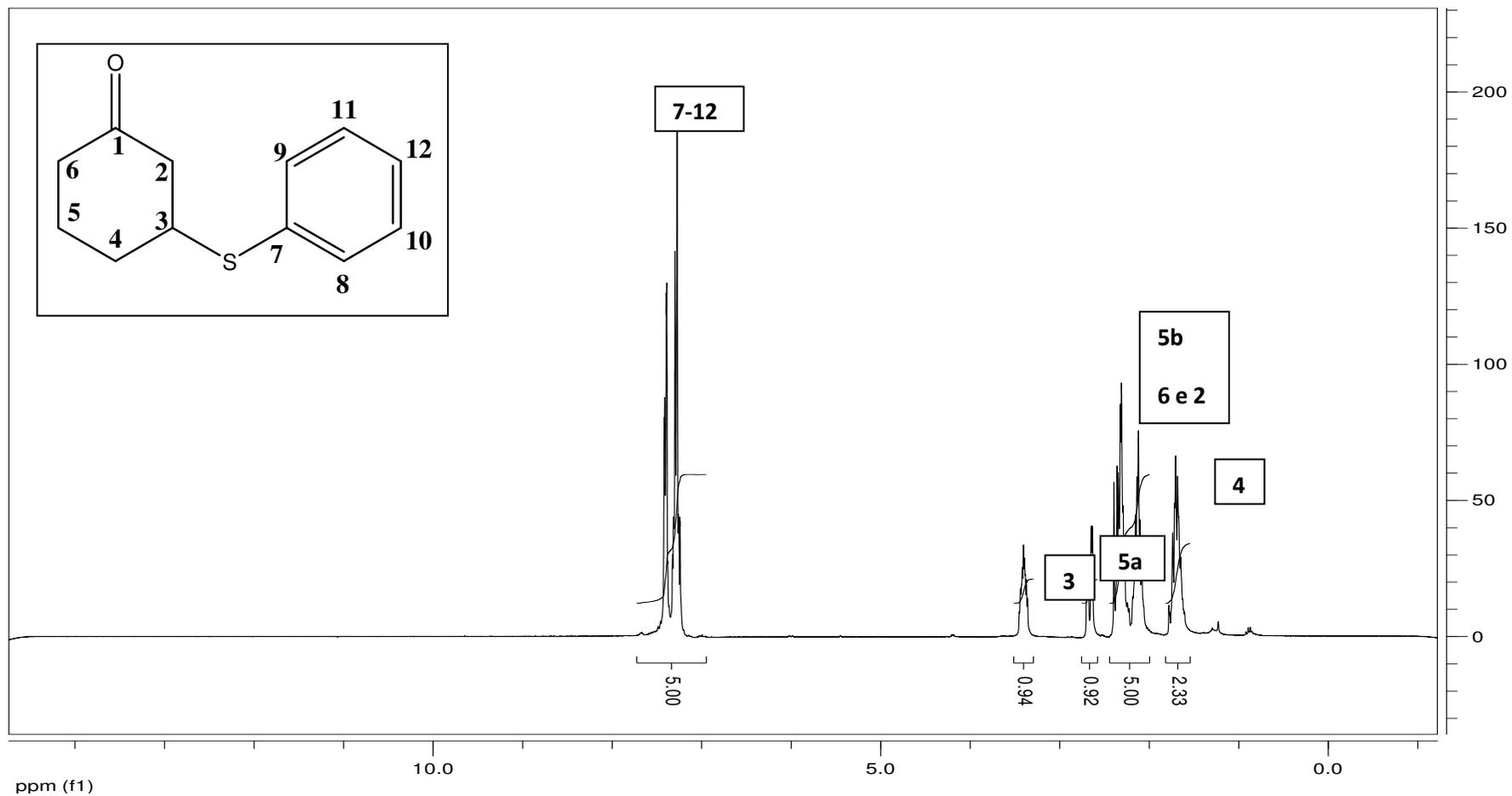
**Anexo III:** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C , para o composto 3-fenil-3-feniltio-1-propanol.



