



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CFM- CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO**



LIPASES COMO BIOCATALISADORES NA EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DO CICLOEXENO

Thiago Bergler Bitencourt

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento
CO-ORIENTADOR: Marcelo Alves Moreira**

Florianópolis, fevereiro de 2004.

AGRADECIMENTOS

A Deus,

A minha família, Pai, Mãe, Dhiego e Carol, pelo apoio nos meus estudos e por todo amor que sempre recebi. Razão da minha vida.

A minha orientadora, Profa. Maria da Graça Nascimento pelo incentivo e orientação nos meus trabalhos, e pelas oportunidades que me proporcionou. Minha gratidão.

Ao co-orientador e amigo Marcelo Alves Moreira, pelo companheirismo, incentivo e boas risadas no laboratório, minha gratidão.

Aos amigos do Laboratório de Biocatálise, (Damianni, Sandra, Roberto, Rogério, Carina, Giselle, Patrícia e Leandro), pelo carinho, amizade e bate-papos no laboratório.

Ao pessoal que mora comigo, João, Marcelo, Sandro, Rafael, Dheleon. Minha segunda família.

A Criscie, minha namorada, pelo carinho e companheirismo.

Ao Departamento de Química, (funcionários, bolsistas e professores) pela atenção dispensada.

A PRAC, pelas bolsas de treinamento me concedidas, e pelo suporte em congressos e encontros estudantis.

Ao aluno de doutorado Fernando Ely, pelo fornecimento de ácido decanóico e cicloexeno, necessários para o término do trabalho.

A Central de Análises, por tornar possível nosso trabalho, com suas análises.

A UFSC, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro e facilidades concedidas.

A Amano e a Novozymes, pelo fornecimento das enzimas.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	vii
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Enzimas.....	01
1.2. Lipases.....	05
1.3. Imobilização de Enzimas.....	09
1.3.1. Sistema Bifásico.	10
1.4. Epóxidos.....	11
1.5. Peróxi-ácidos.....	12
1.6. Epoxidação.....	12
1.6.1. Epoxidação Eletrofilica por Peróxi-ácidos.....	13
1.6.2. Epoxidação Via Haloidrinas.....	14
1.6.3. Epoxidação Químio-Enzimática de Alcenos.....	15
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivo Geral.....	17
2.2. Objetivos Específicos.....	17
3. METODOLOGIA	
3.1. Reagentes, Solventes e lipases utilizadas	18
3.2. Equipamentos e Caracterização dos Produtos	18
3.3. Sistema Bifásico.....	19
3.4. Métodos Experimentais.....	19
3.4.1.Preparação do Cicloexeno.....	19
3.4.2. Reações de Epoxidação Químio-Enzimática em Sistema Bifásico (Sistema Padrão).....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1. Influência do tipo de doador acila.....	22
4.2. Influência da quantidade de doador acila.....	23
4.3. Influência da massa de lipases no sistema reacional.....	24
4.4. Influência do tempo.....	26
5. CONCLUSÕES FINAIS.....	28
6. PERSPECTIVAS.....	29
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
8. PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS E EVENTOS CIENTÍFICOS.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ligação de aminoácidos para a formação de um peptídeo.....	01
Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de ação enzimática.....	02
Figura 3. Diagrama de energia de uma reação na ausência ou na presença de um catalisador	02
Figura 4. Utilização relativa de enzimas em biotransformações.....	04
Figura 5. Representação gráfica por Raio X da lipase de <i>Candida antarctica</i> destacando o seu sítio ativo.....	05
Figura 6. Mecanismo proposto para hidrólise enzimática de um éster.....	06
Figura 7. Resolução enzimática de α -metileno β -hidróxi ésteres.....	07
Figura 8. Síntese enzimática de um intermediário quiral para a formação do Epothilone A.....	08
Figura 9. Epoxidação do α -pineno, mediada pela lipase de <i>Cândida antarctica</i> (Novozym 435)	08
Figura 10. Representação gráfica dos principais métodos de imobilização de enzimas.....	10
Figura 11. Processo industrial de epoxidação do eteno, por oxidação catalítica.....	13
Figura 12. Mecanismo de epoxidação de alcenos via peróxi-ácidos.	14
Figura 13. Reação de epoxidação via haloidrinas.....	14
Figura 14. Epoxidação quimio-enzimática de alcenos.....	15
Figura 15. Epoxidação quimio-enzimática do ácido oleico.....	15
Figura 16. Síntese enantiocontrolada de S-Naproxen e S-Ibuprofen mediada pela lipase pancreática do porco (LPP)	16
Figura 17. Representação gráfica de um sistema bifásico.....	19
Figura 18. Espectro de RMN- ^1H , de uma alíquota da fase orgânica da reação de epoxidação quimio-enzimática do cicloexeno, utilizando a Novozym 435 (50mg), 30°C, 6h em tolueno, (CDCl_3 , 200 MHz), 73 % de conversão em epóxido.	20
Figura 19. Equação geral das reações estudadas neste trabalho.	21
Figura 20. Conversão em epóxido (%) do cicloexeno em função do doador acila empregado, em sistema bifásico, com as lipases Novozym 435 e LPS(50mg), H_2O_2 (30%, 1mL), 30°C, 24h em tolueno.	22
Figura 21. Variação da conversão em epóxido de cicloexeno catalisada pelas lipases Novozym 435(50mg) e PS(100mg), em função de diferentes quantidades (mmol) de ácidos carboxílicos. 30°C, 24 h, H_2O_2 (30%) em tolueno.	23

