



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
QUÍMICA – LICENCIATURA E BACHARELADO

FELIPE OLIVEIRA NUNES

**DESENVOLVIMENTO DE ENZIMAS SUPORTADAS VISANDO À
APLICAÇÃO EM REAÇÕES DE TIO-MICHAEL**

DOURADOS-MS

2015

FELIPE OLIVEIRA NUNES

**DESENVOLVIMENTO DE ENZIMAS SUPORTADAS VISANDO
À APLICAÇÃO EM REAÇÕES DE TIO-MICHAEL**

Trabalho de Conclusão de Curso de
Graduação apresentado para obtenção dos
Títulos de Bacharel e Licenciatura em
Química. Faculdade de Ciências Exatas e
Tecnologia (FACET) da Universidade
Federal da Grande Dourados

Orientador: Prof. Dr. Nelson Luís de
Campos Domingues.

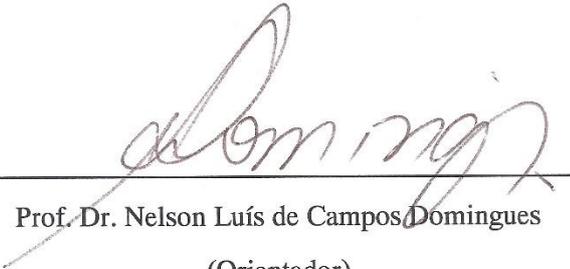
DOURADOS-MS

2015

Felipe Oliveira Nunes

**DESENVOLVIMENTO DE ENZIMAS SUPORTADAS VISANDO À
APLICAÇÃO EM REAÇÕES DE TIO-MICHAEL**

Este Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção dos Títulos de Bacharel e Licenciatura em Química foi avaliado, julgado e aprovado em sua forma final pela comissão julgadora em 11/11/2015;



Prof. Dr. Nelson Luís de Campos Domingues
(Orientador)



Prof. Dr. Cláudio Rodrigo Nogueira
(Examinador)



Prof. Dr. Leonardo Ribeiro Martins
(Examinador)

Dourados-Ms

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

N972d	<p>Nunes, Felipe Oliveira. Desenvolvimento de enzimas suportadas visando à aplicação em reações de tio-michael. / Felipe Oliveira Nunes. – Dourados, MS : UFGD, 2015. 121f.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Nelson Luis de Campos Domingues. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Biocatálise. 2. Tio-Michael. 3. Imobilização enzimática. I. Título.</p> <p>CDD – 660.63</p>
-------	--

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter me dado a vida e as virtudes necessárias para completar essa etapa da minha vida.

A Universidade Federal da Grande Dourados pela oportunidade de realizar o curso, e pelo apoio financeiro durante alguns anos do mesmo.

A minha mãe e meu pai pelo apoio, carinho e compreensão não só durante o curso, mas durante toda minha trajetória de vida, aos ensinamentos e lições que por eles me foram dados sou eternamente grato. Ao meu irmão pela parceria e todo tipo de ensinamento que me foi passado durante esses cinco anos.

Agradeço também a todos os professores que fizeram parte de minha trajetória direta ou indiretamente, pois foram eles os responsáveis por me transmitir o conhecimento necessário para chegar ao fim do curso. Em especial ao meu orientador Prof. Dr. Nelson Luís de Campos Domingues pelo conhecimento transmitido, não somente de química, mas sim conhecimentos para a vida, pois não foi somente um professor, mas sim um amigo e muitas vezes um pai.

Ao Lacob (Laboratório de catálise orgânica e biocatálise) e antigo LMH pelo espaço que possibilitou a realização desse trabalho e outros. Pela convivência com todos os seus integrantes desde a geração de 2011 até a geração de 2015, os quais por meio de trocas de experiências me ajudaram amadurecer como pessoa e como profissional. A esses que foram de colegas de trabalhos a irmãos eu gostaria de agradecer com muito carinho Aline, Beatriz, Bianca, Criscieli, Elias Bastos, Mariana, Paula, Lígia, Neimar, Symoni e Tabata, Rodrigo, Wellington, Keila, Ramesh, Amanda, Caren, Paula, Leticia, Beatriz, Erica, Cristiane, Mirian, Carline e a Daniele. Participar da Família Domingues foi uma experiência única.

Gostaria de agradecer de forma especial a Keila por ter me “adotado” quando eu estava perdido no laboratório e ajudado muito desde então. Por ter me aceitado como estagiário mesmo antes de saber o resultado do concurso. Por ser a melhor professora de estágio que qualquer pessoa poderia ter e por ter me possibilitado vivenciar a mágica experiência de transmitir o saber aos alunos.

A Bianca que apesar do tamanho teve um importância gigantesca em minha caminhada, pois desde os primeiros dias de curso foi minha parceira e logo depois se tornou minha irmã. Se fosse colocar aqui quantas vezes pedimos socorro um para o outro teria incontáveis páginas. Obrigado pelo companheirismo nos trabalhos, nos estudos para

as provas, nas experimentais, nas festas, nas idas ao posto, os lanches do skina, nos congressos, no laboratório trabalhando comigo sempre até a “hora da pizza”. E que essa nossa parceria se entenda por muito tempo pelo futuro, pois juntos somos “Os melhores”.

Ao Leonardo, Rosilene e Cesar que junto comigo e a Bianca formamos mais que um grupo de amigos e sim uma “quadrilha” como diria a Rose. Eu agradeço por todo companheirismo e ajuda de vocês durante o curso, pois nosso nível de amizade já está além dos 500 tons de problemas e vocês sabem que isso vale muito. E torço para que a “gravidade estética” mantenha-nos unidos mesmo que distantes.

Por último, mas não menos importante gostaria de agradecer ao Thiago Pereira (Emo) e ao Felipe Motta (Motta Snow) que apesar de nunca tê-los conhecido pessoalmente foram umas das pessoas mais presentes na minha graduação. Foram inúmeras vezes que nossas chamadas no Skype passaram de 10, 12 horas, horas onde ficávamos jogando, conversando, discutindo sobre a vida, ou até brigando. Esse momentos foram muito importantes pois era quando eu desligava da tensão da faculdade e relaxava até porque nessa hora a única coisa que importava era dar aquele ks lindo para tirar o outro do sério.

Por fim agradeço a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para essa minha experiência, pois sem eles o curso não teria sido tão fantástico. A todos um enorme abraço e minha sincera gratidão. Muito Obrigado!!!!

RESUMO

Este trabalho foi motivado pela crescente necessidade de desenvolver novos biocatalisadores suportados via imobilização enzimática. Os biocatalisadores foram inseridos em reações de tio-Michael para a produção de beta-tiocetonas. A reação de Michael envolve a adição de um nucleófilo a um eletrófilo (α,β -insaturado). Já a reação de tio-Michael corresponde a uma variante da reação de Michael que emprega compostos contendo enxofres como nucleofílos. Neste trabalho utilizou-se como eletrófilo a ciclohexen-2-ona e a isoforona e como nucleófilos o tiofenol, o *p*-clorotiofenol, o *p*-metoxitiofenol para a formação de ligações sigma carbono-heteroátomos C-S. Foram escolhidas a quimosina e a lipase do pâncreas do porco como enzimas a serem imobilizadas, enquanto que foi escolhido a quitosana e um organossilicato a base de magnésio, como suportes. As enzimas foram imobilizadas nos suportes produzindo assim um biocatalisador heterogêneo. É importante salientar que os catalisadores insolúveis nos meios reacionais permitiram a recuperação dos catalisadores, permitindo o desenvolvimento de novos trabalhos com ênfase em reutilização. É importante destacar que os catalisadores utilizados proporcionaram a obtenção dos compostos com rendimentos significativos. As estruturas dos compostos obtidos foram caracterizados por meio de métodos espectroscópicos CG/MS, RMN ^1H , ^{13}C e DEPT 135.