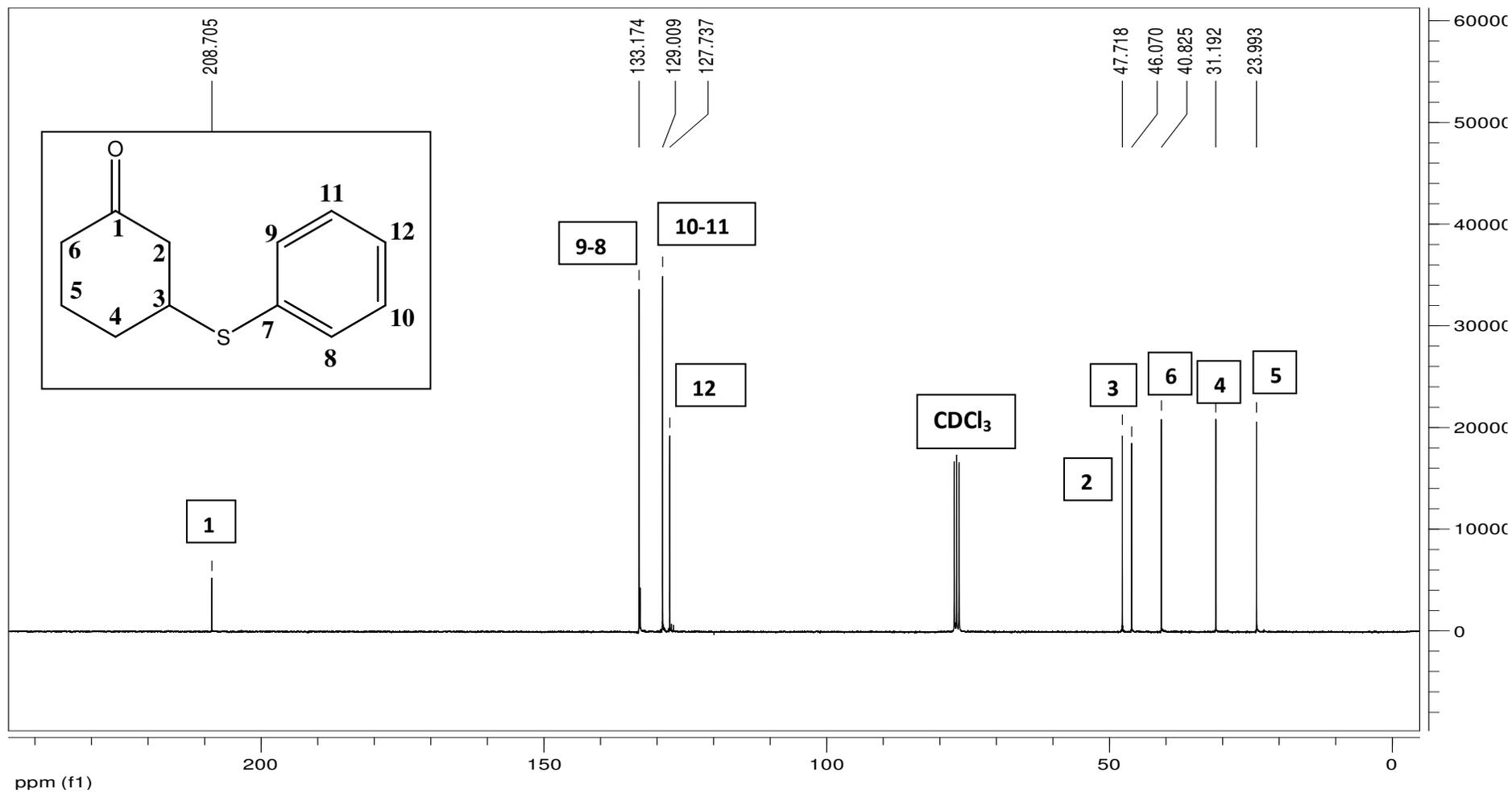
**Anexo IV:** Espectro de RMN DEPT 135 para o composto 3-fenil-3-feniltio-1-propanol.