Figura 22. Conversão em epóxido de cicloexeno (%) em função da quantidade de Novozym 435 empregada, ác. octanóico e cicloexeno = 5mmol, 30°C, H ₂ O ₂ (30%, 1mL) , 9h em tolueno.....	25
Figura 23. Conversão em epóxido de cicloexeno (%) em função da quantidade de LPS empregada, ác. decanóico e cicloexeno = 5mmol, 30°C, H ₂ O ₂ (30%, 1mL), 24h, tolueno.	25
Figura 24. Influência do tempo na epoxidação quimio-enzimática do cicloexeno em sistema bifásico, 30°C, H ₂ O ₂ (30%), em tolueno.	26
Figura 25. Concentração de epóxido formado em função do tempo de reação até 9 h, a 30°C, H ₂ O ₂ 30%, 1mL, R = 0,9776.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

Siglas

IUBMB = União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

Abreviaturas

%c = porcentagem de conversão

Ác. = ácido

Asp = Aspartato

CMC = carboximetilcelulose

Conv. = conversão

col = Colaboradores

eep = Excesso enantiomérico

Glu = Ácido glutâmico

His = Histidina

IV = Infravermelho

LPP = lipase pancreática do porco

LPS = lipase de *Pseudomonas* sp.

N^o = número

PEO = poli-óxido de etileno

PVA = álcool polivinílico

Qtde = Quantidade

RMN – ¹H = Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

Ser = Serina

RESUMO

As enzimas, são catalisadores protéicos, que em condições ótimas de temperatura e pH aceleram as reações químicas. Em síntese orgânica, podem ser imobilizadas em vários suportes afim de que se minimize a perda de atividade, tornando-se assim uma ferramenta importante.

Baseado em trabalhos anteriores, o objetivo deste trabalho foi investigar, alguns parâmetros da reação de epoxidação químio-enzimática do cicloexeno em sistema bifásico.

A influência do doador acila foi verificada em função do seu tipo e quantidade. Os ácidos utilizados foram: ácido propanóico, butanóico, hexanóico, octanóico, decanóico e láurico. Os resultados demonstraram maiores conversões em epóxido utilizando ácidos de cadeias alquílicas maiores e quantidades superiores a 2,5 mmoles do doador acila, com a Novozym 435 e a lipase de *Pseudomonas* sp (LPS).

Outro parâmetro verificado foi a massa de enzima empregada neste sistema, observando a partir dos resultados uma dependência entre a massa de enzima e a conversão em epóxido. Com a Novozym 435, as conversões mantiveram-se praticamente constantes (~82%) a partir de 35 mg de lipase em 9h de reação e com a LPS, as conversões em epóxidos mantiveram-se constantes em ~96% a partir de 125mg em 24h de reação.

Em uma outra etapa foi realizado um estudo da conversão em epóxidos em função do tempo de reação. Os resultados desse estudo mostram, que após 9h, é possível obter epóxidos de cicloexeno com ~85% de conversão, a uma taxa de $2,1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

1. INTRODUÇÃO

1. 1. Enzimas

Enzimas são proteínas com funções catalíticas de inúmeras reações biológicas (as reações podem ser aceleradas em até 10^{12} vezes se comparadas as reações sem a presença de enzimas).¹ Por tal propriedade são empregadas cada vez mais em sínteses orgânicas.² Como outras proteínas, são formadas por uma longa cadeia de aminoácidos, ligados através de ligações peptídicas. **(Figura1)**

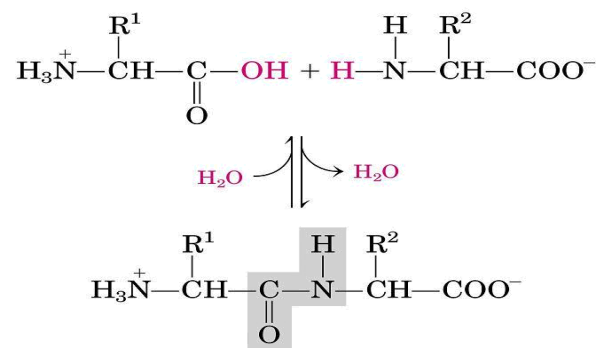


Figura 1. Ligação de aminoácidos para a formação de um peptídeo.

A seqüência exata de aminoácidos em uma proteína é chamada de estrutura primária. A conformação tridimensional é chamada de estrutura secundária e a disposição espacial da seqüência é designada como estrutura terciária.

Diversos processos no metabolismo dos seres vivos são regidos por enzimas, que em seu meio “ótimo” de pH, salinidade e temperatura tornam-se favoráveis.³

Uma outra característica é que são altamente específicas, ou seja, geralmente catalisam um tipo ou uma determinada reação. Essa especificidade só ocorre devido ao formato de seu sítio catalítico, que só atua em moléculas com configuração bastante precisa.³ **(Figura 2)**