Palavras-chaves: Biocatálise; Tio-Michael; Imobilização enzimática

SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
2	Revisão bibliográfica.....	2
2.1	Reação de Michael.....	2
2.2	Biocatálise.....	4
3	Objetivos.....	7
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	8
4.1	MATERIAIS.....	8
4.1.1	Solventes e reagentes.....	8
4.1.2	Catalisadores.....	8
4.1.3	Equipamentos	8
4.2	SÍNTESE DO ORGANOSSILICATO DE MAGNÉSIO.....	8
4.3	Imobilização enzimática	9
4.4	reação de michael com cicloalquenonoas e derivados de tiofenol	10
4.5	Reutilização dos catalisadores	10
5	Resultados e discussões.....	11
5.1	Reutilização do catalisador	14
6	Conclusões	16
7	Referências	17
8	Anexos.....	20

Esquemas

Esquema 1 : Reação de clássica Michael	2
Esquema 2: Reação de tio-michael com catalisador químico	4
Esquema 3: Reação de tio-michael com enzima	6
Esquema 4 Síntese do Butirato Benzílico	7
Esquema 5: Processo geral para imobilização de enzimas em suporte de MgCl ₂	9
Esquema 6: Reação de tio-Michael com enzima suportada	10
Esquema 7 : Reação realizada para estudo da variação da quantidade de biocatalisador sobre rendimentos.....	11

Tabelas

Tabela 1. Reação de tio-Michael biocatalisada envolvendo ciclohexanonas, tiofenol e LPP ou quimosina em EtOH por 2 horas.	11
Tabela 2. Reação de tio-Michael biocatalisada envolvendo ciclohexanonas, tiofenol e LPP ou quimosina em EtOH por 5 horas.	11
Tabela 3. Estudo de variação da quantidade de catalisador sobre os rendimentos.....	12
Tabela 4. Estudo de variação de solvente sobre os rendimentos.....	23
Tabela 5. Estudo de reutilização envolvendo a quimosina imobilizada em suporte de organossilicato de magnésio	14

Figuras

Figura 1 : Estrutura do Ditalzem	3
Figura 2: Estrutura tridimensional da quimosina bovina	14

1 INTRODUÇÃO

A reação de tio-Michael é umas das reações mais úteis, para formar ligações C-S. Essa reação é uma etapa importante na síntese de vários compostos de interesse farmacêutico incluindo a produção de substâncias que estão descritas na literatura como antibióticas, antimicrobianas, analgésicas e anti-HIV.¹ Adições de Michael são tradicionalmente realizadas sob condições ácidas ou básicas que podem originar resíduos perigosos para o ambiente ou produtos secundários indesejados. Essas reações frequentemente necessitam de catálise para obter-se bons rendimentos. Reações mediadas por catálise enzimática vêm sendo estudadas com o objetivo de solucionar problemas como esses.

A biocatálise é uma área emergente, pois é capaz de tornar a rota sintética mais limpa além de cumprir os princípios da química verde. Catalisadores enzimáticos possuem alta seletividade, atividade e especificidade, o que torna a biocatálise mais vantajosa comparada à catálise química. Um pequeno problema encontrado ao utilizar enzimas como catalisadores é como retirá-las do meio reacional, principalmente quando se usa água como solvente, pois a catálise enzimática se torna homogênea. Ao se realizar a imobilização, em suportes com baixa solubilidade torna-se possível converter a catalise homogênea em catalise heterogênea, facilitando assim a retirada do catalisador do meio reacional, tornando-se possível a reutilização e diminuindo o custo do processo, além de estabilizar a enzima prolongando sua vida útil.²

Neste estudo foram utilizados dois suportes, a quitosana e um organossilicato de magnésio. A quitosana ($\beta(1-4)$ -2-amino-2-deoxi-D-glucose) pode ser considerada um bom suporte para enzimas devido à grande presença de grupos amino e hidroxilas disponíveis em sua estrutura, além da presença de grupos de NH_2 em sua molécula possibilitando uma concomitância entre a catálise enzimática e a catálise pelo suporte, possui propriedades hidrofílicas, biocompatível, biodegradável, e antibactericida, tem baixo custo e vem sendo abundantemente empregada em áreas como medicina, agricultura, farmacologia e entre outras.³ O organossilicato de magnésio foi sintetizado pela metodologia de Hasmukh 2008⁴. Esse material possui uma grande quantidade de grupos amina em sua estrutura tornando-se um catalisador promissor por si só, além de uma boa porosidade tornando-se atrativo como um suporte para enzimas.

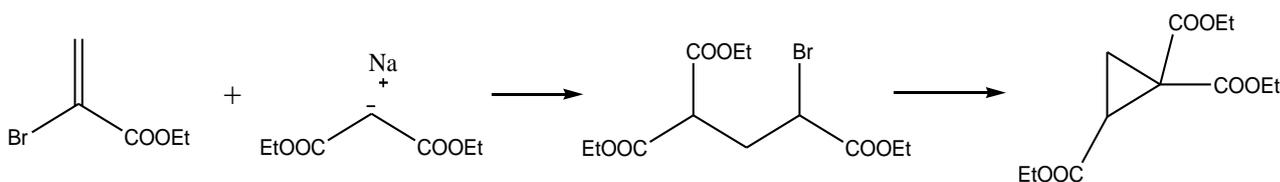
As enzimas utilizadas foram a lipase proveniente do pâncreas do porco (LPP) e a quimosina, nas quais obtiveram ótimos resultados ao serem usadas como catalisadores para as reações de tio-Michael, como relatado por Rizzo et al.⁵ Com base em seu trabalho foi possível realizar uma comparação entre a atividade da enzima livre e da enzima imobilizada, ressaltando as vantagens e desvantagens de cada uma delas.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 REAÇÃO DE MICHAEL

Arthur Michael, Professor de Química Orgânica, morreu em 8 de fevereiro de 1942, em Orlando, Florida, aos 89 anos de idade. Michael nasceu em Buffalo, Nova Iorque, em 7 de Agosto de 1853. Michael foi o primeiro a sintetizar um glicosídeo em 1879, introduzindo, assim, uma metodologia padrão para a rota sintética dessa importante classe de compostos. Em 1887, Arthur realizou a adição de um hidrogênio ativo a um éster ou a composto carbonílico α,β -insaturado, essa reação foi conhecida como reação de Michael, possibilitando várias modificações e transformando-se em uma importante ferramenta para construção de moléculas maiores.⁶