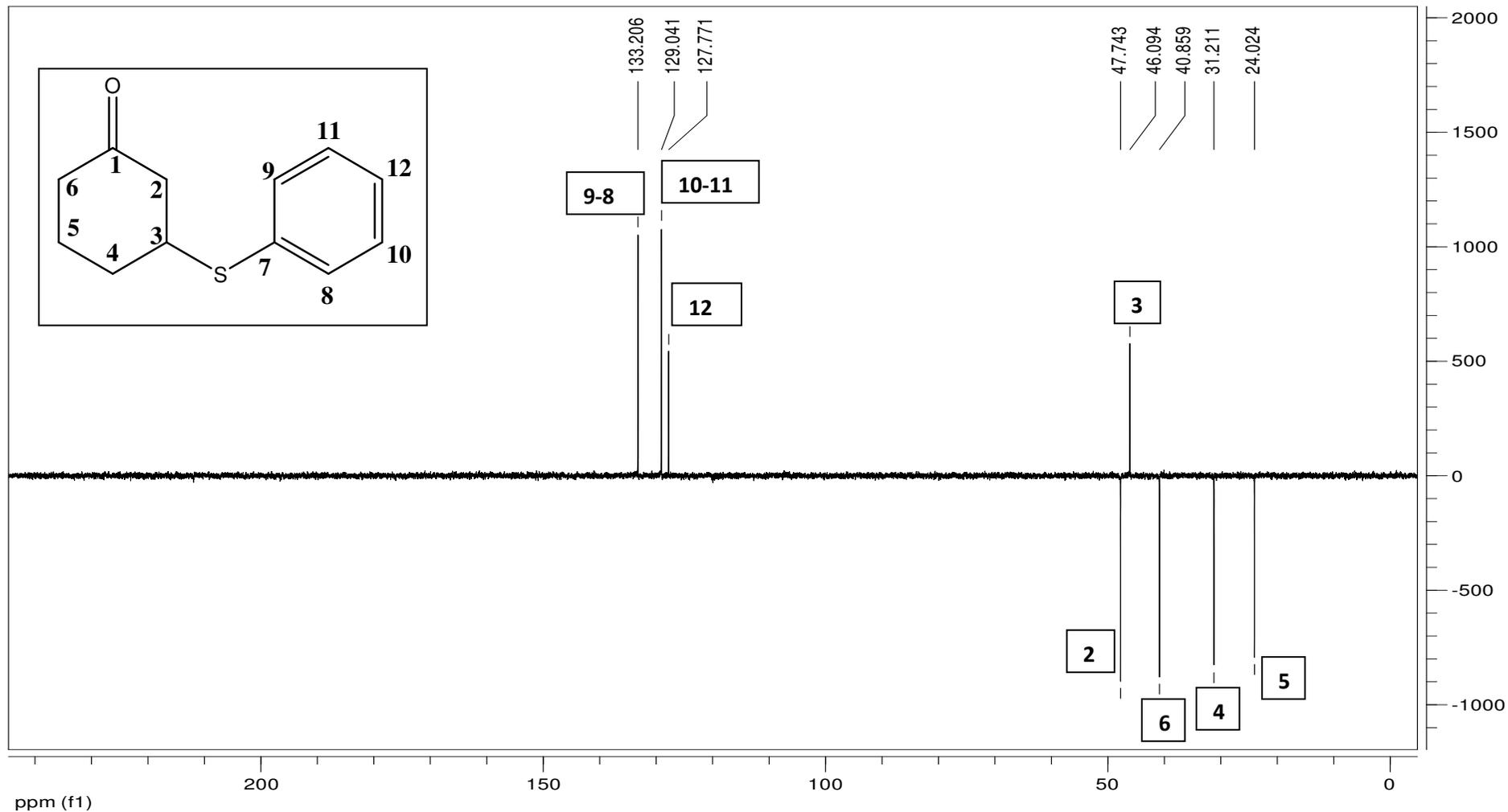
**Anexo V:** Espectro de massas do composto 3-feniltio-ciclohexanona