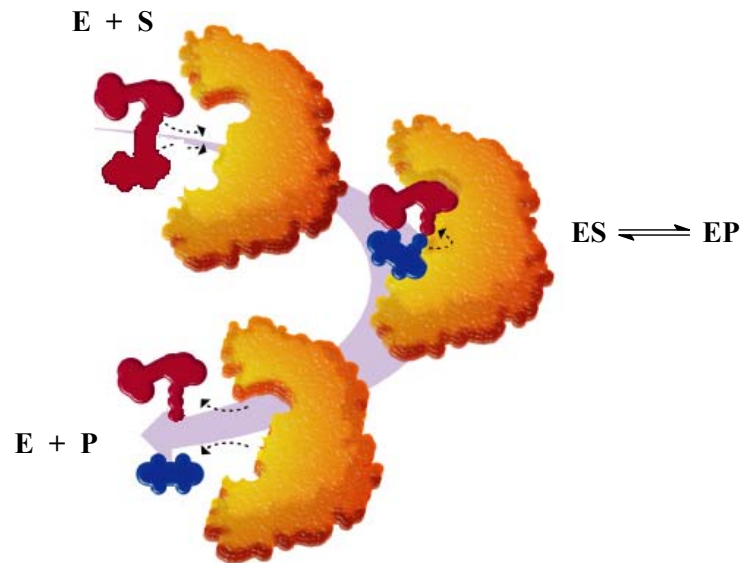


Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de ação enzimática.⁴

Grande parte do poder catalítico das enzimas é devido elas aproximarem os substratos em orientações favoráveis, diminuindo assim a barreira energética no complexo enzima-substrato.⁵ (**Figura 3**)

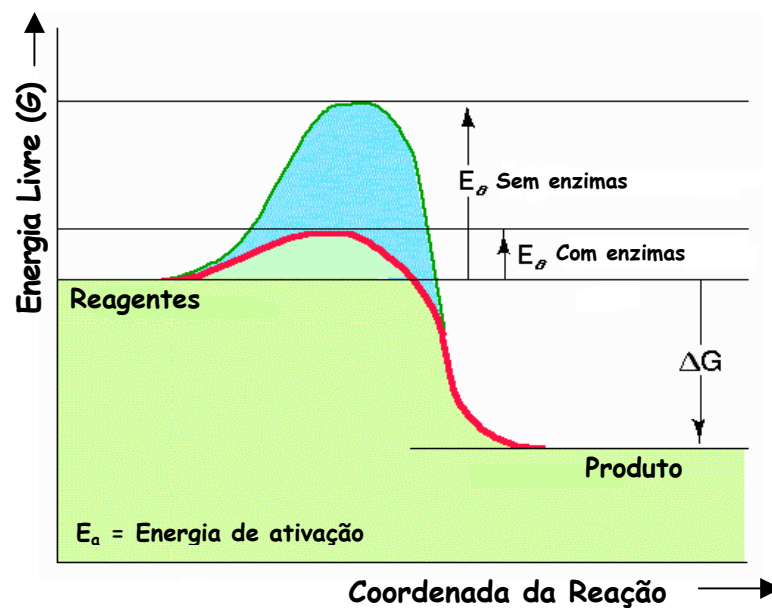


Figura 3. Diagrama de energia de uma reação na presença e ausência de um catalisador.

Conforme a sua atividade, as enzimas são classificadas segundo a IUBMB - International Union of Biochemistry and Molecular Biology - em seis classes distintas designadas por um nome recomendado nas quais estão inclusas sub-classes com os nomes relacionados ao tipo de reação que catalisam.⁵

Classe de Enzimas	Algumas Subclasses	Reações catalisadas
Oxidorrredutases	Hidrogenases, Oxidases, Peroxidases	Oxidação e redução: oxigenação de ligações C-H, C-C, C=C, C=O
Transferases	Transaldolases, Transcetolases	Transferência de grupos: aldeídico, cetônico, acila, fosforila, metila
Hidrolases	Estearases, Lípases, Peptidases	Formação e hidrólise de ésteres, amidas, epóxidos, nitrilas e anidridos
Liases	Descarboxilases, Cetoácidosliases	Adição e eliminação de pequenas moléculas sobre ligações C=C, C=O, C=N.
Isomerases	Racemases, Epimerases, Mutases	Isomerizações tais como racemização, epimerização.
Ligases	Sintetases	Formação e clivagem de ligações C-O, C-S, C-N, C-C.

O uso de microrganismos e/ou enzimas vem sendo explorado e utilizado com muita freqüência em laboratórios acadêmicos, bem como nas indústrias químicas e farmacêuticas.^{6, 7, 8}

Conforme Loughlin e outros autores, as enzimas possuem certas vantagens em reações de síntese orgânica:^{9, 10}

- ⇒ são catalisadores de alta eficiência – as velocidades de reação via enzimática são maiores se comparadas a catálise química;
- ⇒ atuam sob condições suaves de temperatura (20 – 40 °C);
- ⇒ podem catalisar reações em regiões pouco reativas da molécula;
- ⇒ quimiosseletividade – podem atuar em somente um tipo de grupo funcional mesmo na presença de outros grupos funcionais reativos;
- ⇒ regiosseletividade e diastereosseletividade – as enzimas podem distinguir entre grupos funcionais com a mudança do meio reacional;

- ⇒ enantiosseletividade – são catalisadores quirais e sua especificidade pode ser explorada para sínteses seletivas e assimétricas;
- ⇒ não são restritas aos seus substratos naturais;
- ⇒ catalisam reações em meios não aquosos, embora as vezes, se observe perda de atividade.