A reação foi realizada de acordo com o (Esquema 1), no qual utiliza-se dietil malonato de sódio (doador de Micheal) e o 2-bromoacrelato de etila (acceptor de Michael) para a produção de derivados de ciclopropano. A reação de Michael, envolve a adição de um nucleófilo (doador de Michael) e um eletrófilo (acceptor de Michael), α,β -insaturado, apresentando um grupo retirador de elétrons.⁶



Esquema 1: Reação clássica de Michael

Diversos aceptores e doadores de Michael podem ser utilizados, com o objetivo de obter-se ligações C-S. A reação de tio-Michael, apresenta uma vasta aplicação sintética para (i) proteção quimiosseletiva da dupla ligação em compostos carbonílicos α,β -insaturado⁷,(ii) para gerar enolatos a partir dos compostos carbonílicos α,β -insaturado⁷ e

(iii) realizar a síntese de medicamentos importante como Diltiazem ⁷ (Figura 1). O Diltiazem pertence ao grupo das benzotiazepinas, um bloqueador 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. Com isso seus principais efeitos são seu poder vaso dilatador, e a redução dos batimentos cardíacos, para usos contra hipertensão.⁸

A reação de tio-Michael pode gerar compostos que são precursores de derivados pirazolínicos e isoxazolínicos⁹. Esses compostos tem uma grande importância na área dos fármacos, visto que estes estão presentes em diversos compostos que apresentam atividade biológica, como anti-inflamatórios¹⁰ e inibidores de leucócito elastase.¹¹

Para que a reação de tio-Michael ocorra, muitas vezes é necessário se fazer a ativação tanto do acceptor de Michael (eletrófilo) como do doador de Michael (nucleófilo). A ativação do nucleófilo pode ser encontrada facilmente na literatura, ao contrário da ativação do acceptor de Michael, tornando a segunda mais atrativa. O composto α,β -insaturado quando apresentar carbonilas pode ser ativado por meio de organocatalisadores ou através de ácidos de Lewis.¹² Ambos os métodos de ativação vem sendo muito estudados. Os organocatalisadores tem como exemplo o bis-*L*-prolinato de zinco (II) e o bis glicinato de zinco (II) ¹³. Os ácidos de Lewis tem como exemplo Bi(OTf)₃ ¹⁴, InBr₃ ¹⁵, Hf(OTf)₃ ¹⁶, alumina em DMSO ¹⁷, InCl₃ ¹⁸ e Cu(BF₄)₂.xH₂O ¹⁹

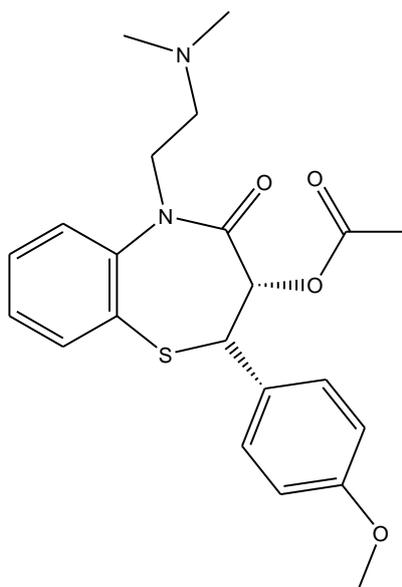
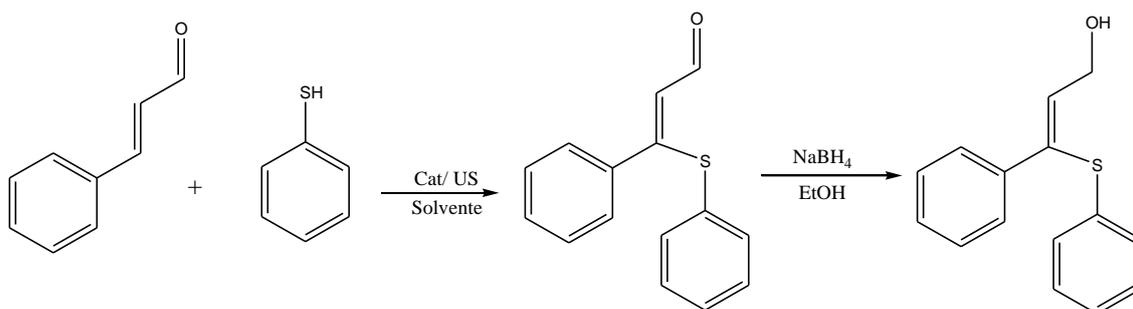


Figura 1: Estrutura do Diltiazem

A ativação do aceptor por meio de ácidos de Lewis possuem um grande número de desvantagens, entre elas estão: longo tempo reacional, necessidades de altas temperaturas, a utilização de sais com custo elevado, à necessidade de condições reacionais anidras, rendimentos moderados, utilização de quantidade estequiométrica do catalisador e estes sais são agressivos ao meio ambiente, tornando assim a reação pouco viável a nível industrial²⁰.

*Darbem et. al*¹³ relatou sobre a utilização de catalisadores heterogêneos na reação de tio-Michael, os quais foram feitos a partir de um aminoácido complexado em um núcleo metálico, como aminoácidos foram usados a L-prolina e a glicina e como metal foi usado o zinco, originando assim o Zn[Pro]₂ e o Zn[Gly]₂. Os rendimentos obtidos foram entre 70-100%, utiliza-se banho ultrassônico, tempo reacional reduzido (60 min) e o catalisador por ser heterogêneo é retirado com facilidade do meio reacional.¹³



Esquema 2: Reação de tio-michael com catalisador químico

O uso de organocatalisadores para a ativação do aceptor de Michael é uma área nova com pouco estudo, mas que já é capaz de mostrar dados promissores.

Partindo do que foi exposto fica evidente a importância de se sintetizar esses compostos de uma forma eficiente e se possível utilizando catalisadores “verdes”, ou seja, catalisadores que não agredem o meio ambiente e que não possuem metais em sua composição. Entre os novos catalisadores, um grupo vem ganhando muita atenção mundialmente, pois promete uma catálise eficiente e limpa, esse grupo é chamado de biocatalisadores.

2.2 BIOCATÁLISE

Através da história da humanidade, os microrganismos tiveram uma enorme importância social e econômica. Mesmo antes de saber sobre sua existência, o homem já fazia uso dos mesmo para produção de comidas e bebidas. Os sumérios e os babilônicos já usavam o processo de fermentação para produzir cerveja antes de 6000 A.C, referências

ao uso de vinho podem ser encontradas no livro do Gênesis e os egípcios usavam trigo para fazer pão. Contudo a produção de substâncias químicas como álcoois e ácidos orgânicos a partir da fermentação só foi relatada recentemente na segunda metade do século 19. Ácido Lático foi provavelmente o primeiro composto opticamente ativo a ser produzido industrialmente em 1880.²¹