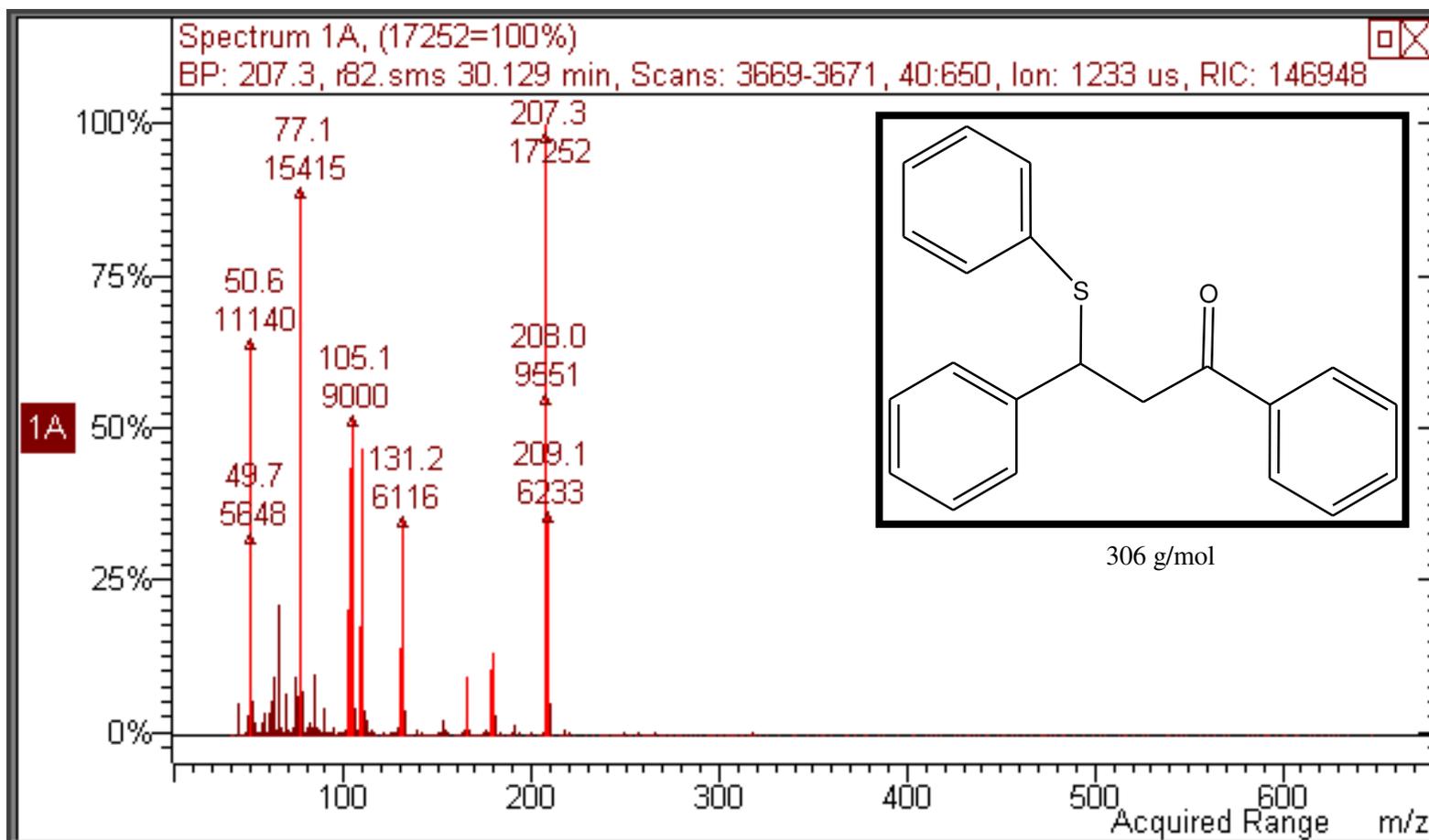
**Anexo VI:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para o composto 3-feniltio-ciclohexanona.



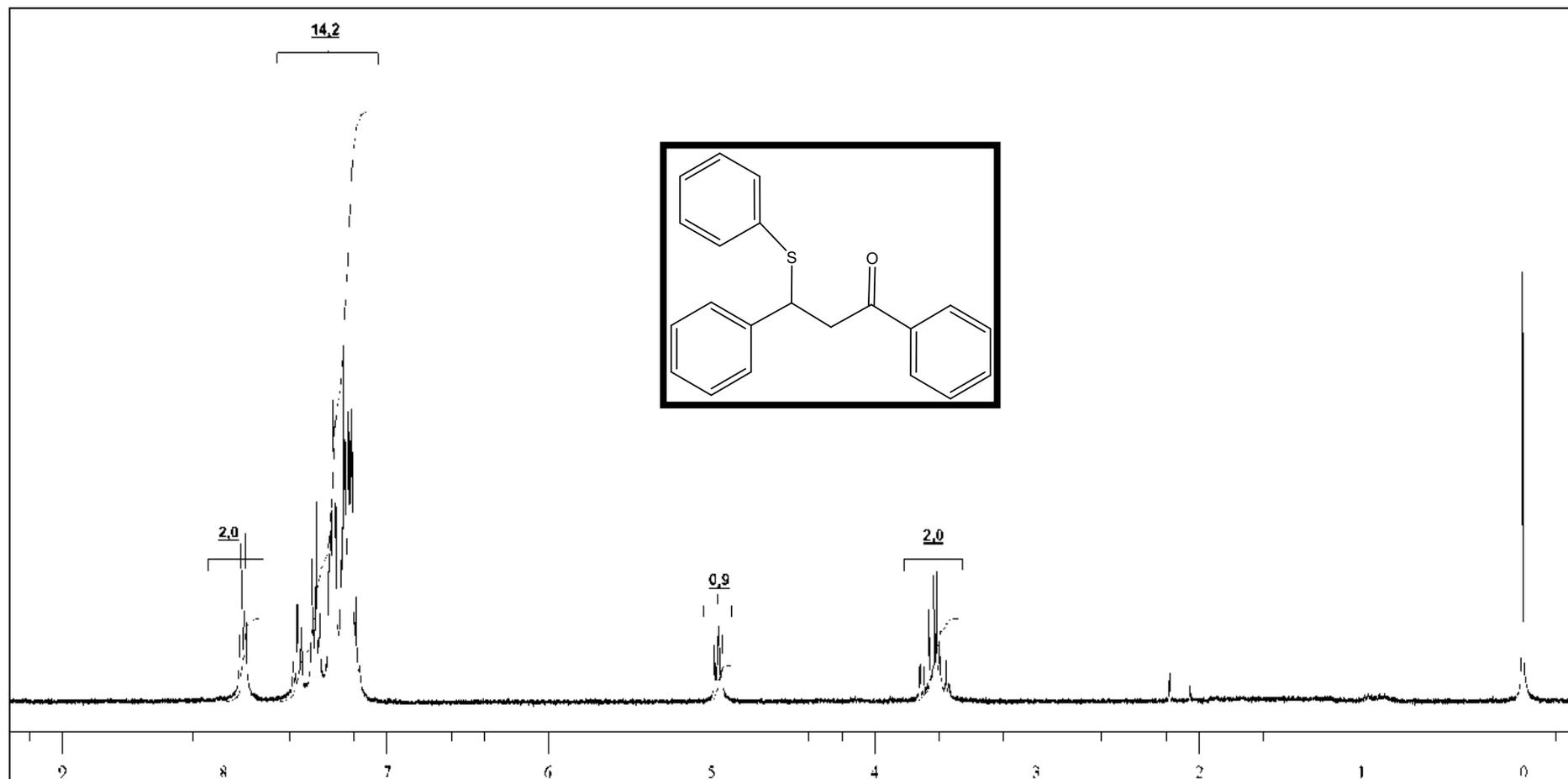
**Anexo VII:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para o composto 3-feniltio-ciclohexanona.



Anexo VIII: Espectro de RMN DEPT 135 para o composto 3-feniltio-ciclohexanona.



**Anexo IX:** Espectro de massas do composto 1,3-difenil-3-feniltio-propanona.



**Anexo X:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , para o composto 1,3-difenil-3-feniltio-1-propanona.