As enzimas hidrolíticas (proteases, celulases, amilases e lipases) são as mais freqüentemente utilizadas em síntese orgânica. Entre as várias razões que as tornam mais atrativas, pode se citar a ampla disponibilidade, baixo custo, condições brandas de síntese, facilidade no seu uso e aplicação.²

(Figura 4)

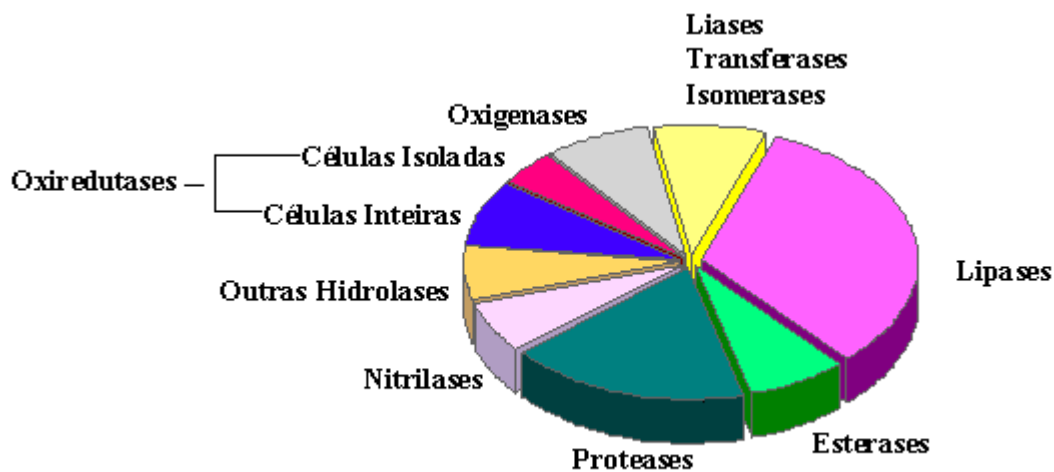


Figura 4. Utilização relativa das enzimas em biotransformações.²

1. 2. Lipases

As lipases (3.1.1.3.triacilglicerol hidrolases) são enzimas hidrolíticas presentes em diversos organismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias. Possuem massa molecular em torno de 40 a 50 kDa, com mais ou menos 300 resíduos de aminoácidos. Em seu meio natural possuem a habilidade de catalisar hidrólise de ésteres, especificamente triacilgliceróis em ácidos graxos livres, di e monoacilglicerol e glicerol. Também possuem a função de catalisar a reação inversa executando esterificações, transesterificações (acidólise, interesterificação, alcoólise), aminólise e tiotransesterificação em solvente orgânico anidro, sistema bifásico e em solução micelar com alta especificidade.^{3, 11}

Conforme citado na seção 1.1, as principais vantagens de seu uso, são o baixo custo, grande disponibilidade comercial, não requerem cofatores, trabalham numa faixa grande de pH e sua alta estabilidade.^{2, 10, 11}

As lipases cujas estruturas foram elucidadas, são membros da família α - β -hidrolase e possuem uma tríade catalítica constituída dos resíduos de aminoácidos, serina, histidina e ácido aspártico ou glutâmico. (Ser-His-Asp/Glu). A **Figura 5** mostra a representação gráfica obtida por cristalografia de raio X da estrutura da lipase de *Candida antarctica*, destacando o seu sítio ativo.¹²

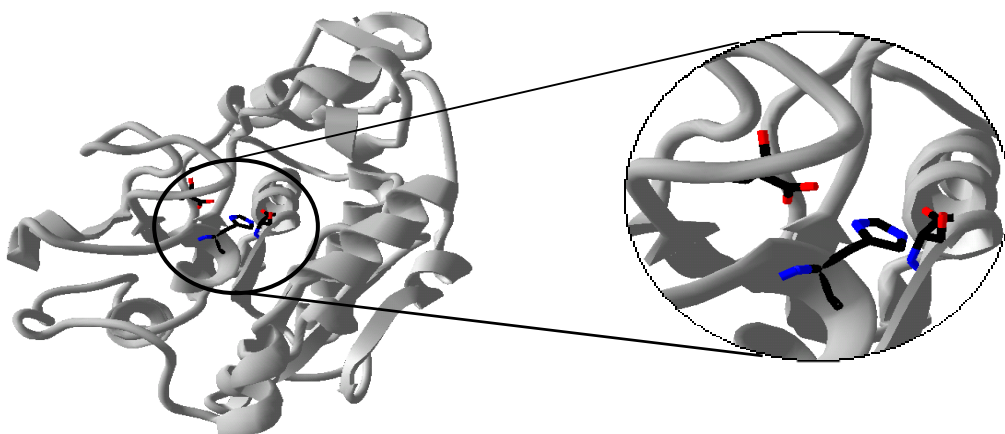


Figura 5. Representação gráfica da estrutura tridimensional da lipase de *Candida antarctica*, destacando o seu sítio ativo.¹²

Essas enzimas possuem um mecanismo comum de hidrólise de ésteres, que consiste em cinco etapas:^{13, 14}

1. Ligação ao substrato éster;
2. Formação do primeiro intermediário tetraédrico por ataque nucleofílico da serina catalítica, com o oxianion estabilizado por duas ou três ligações de hidrogênio, a chamada “cavidade oxianion”;
3. Quebra da ligação éster;
4. Saída da porção alcoólica;
5. Hidrólise do intermediário acil-enzima.