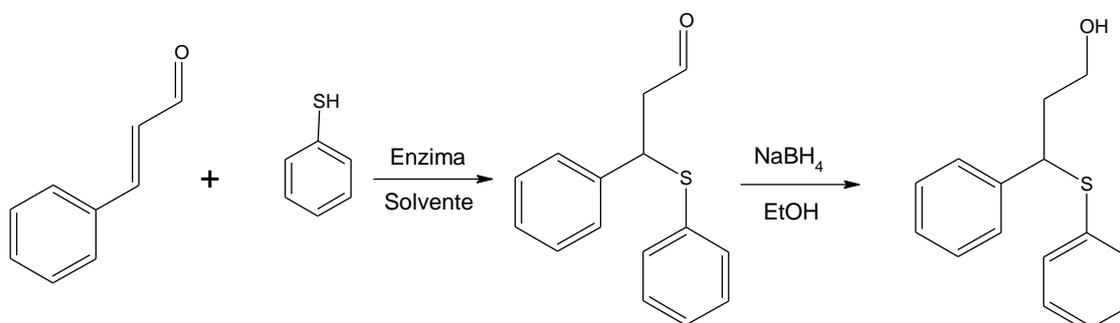
A biocatálise é uma área multidisciplinar que vem chamando muita atenção a nível mundial, devido às inúmeras vantagens que ela promete. Pesquisas realizadas tanto no ramo da química quanto na biologia tem como objetivo o desenvolvimento de novos biocatalisadores para uso industrial. Novas técnicas de biologia molecular, metodologias de seleção de biocatalisadores e novas abordagens de pesquisa, foram desenvolvidas a fim de se explorar a biodiversidade, gerando assim catalisadores cada vez mais específicos e eficientes.²²

O termo biocatálise ou biotransformação abrangem os processos onde um catalisador de origem biológico é utilizado para converter um determinado substrato em um número limitado de etapas enzimáticas. A biocatálise é um ramo com alto interesse industrial. Com isso em mente, é possível traçar dois paralelos para justificar seu grande crescimento nos dias de hoje. Primeiramente, o grande aumento de contratação de cientistas por parte da indústria, principalmente européia, que visa o desenvolvimento de novas tecnologias ou o aperfeiçoamento de processos já estabelecidos pelo ramo, com o fim de otimizar a produção e reduzir custos. O Segundo paralelo seria a grande aderência por parte dos químicos orgânicos ao uso de biocatalisadores, principalmente as enzimas, os quais por muitas vezes se provaram valorosas ferramentas na realização de novas ou difíceis sínteses.²³

Afim de se obter um processo de biocatálise eficaz, é necessária fazer uma análise completa dos fatores que podem interferir em um processo biotecnológico. Sendo assim, uma vez identificada a matéria-prima mais adequada para o substrato, deve-se escolher o biocatalisador com os níveis adequados de atividade catalítica, seletividade e estabilidade para operar nas condições selecionadas de temperatura, força iônica, pH, natureza da solução tampão, concentração de substrato e a de solventes orgânicos.²

Um exemplo de importantes reações químicas feitas por meio de biocatalisadores são as reações de tio-Michael feitas por *Rizzo et al*⁵ utilizando de lipase do pâncreas do porco, quimosina e papaina como biocatalisadores, obtendo-se excelentes rendimentos, além de introduzir na literatura uma nova rota verde para a produção de adutos de Michael

seguindo os princípios da química verde. A reação foi realizada como descrito no esquema 3.⁵



Esquema 3: Reação de tio-michael com enzima

Os biocatalisadores podem ser vistos como a chave que possibilita transformar as sínteses químicas em processos de escala industrial. Como em uma catálise química existem duas opções primordiais, o uso de catalisadores homogêneos ou heterogêneos. A catalise homogênea envolve a utilização de enzima dissolvida em meio aquoso.

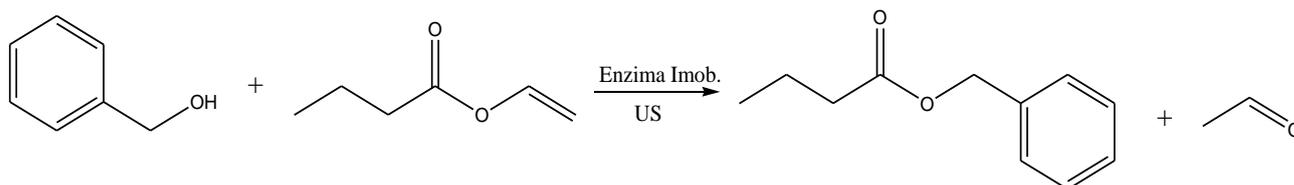
A catálise heterogênea envolve o uso de enzimas em um estado não solúvel, sendo assim preferida no ramo industrial com vantagens na separação e reciclagem, o que torna o processo mais fácil uma vez que as mesmas não são solúveis ao meio, além de possibilitar um processo contínuo e de alta qualidade, diminuindo os gastos da empresa e a poluição do meio ambiente,²⁴ visando o uso desses catalisadores heterogêneos muitos químicos optaram pela utilização de enzimas imobilizadas em materiais porosos, possibilitando assim uma baixa solubilidade e uma alta superfície de contato.

Os usos de enzimas imobilizadas vêm mostrando ótimos resultados em vários ramos da química, como na produção de biodiesel feita por *Amoah et al. 2015*²⁵, onde foi utilizado *Aspergillus oryzae* como suporte para imobilizar a *fusarium heterosporum* lipase, composto o qual foi utilizado para a produção de biodiesel em óleos ricos em fosfolipídios. O processo de imobilização juntamente com um meio abundante em água e uma agitação suave triplicou os rendimentos obtidos anteriormente chegando a rendimentos maiores que 90%.

Outro exemplo encontrado na literatura foi o descrito por *Babaki et al. 2015*²⁶, sendo usadas as seguintes enzimas *Candida antarctica* (CALB), *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e *Rhizomucor miehei* (RML), as mesmas passaram por um processo de imobilização covalente aderindo a um suporte de sílica a base de epóxido

funcionalizado. O biocatalisador gerado foi utilizado na produção de biodiesel por meio de transesterificação de óleo de canola com metanol. O uso das enzimas CALB e RML suportadas forneceram rendimentos de 68% e 45% de rendimento respectivamente, utilizando-se um gradiente de 1:3 de óleo para metanol a 50°C.

Grande parte da área da biocatálise é direcionada a otimização na produção de biodiesel. No trabalho de *Badgajar et al. 2015*²⁷ foi usado uma combinação entre um biocatalisador suportado e ultrassom para gerar uma catálise robusta. A enzima escolhida foi a lipase de *pseudomonas cepacia*: PCL imobilizada em um co-polímero de álcool polivinílico (PVA) e quitosana. A combinação entre o biocatalisador suportado e o ultrassom rendeu o rendimento de 99% na síntese de butirato benzílico como mostrado no Esquema 4. A enzima imobilizada mostrou ser capaz de realizar até cinco reutilizações sem perder sua atividade catalítica mantendo o rendimento sempre muito próximo do inicial. Quando comparado os rendimentos da enzima livre em ultrassom com os da enzima suportada, foi possível observar que enzima suportada superou em 2.4% o rendimento da enzima livre.



Esquema 4 Síntese do Butirato Benzílico

3 OBJETIVOS

- Desenvolvimento de novos biocatalisadores suportados
- Síntese de aduto de Michael com altos rendimentos
- Propor uma nova classe de biocatalisadores para a reação de tio- Michael;

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Solventes e reagentes.