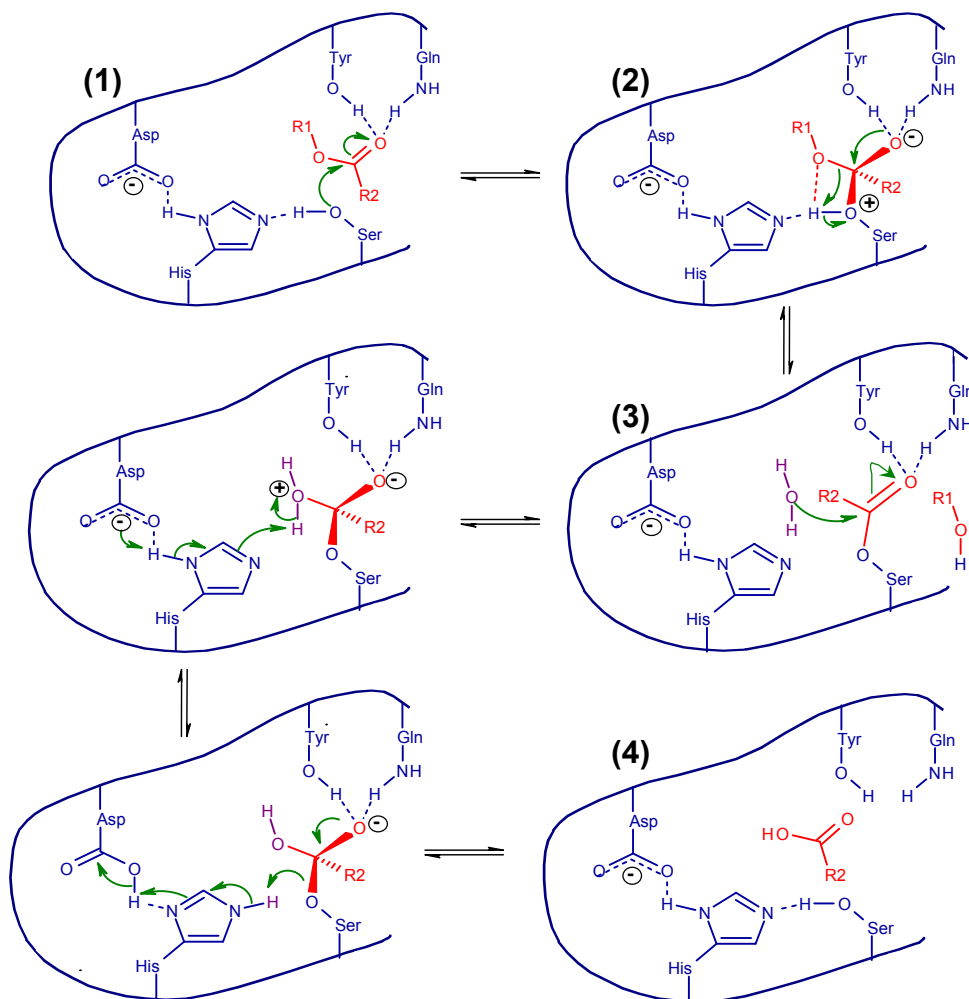


Figura 6. Mecanismo proposto para a hidrólise enzimática de um éster.^{13, 14}

As lipases apresentam a capacidade de preservar sua atividade catalítica em solvente orgânico.⁶ Devido a esta propriedade, seu potencial para conversão de excesso de gordura e óleos em produtos para usos industriais está sendo amplamente investigado.¹⁵ Além disso, elas apresentam inúmeras aplicações na resolução de misturas racêmicas.

A resolução cinética dos produtos das reações de Baylis-Hillman é um dos métodos mais convenientes para obtenção de moléculas multifuncionais opticamente ativas.¹⁶ Nascimento e col., recentemente realizaram a transesterificação enantiosseletiva de diferentes α -metileno- β -hidroxi ésteres catalisada por lipase de *Pseudomonas* sp (LPS) livre ou imobilizada em poli(óxidoetileno) (PEO). Obtiveram-se valores de eep de 99% e conversão de 50% do isômero S.¹⁷ (**Figura 7**).

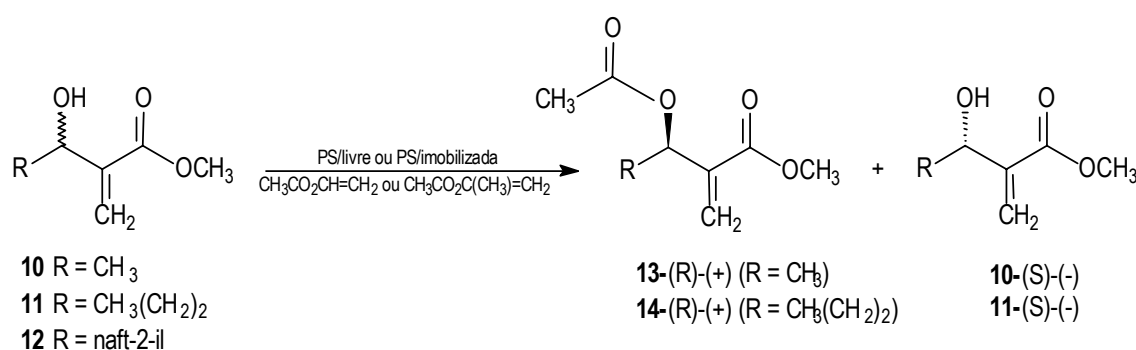


Figura 7. Resolução Enzimática de α -metileno β -hidróxi ésteres.¹⁷

Na síntese de fármacos, pode-se destacar o trabalho de Jaeger e col., que estudou a síntese de um intermediário opticamente puro para a produção do Epophilone A, um agente antitumoral com a lipase de *Pseudomonas* AK.¹⁸ (**Figura 8**)

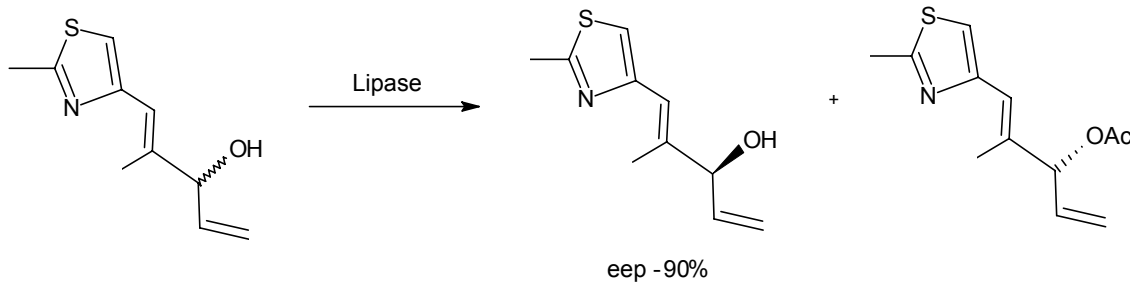


Figura 8. Síntese enzimática de um intermediário quiral para a obtenção do Epothilone A.

Uma grande aplicação das lipases se encontra na síntese de epóxidos, via formação de peróxi-ácidos. Este tipo de reação vem sendo estudada extensivamente, devido a facilidade de se obtê-los em condições brandas de reação temperatura ambiente e pH neutro.

Skouridou e col., utilizaram a Novozym 435 (lipase de *Candida antarctica*), para a epoxidação do α -pineno, com a formação de peróxi-ácido *in situ*.¹⁹

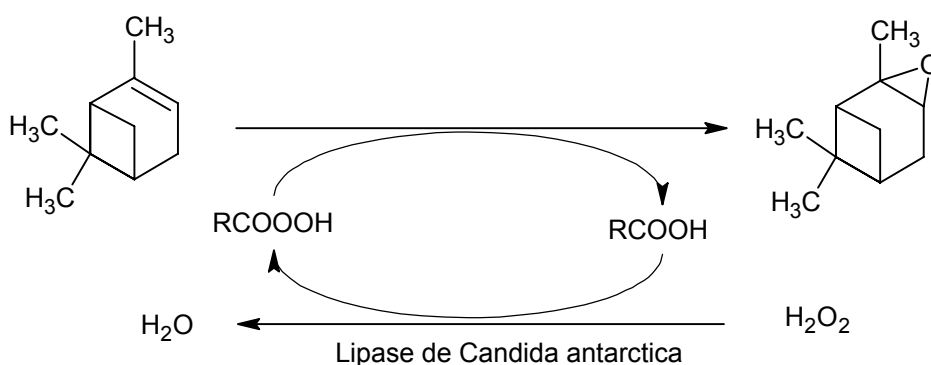


Figura 9. Epoxidação do α -pineno, mediada pela lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435).

1.3. Imobilização de Enzimas

A utilização de enzimas em síntese orgânica tem sido extensivamente explorada.^{2, 20} Porém, o grande problema, é que estes biocatalisadores podem se desestabilizar em meio orgânico, dependendo de diversos fatores desde o tipo de reação, solvente e a enzima empregada, tornando o processo de alto custo e sem reaproveitamento do biocatalisador. Devido a estes fatores, muito tem se desenvolvido no sentido de minimizar essa perda de atividade catalítica e conseqüente desnaturação. Técnicas de imobilização vem sendo estudadas afim de que se possa fornecer estabilidade às enzimas e facilitar a sua reutilização e recuperação.²

Essas técnicas envolvem a ligação de enzimas em suporte sólido insolúvel em água (ligação em suporte) ou ligações cruzadas intermoleculares de enzimas por reagentes bifuncionais ou multifuncionais. Outro método de imobilização, consiste na inserção de enzimas em espaços confinados, ao qual ela não pode sair, mas onde permanece cataliticamente ativa (confinamento em matriz sólida).

Outro método de imobilização, apesar de não apresentar ligações e nem confinar fisicamente as enzimas, é o sistema bifásico. Neste, como o próprio nome diz, é um sistema formado de duas fases, onde na fase aquosa se encontra a enzima, e na orgânica se encontra o substrato a ser complexado. A interação das duas ocorre através de agitação mecânica.^{2, 3, 21}

A enzima quando imobilizada retém sua configuração estrutural devido as possíveis ligações de hidrogênio que ocorrem na superfície do material. Isto conduz a uma certa dificuldade de vibração da enzima, aumentando assim sua estabilidade térmica.

Na **Figura 10** estão representados os principais métodos de imobilização de enzimas.^{2, 21}