Os reagentes utilizados neste estudo foram: ciclohexenona (Sigma-Aldrich), 3-metilciclohexenona (Sigma-Aldrich), isofurona (Sigma-Aldrich), tiofenol (Sigma-Aldrich), 4-clorotiofenol (Sigma-Aldrich), 4-metoxitiofenol (Sigma-Aldrich), etanol (Dinâmica), Clorofórmio (Dinâmica), hexano (Neon) Acetato de etila (Dinâmica) bicarbonato de sódio (ProQuímicos) todos com grau de pureza P.A. Como secante nas reações utilizou-se o Na_2SO_4 anidro (ProQuímicos) com grau de pureza P.A. Para a purificação em coluna cromatográfica foi usada a sílica gel 60 70-230 Mesh.

4.1.2 Catalisadores

Para a síntese dos catalisadores foram usados: quitosana (Sigma-Aldrich), MgCl_2 (Sigma-Aldrich), (3-aminopropil)trietoxissilano (APTES) (Sigma-Aldrich), glutaraldeído (Sigma-Aldrich), metanol (Dinâmica) e Hidróxido de sódio (ProQuímicos). Entre as enzimas utilizadas estão a lipase tipo II em estado bruto obtida de pâncreas suíno (Sigma-Aldrich), e a quimosina para produção de queijos fornecida pela CR Hansen.

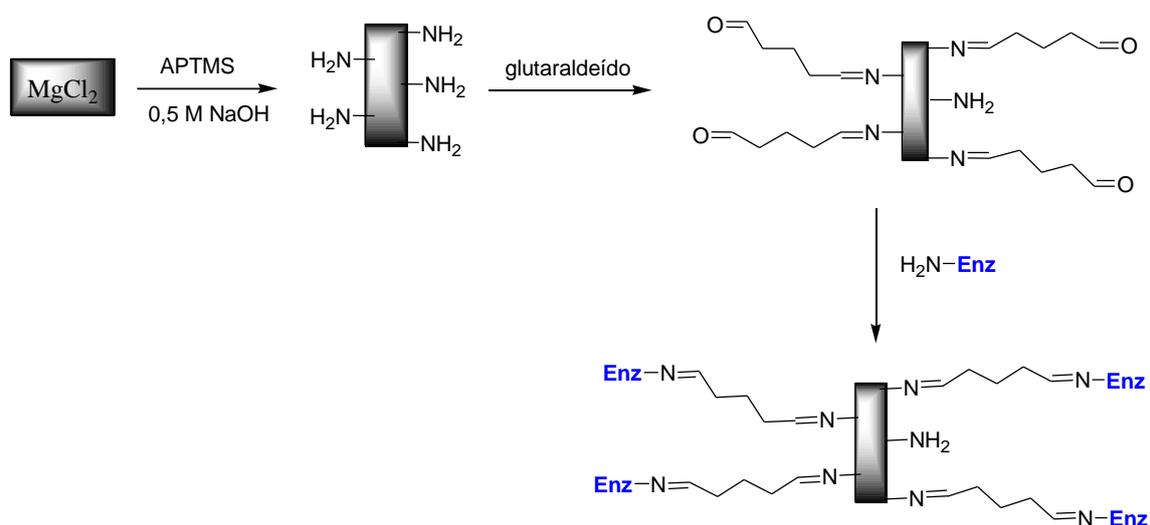
4.1.3 Equipamentos

- Agitador de microplacas MA 562 (Marccone) ;
- Rotaevaporador (Marccone);
- Balança analítica digital (Marte);
- Estufa a vácuo (Marconi).
- Cromatógrafo a gás (Varian 431-CG) acoplado a um detector de massas (Varian 210-MS);
- Espectrofotômetro de IV, FTIR modelo 4000 (Jasco);
- Microscópio Eletrônico de Varredura

4.2 SÍNTESE DO ORGANOSSILICATO DE MAGNÉSIO

Primeiramente, realizou-se a síntese do organossilicato de magnésio (MgCl_2) a partir da metodologia descrita por *Hasmukh*, et al, 2011⁴ com a finalidade de se usar como suporte para a imobilização de enzimas. Para a síntese desse suporte foram utilizados como reagentes o cloreto de magnésio (41,1 mmol) em meio de metanol (200 mL) e APTES (44,2 mmol) em meio de metanol (50 mL). Os dois reagentes foram agitados

durante 5 minutos, posteriormente foi ajustado o pH para 10,5 com o auxílio de uma solução de hidróxido de sódio (10%). O bruto de reação ficou em repouso durante sete dias, após decantar, centrifugou-se e lavou-se o gel formado, após a lavagem, o gel foi seco durante 48 horas em estufa a vácuo a 50 °C (Esquema 6).



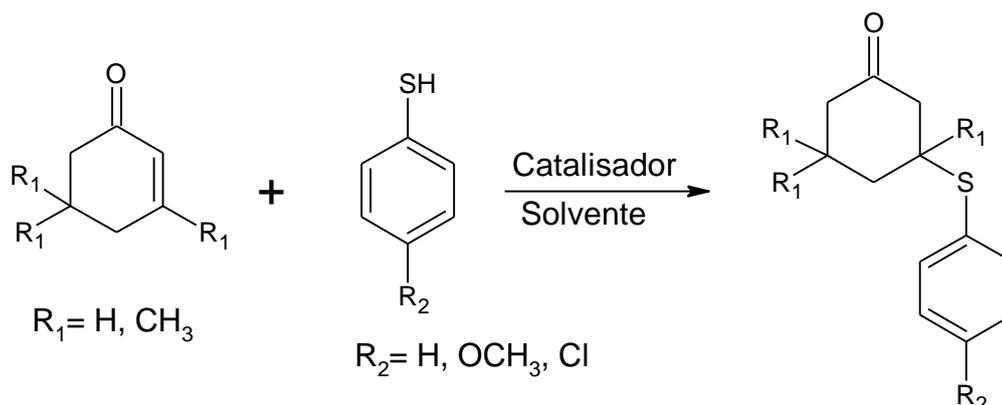
Esquema 5. Processo geral para imobilização de enzimas em suporte de $MgCl_2$.

4.3 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Realizou-se a imobilização enzimática seguindo a metodologia de DEMIR, et al, 2012²⁸ com a finalidade de gerar catalisadores enzimáticos suportados para a utilização nas reações de síntese de adutos de Michael. Esse processo foi realizado para o organossilicato de magnésio e quitosana.

Para a imobilização foram usadas, soluções enzimáticas de lipase e quimosina (45%). O suporte juntamente do glutaraldeído foram adicionados em um balão e agitados durante uma hora a temperatura ambiente, após esse tempo filtrou-se e lavou-se com água destilada intensamente o suporte até a total retirada do glutaraldeído. O produto final foi seco a vácuo. A solução enzimática foi adicionada ao suporte ativo, o qual foi ao agitador de micro placas durante 12 horas, após esse tempo filtrou-se e lavou-se com água destilada intensamente a fim de remover qualquer enzima não imobilizada. O produto final foi seco em temperatura ambiente.