Métodos de Imobilização de Enzimas

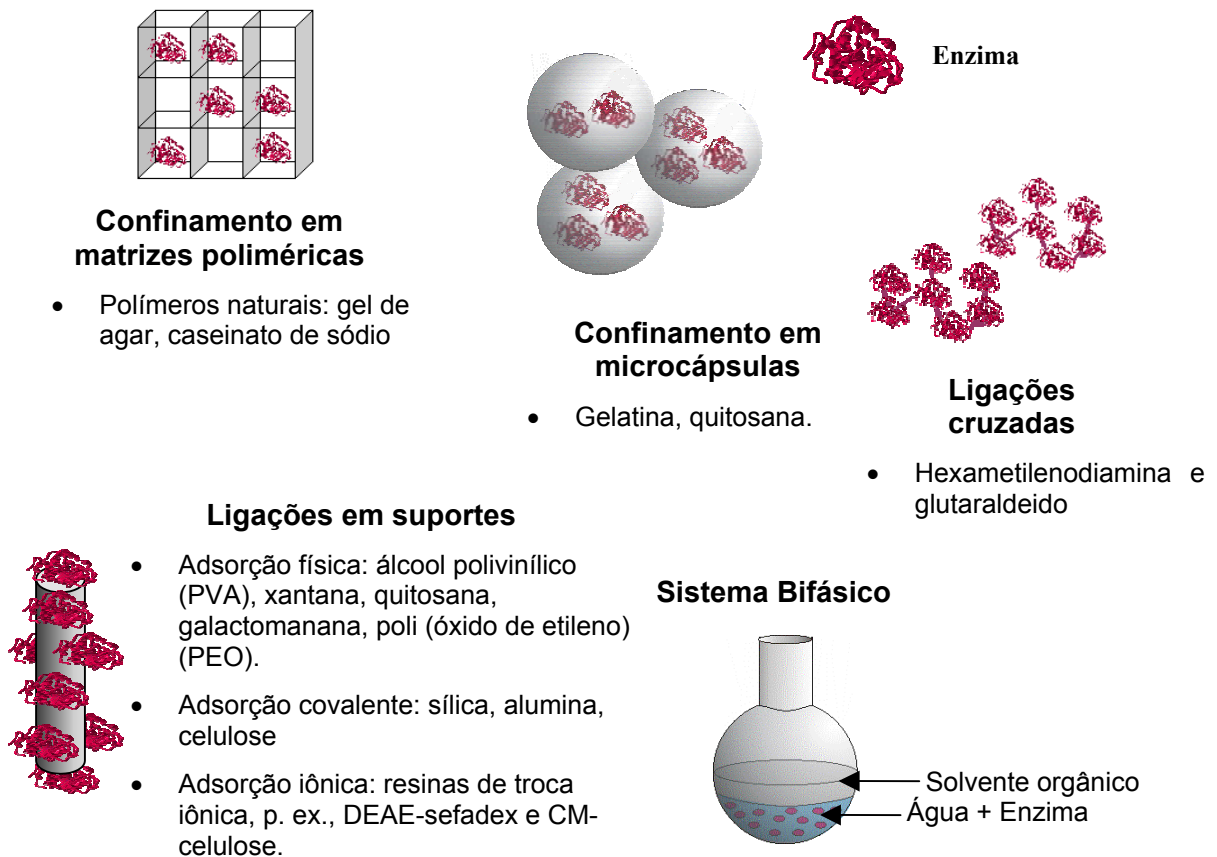


Figura 10. Representação gráfica dos principais métodos de imobilização de enzimas.^{2, 21}

1.3.1. Sistema Bifásico

É um método de imobilização bastante particular. Neste, não existem barreiras físicas entre enzima e substrato, ou seja, o biocatalisador não fica ligado ou confinado em um suporte sólido.

No sistema bifásico, a água é o suporte para as enzimas, e o solvente orgânico o suporte dos substratos. A interação das fases ocorre através de intensa agitação.

As principais vantagens do método são:^{2, 21}

- ⇒ reações de substratos insolúveis em água podem ser feita em volumes reduzidos de uma mistura de reação;
- ⇒ o produto pode ser facilmente separado do biocatalisador;
- ⇒ a inibição da enzima por substratos ou produtos é minimizada devido a sua baixa concentração na fase aquosa, fase onde se localiza o biocatalisador.

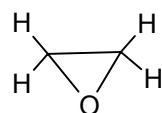
As principais desvantagens desse sistema são:

- ⇒ inativação ou inibição da enzima dependendo do solvente utilizado;
- ⇒ necessidade do sistema permanecer sob agitação vigorosa, para acelerar a reação;
- ⇒ a reutilização desse sistema não se mostra satisfatória devido a perda de atividade do biocatalisador.

1. 4. Epóxidos

Os oxiranos (termo utilizado pela IUPAC)(**1**) constituem um grupo de éteres, cuja sua característica é a presença de um anel de três membros C-O-C. Estes átomos estão ligados entre si por ligações σ .

As ligações C-O são polares devido a alta diferença de eletronegatividade entre os átomos.^{22, 23}



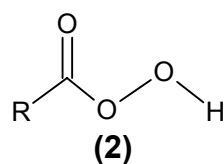
(1)

O epóxidos, possuem propriedades bastante distintas, no que se refere aos seus análogos alifáticos, devido a formação de um anel de três membros, aos quais lhe conferem grande tensão conformacional e angular, contribuindo assim, como um fator desestabilizante na molécula.

O uso de epóxidos em síntese orgânica vem sendo explorado intensivamente. Podem ser obtidos através de várias metodologias, destacando-se a síntese enzimática via-perácidos e epoxidação nucleofílica.^{6,19}

1.5. Peróxi-ácidos

Os peróxi-ácidos **(2)** (ou perácidos) são ácidos que possuem um grupamento peróxido.



Estes compostos são utilizados de forma significativa em síntese orgânica assim como em indústrias químicas. Na síntese orgânica, tem-se uma destacada importância na epoxidação de ligações C=C, oxidações de Bayer-Villiger e oxidações com metais de transição.²⁴

Alguns peróxi-ácidos são disponíveis comercialmente como o ácido peracético e o meta-cloroperbenzóico. Estes por sua vez são utilizados de forma bastante limitada devido ao alto grau de toxicidade e a necessidade de se manter condições enérgicas de reação (controle rigoroso de temperatura).