4.4 REAÇÃO DE MICHAEL COM CICLOALQUENONOAS E DERIVADOS DE TIOFENOL



Esquema 6 : Reação de tio-Michael com enzima suportada

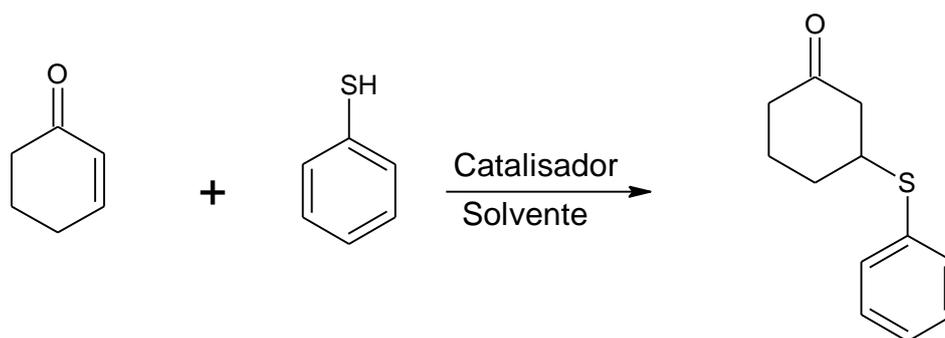
Em erlenmeyer de 50 mL foram adicionados um equivalente mol do composto carbonílico α,β -(2-ciclohexenona, 3-metil-2-ciclohexenona, 3,5,5-trimetil-2-ciclohexenona), 17 mL de etanol e os respectivos catalisadores 40 % massa organossilicato de magnésio e quitosana imobilizados com lipase ou quimosina e por fim o nucleófilo (tiofenol, clorotiofenol, metoxi-tiofenol). Em um agitador de micro placas. As reações foram monitoradas por cromatografia de camada fina ou TLC, e após o tempo de 2 horas os resultados foram descritos na Tabela 1, as reações foram filtradas para a retirada dos catalisadores e em seguida rotaevaporadas. Após, o produto obtido foi extraído em um funil de separação com clorofórmio, água e uma solução de NaHCO_3 10%. As fases orgânicas foram secas com Na_2SO_4 anidro filtrando-se e rotaevaporando-se em seguida. Os produtos 3-(feniltio)ciclohexanona, 3-metil-3-(feniltio)ciclohexanona, 3,3,5-trimetil-5-(feniltio)ciclohexanona, 3-(4-clorofeniltio)ciclohexanona, 3-(4-metoxifeniltio)ciclohexanonas foram purificadas por cromatografia em coluna utilizando-se sílica gel 60 e como eluente a mistura de solventes hexano/acetato de etila (9:1). Os compostos obtidos foram identificados via CG/MS, RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , DEPT 135.

4.5 REUTILIZAÇÃO DOS CATALISADORES

Após realizadas as reações descritas no item anterior o catalisador foi removido e passou por um processo de lavagem/secagem para a reutilização afim de observar o tempo de vida útil do mesmo e a viabilidade de sua reutilização. O catalisador ao ser retirado da reação foi adicionado a um erlenmeyer de 50 ml, no qual foi adicionado metanol (20 mL)

e fixado num agitador de micro placas durante 1 hora, após esse tempo o sólido foi filtrado e lavado abundantemente com água destilada, em seguida secou-se a temperatura ambiente. Os rendimentos obtidos com a reutilização dos catalisadores foram registrados na tabela 5.

5 RESULTADOS E DICUSSÕES



Esquema 7: Reação realizada para estudo da variação da quantidade de biocatalisador sobre rendimentos.

Para provar a atividade catalítica da enzima suportada foi realizada a síntese de adutos de tio-Michael a partir de ciclohexenona e tiofenol sobre agitação durante 2 horas, variando-se o suporte e a enzima imobilizada.

Tabela 1. Reação de tio-Michael biocatalisada envolvendo ciclohexanonas, tiofenol e LPP ou quitosina em EtOH por 2 horas.

Cetona	Fenol	Suporte	Enzima	Rendimento
Ciclohexenona	Tiofenol	Quitosana	LPP	41%
Ciclohexenona	Tiofenol	Quitosana	Quimo	60%
CicloHexanona	Tiofenol	MgCl ₂	LPP	59%
Ciclohexenona	Tiofenol	MgCl ₂	Quimo	60%
Ciclohexenona	Tiofenol	--	--	20%
Ciclohexenona	Tiofenol	--	LPP	76% ^b

^a. Produto purificado via coluna cromatográfica.

^b. Reação feita por *Rizzo et al*⁵.

Ao observarmos os dados da Tabela 1 é possível notar que o rendimento da reação sem catalisador é muito baixo, comprovando assim a eficácia do biocatalisador.

Com os dados de rendimentos apresentados na Tabela 1, passou a tentativa de maximização das variantes como tempo e quantidade enzimática.

No que se refere ao tempo, foram realizadas reações por 5 horas tendo em vista o procedimento descrito por *Rizzo et al*⁵. Observou-se que ambas as enzimas imobilizadas no organossilicato apresentaram um acréscimo no rendimento quando comparadas com dados da literatura⁵ para a enzima livre. Pôde-se concluir que para as enzimas imobilizadas em quitosana, o acréscimo de tempo não conferiu nenhum aumento significativo do rendimento (Tabela 2). Nota-se que o suporte sem a enzima não é capaz de catalisar a reação, uma vez que o rendimento obtido é muito próximo à reação sem a utilização de catalisadores.

Tabela 2. Reação de tio-Michael biocatalisada envolvendo ciclohexanonas, tiofenol e LPP ou quimosina em EtOH por 5 horas.

Cetona	Fenol	Suporte	Enzima	Rendimento ^a (%)
Ciclohexenona	Tiofenol	Quitosana	LPP	43 %
Ciclohexenona	Tiofenol	Quitosana	Quimo	43 %
CicloHexanona	Tiofenol	MgCl ₂	LPP	61 %
Ciclohexenona	Tiofenol	MgCl ₂	Quimo	88%
Ciclohexenona	Tiofenol	MgCl ₂	--	26%
Ciclohexenona	Tiofenol	Quitosana	--	24%
Ciclohexenona	Tiofenol	--	--	25%
Isofurona	Tiofenol	MgCl ₂	Quimo	5%
3-metilciclohexenona	Tiofenol	MgCl ₂	Quimo	10%
Ciclohexenona	OCH ₃ -tiofenol	MgCl ₂	Quimo	75%
Ciclohexenona	Cl-tiofenol	MgCl ₂	Quimo	68,5%

^a Produto purificado via coluna cromatográfica

A segunda variável que foi estudada foi a maximização da quantidade de quimosina imobilizada em organossilicato na reação de tio-Michael envolvendo a ciclohexenona e o tiofenol. Como mostrado na Tabela 3, o aumento gradativo da quantidade de catalisador proporcionou, até a quantidade de 0,08g um aumento dos

rendimentos. O aumento da quantidade de catalisador superior a 0,08g, o rendimento diminui. Este fato pode estar associado à obtenção de subprodutos como, por exemplo, a adição de tióis à carbonila ou possível oxidações do próprio átomo de enxofre.

Tabela 3. Estudo de variação da quantidade de catalisador sobre os rendimentos.

Quantidade de catalisador	Rendimento ^a (%)
0,02g	29%
0,04g	43%
0,08g	88%
0,16g	84%
0,2g	67%

^a Produto purificado via coluna cromatográfica

O estudo para determinar o melhor solvente para a reação entre a ciclohexanona e o tiofenol, tendo a quimosina imobilizada em organossilicato como biocatalisador, foi realizado envolvendo THF, clorofórmio, hexano e EtOH (Tabela 4).

Tabela 4. Estudo de variação de solvente sobre os rendimentos.

Solvente	Rendimento ^a (%)
THF	38,5 %
Clorofórmio	85 %
Hexano	75 %
EtOH	88%

^a Produto purificado via coluna cromatográfica

Pode-se observar na Tabela 4 que os maiores rendimentos foram obtidos usando-se etanol como solvente. Tal fato é muito interessante devido o etanol ser um solvente considerado ambientalmente correto. Esse fato se dá pelo etanol usado ser levemente hidratado, possibilitando que a enzima recupere as moléculas de água perdidas durante a

imobilização. Essa hidratação possibilita que a quimosina adote sua conformação mais ativa para a referida reação.

No tocante às quimosinas, sabe-se que as mesmas apresentam em sua estrutura quaternária moléculas de água ligada a dois resíduos de aspartato. (Barros 2002 – Figura 2)

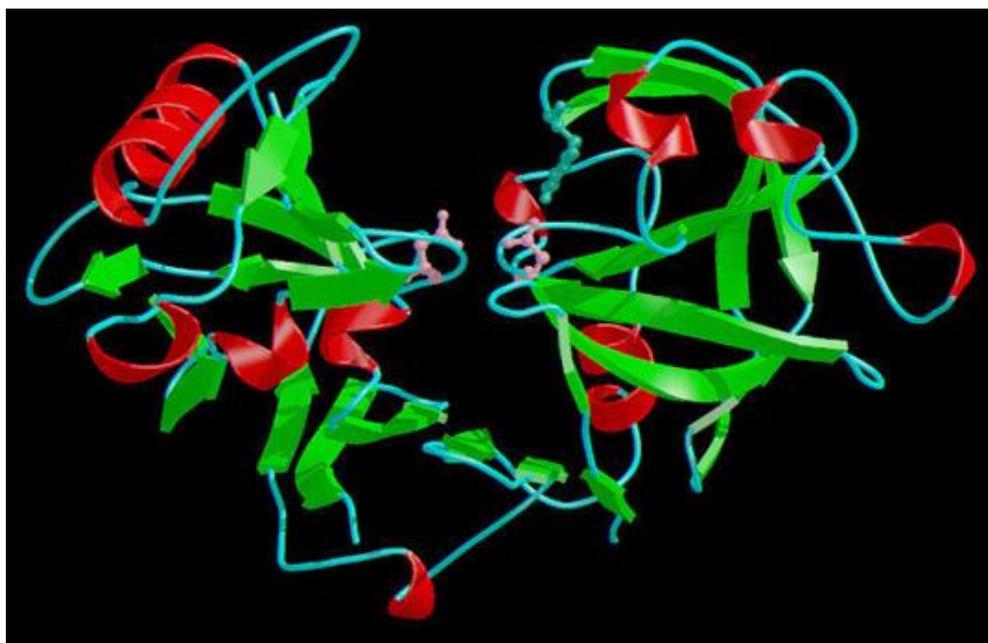


Figura 2. Estrutura tridimensional da quimosina bovina

Logo, solventes sejam polares e que possuam quantidades de água suficiente para a hidratação da quimosina facilitariam o processo catalítico conforme observado na Tabela 4.²⁹

5.1 REUTILIZAÇÃO DO CATALISADOR

É possível comparar os rendimentos obtidos por *Rizzo 2013*⁵ no qual utilizando-se enzimas livres e foram obtidos maiores rendimentos, mas não foi estudado a reutilização das enzimas, uma vez que, os autores descrevem uma dificuldade de retirar totalmente a enzima livre da reação devido a sua parcial solubilidade em etanol. Todavia, no presente estudo, realizou-se a tentativa de reutilização da enzima suportada (Tabela 5), pois o suporte, *a priori*, facilita a retirada do biocatalisador do meio reacional e a sua reutilização.

Todas as reações seguiram o mesmo padrão das anteriores utilizando-se ciclohexenona e tiofenol como reagentes, e o tempo de 5 horas. Os rendimentos obtidos foram registados na tabela 5.

Tabela 5. Estudo de reutilização envolvendo a quimosina imobilizada em suporte de organossilicato de magnésio.

Experimento	Rendimento ^a (%)	Δ Rendimento(%)
1º	88%	-
2º	52%	-36
3º	46%	-6
4º	20%	-26
5º	14%	-6

^c Produto purificado via coluna cromatográfica

Com a reutilização do biocatalisador, é possível notar um decréscimo nos rendimentos, devido a fatores como, a degradação de parte dos sítios ativos da enzima durante o processo reacional, tornando-a ineficaz após a reação. Além dessa hipótese, podemos inferir que, devido à imobilização, a estabilidade dos sítios ativos pode ser comprometida, fazendo a atividade catalítica decair com o passar de alguns dias.

Ao comparar com o trabalho de *Rizzo et al*⁵ foi possível notar que ao imobilizar as enzimas o rendimento final obtido foi bem próximo ao da enzima livres, todavia, em um tempo maior (5horas). Porém, foi possível a retirada e posterior inserção do catalisador em outros ciclos, mas podemos observar na Tabela 5, os rendimentos decaem a cada ciclo.

A enzima imobilizada que melhor se destacou foi a quimosina, diferente da reação com enzima livre, na qual a LPP se destaca. Devido a maior facilidade de retirada do biocatalisador imobilizado do meio reacional, foi possível efetuar uma série de reutilizações, procedimento o qual se torna bastante difícil utilizando-se de enzimas livres.

6 CONCLUSÕES

Conclui-se que os biocatalisadores sintetizados mostraram-se eficientes na catálise da reação de tio-Michael, sendo de suma importância para a efetividade da reação e possibilitando a obtenção de compostos com rendimentos satisfatórios. São de fácil manuseio, possibilitando a retirada do meio reacional e até mesmo uma posterior reutilização.

Nas reações utilizando a quimisina imobilizada no organossilicato de magnésio, observa-se que o rendimento do composto de interesse foi maior em solventes como EtOH e clorofórmio, porém para contribuição ambiental e com o propósito de estimular os princípios da química verde priorizou-se o solvente mais ambientalmente correto, o EtOH.

Posteriormente foi analisado a porcentagem ótima para essa enzima, sendo que a mesma proporcionou melhor rendimento foi utilizando-se 0,8g de enzima em 5 horas reacionais, e o seu uso à em quantidades diferentes desta resultou em uma diminuição no rendimento.

Através deste mesmo procedimento analisou-se que o uso de biocatalisadores suportados, possibilita a reutilização dos mesmo, visto que a segunda reação se utilizando do mesmo biocatalisador atingiu um rendimento de aproximadamente 60% do rendimento inicial.

7 REFERENCIAS

1. NGUYEN-BA, Nghe et al. Synthesis and anti-HIV activity of 1,3-dithiolane nucleosides. *Chem. Commun*, Québec, Canadá, p.1245-1246, (1999).
2. AIRES-BARROS, M.R. Biocatálise em solvente orgânico; *Boletim de biotecnologia*, Lisboa, p. 1-19 . (2002).
3. OLIVEIRA, R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana; *Química Nova*, Brasil, p.932-939 (2006).
4. HASMUKH A.P; SUMEET K.S; RAKSH V.J. Synthetic talc as a solid base catalyst for condensation of aldehydes and ketones. *Journal of molecular catalysis A: Chemical*, India 31-40 (2008)
5. RIZZO, P.V.S.; BOARIN, L.A.; FREITAS, I.O.M.; GOMES, R. S.; BEATRIZ, A.; RINALDI, A. W.; DOMINGUES, N.L.C. The study of biocatalyzed thio-Michael reaction: a greener and multi-gram protocol. *Tetrahedron Lett.* Brasil, 430-434 (2014).
6. FIESER, L.F. *ARTHUR MICHAEL* Washington D.C. National Academy of sciences, 38 (1975).
7. MICHAEL, Arthur. Ueber die Addition von Natriumacetessig- und Natriummalonsäureäthern zu den Aethern ungesättigter Säuren. **Journal Für Praktische Chemie**, Alemanha, p.349-356, (1887)
8. O'CONNOR, S. E.; GROSSET, A.; JANIAC, P. The pharmacological basis and pathophysiological significance of the heart rate-lowering property of diltiazem; *Fundam. Clin. Pharmacol.* p. 145–153, (1999).
9. SKARZEWSKI, J.; SIEDLECKA, R.; WOJACZYŃSKA, E.; ZIELINSKA-BŁAJET, M. A new and efficient route to homochiral γ -hydroxysulfoxides and γ -hydroxysulfones.; *Tetrahedron: Asymmetry*. 13, p.2105–2111, (2002).
10. FRIGOLA, J.; COLOMBO, A.; PARES, J.; MARTINEZ, L.; SAGARRA, R.; ROSTER, R. Synthesis, structure and inhibitory effects on cyclooxygenase, lipoxygenase, thromboxane synthetase and platelet aggregation of 3-amino-4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives; *Eur. J. Med. Chem.* 24, p. 435-445, (1989)
11. GROUTAS, W. C.; VENKATAMAN, R.; CHONG, L. S.; YODER, J. E.; EPP, J. B.; STANGA, M. A.; KIM, E. Isoxazoline Derivatives as Potential Inhibitors of the Proteolytic Enzymes Human Leukocyte Elastase, Cathepsin G and Proteinase 3: a Structure-Activity Relationship Study; *Bioorg. Med. Chem.* p.125-128, (1995).

12. KANEMASA, S. Catalyzed Enantioselective Conjugate Addition Reactions of Strongly Coordinating Nucleophiles *Journal of synthetic organic chemistry, Japan*. p.1073-1081, **(2003)**.
13. DARBEM, M.P; OLIVEIRA, A.R; WINCK, C. R; RINALDI, A. W; DOMINGUES, N. L.C. Hybrid material from Zn[aminoacid]₂ applied in the thio-Michael synthesis. *Tetrahedron* p. 5179-5181 **(2014)**.
14. ALAM, M. M.; VARALA, R.; ADAPA, S. R. Conjugate addition of indoles and thiols with electron-deficient olefins catalyzed by Bi(OTf)₃; *Tetrahedron*. p. 5115-5117, **(2003)**.
15. BANDINI, M.; COZZI, P. G.; GIACOMINI, M.; MELCHIORRE, P.; SELVA, S.; UMANI-RONCHI, A. Tandem one-pot InBr₃ catalyzed 1,2-1,4 nucleophilic addition to enones. Designing the synthesis of poly-functionalized compounds with atom-efficient processes; *J. Org. Chem.* 67, p. 3700-3704, **(2002)**.
16. KOBAYASHI, S.; OGAWA, C.; KAWAMURA, M.; SUGIURA, M.; *Synlett*. 983, **(2001)**.
17. CHENG, S.; COMER, D. D. An alumina-catalyzed Michael addition of mercaptans to N-anilinomaleimides and its application to the solution-phase parallel synthesis of libraries; *Tetrahedron Letters*. p. 1179-1181, **(2002)**.
18. RANU, B. C.; DEY, S. S.; SAMANTA, S. Indium (III) chloride-catalyzed Michael addition of thiols to chalcones: a remarkable solvent effect *Arkivoc*, p.44-55, **(2005)**.
19. GARG, S. K.; KUMAR, R.; CHAKRABORTI, A. K. Copper (II) tetrafluoroborate as a novel and highly efficient catalyst for Michael addition of mercaptans to α , β -unsaturated carbonyl compounds, *Tetrahedron*. p.1721-1724 **(2005)**.
20. KHATIK, G.; SHARMA, G.; KUMAR R.; CHAKRABORTI, A. Scope and limitations of HClO₄-SiO₂ as an extremely efficient, inexpensive, and reusable catalyst for chemoselective carbon-sulfur bond formation.; *Tetrahedron*. 67, p.1200-1210, **(2007)**.
21. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA. Second edition. Germany: Betz Druck GmbH, Darmstadt, **(2006)**, 550.
22. CONTI, R; RODRIGUES, J.A.R; MORAN, J.S. Biocatálise: avanços recentes *Química Nova*. p.672-675 **(2001)**
23. SCHMID, A; DORDICK, J.S; HAUER, B; KIENER, A; WUBBOLTS, M; WITHOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*. p.258-268 **(2001)**.

24. J.M. BOLIVAR, ET AL. Advances characterization of immobilized enzymes as heterogeneous biocatalysts, *Catalysis. Today* p. 200-215 (2015).
25. AMOAH, J; SHINJI,S.H; YOSHIDA, H.A; TOMOHISA, A.N; OGINO,H.C; KONDO,A. converting oils high in phospholipidsto biodiesel using immobilized *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalysts expressing *Fusarium heterosporum* lipase. *Biochemical Engineering Journal*. p. 312- 345 (2015).
26. BABAKI, M;YOUSEFI, M; HABIBI, Z;BRASK, J; MOHAMMADI, M. Preparation of highly reusable biocatalysts byimmobilization of lipaseson epoxy-functionalized silica for production of biodiesel from canola oil. *Biochemical Engineering Journal*.23-31 (2015).
27. BADGUJAR, K.C; BHANAGE, B.M; The combine use of ultrasound and lipase immobilized on co-polymer matrix for efficient biocatalytic application studies. *journal of molecular catalysis B:Enzymatic* p. 45-86 (2015).
28. DEMIR, S.; GÖK, B. S.; KAHRAMAN, M. α -Amylase immobilization on functionalized nano CaCO₃ by covalent attachment. *Starch/Starke*. p. 3-9 (2012)
29. BARROS, M. R. A. Biocatálise em solvent orgânico: ensino em biotecnologia. Boletim da Sociedade portuguesa de Biotecnologia, p. 22-29, (2002).
30. Disponível em <<http://www.merops.sanger.ac.uk/>> acessado em 02 de Novembro de 2015.

8 ANEXOS