Muitos peróxi-ácidos podem ser gerados via enzimática a partir de compostos carbonílicos (ácidos carboxílicos, ésteres e amidas) e peróxido de hidrogênio. Após formados podem ser utilizados *in situ*, ou seja, permite que as reações ocorram sem a necessidade de se isolar o produto.²⁵

Uma aplicação está na obtenção quimio-enzimática de perácidos e sua utilização na formação de epóxidos, em temperatura ambiente a pH neutro.⁶

1.6. Epoxidação

A epoxidação é uma reação de extrema importância em síntese orgânica e consiste na inserção de um átomo de oxigênio em uma molécula para a formação de um anel de três membros.²²

Um epóxido muito importante, é o óxido de eteno. Pode ser preparado industrialmente por oxidação catalítica do eteno com o ar.^{26, 27} **(Figura 11)**

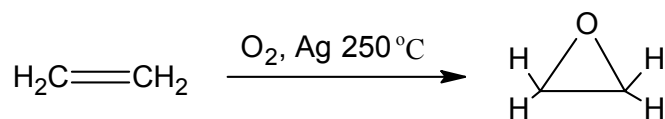
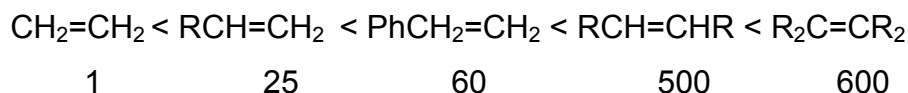


Figura 11. Processo industrial de epoxidação do eteno, por oxidação catalítica.

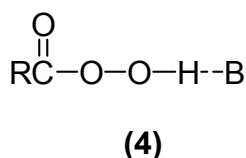
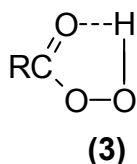
Para a formação de epóxidos existem inúmeras metodologias estudadas e as mais importantes serão apresentadas a seguir.

1. 6. 1. Epoxidação Eletrofílica por Perácidos

Neste tipo de reação, a principal característica é a epoxidação através do uso de perácidos e está intimamente ligada a densidade eletrônica na ligação C=C e pelos grupos eletro-atraentes nos perácidos. A escala de reatividade é importante para se prever a seletividade dos produtos.²³



A ligação intramolecular de hidrogênio **(3)** foi evidenciada por espectroscopia de infra-vermelho (IV) e outras técnicas de análise. Em solventes nos quais possa haver coordenação, os perácidos existem como complexo **(4)** com ligações intermoleculares de hidrogênio.²³



O solvente é de grande importância em epoxidações via perácidos. Em éter etílico ou acetato de etila a velocidade de epoxidação é cerca de 1/10 das mesmas em benzeno ou clorofórmio.

Devido a estes fatos, postulou-se a existência de um estado de transição cíclico **(5)** que pode ser estabilizado pelo solvente, conforme apresentado na **Figura 12**.

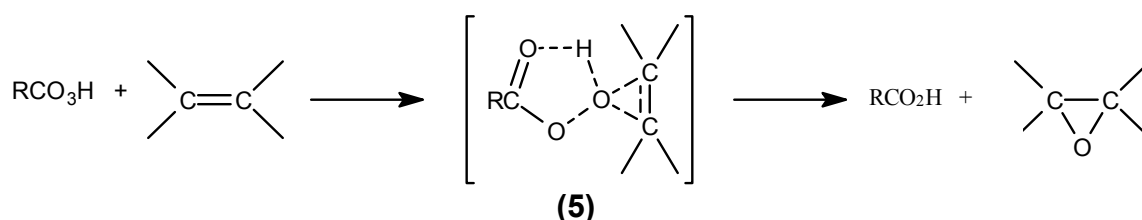
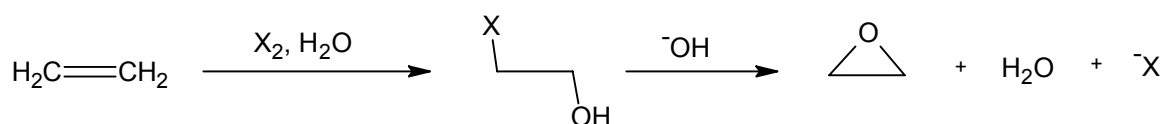


Figura 12. Mecanismo de epoxidação de alcenos via peróxi-ácidos.

1. 6. 2. Epoxidação Via Haloidrinas

Um tipo de epoxidação bastante utilizada em síntese orgânica é com o uso de haloidrinas em meio básico.^{26, 27} **(Figura 13)**



X = Cl, Br, I

Figura 13. Reação de epoxidação via haloidrinas.

1. 6. 3. Epoxidação Químio-Enzimática de Alcenos

A epoxidação químio-enzimática é uma ferramenta importante na síntese orgânica, visto que a utilização de lipases como catalisadores na formação de peróxidos podem formar peróxi-ácidos de diferentes poderes de oxidação e conseqüentemente alta seletividade na síntese de epóxidos.^{2, 21, 28} (Figura 14)

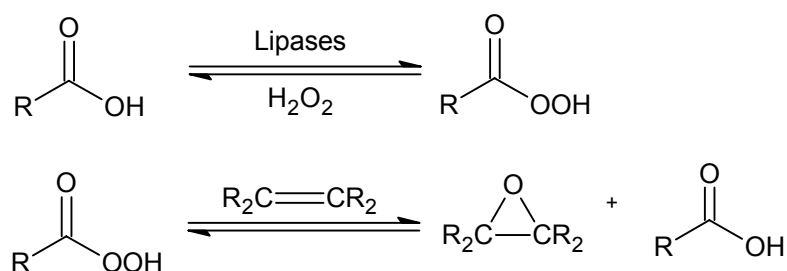


Figura 14. Epoxidação químio-enzimática de alcenos.

Os primeiros trabalhos envolvendo produção enzimática de peróxi-ácidos foram descritos por Bjorkling e col. no começo dos anos 90.²⁸ Outros pesquisadores como Klaas e Warwel utilizaram lipases imobilizadas em filmes poliméricos e resina aniônica (Novozym 435) respectivamente, na síntese de peróxi-ácidos.²⁹ (Figura 15)

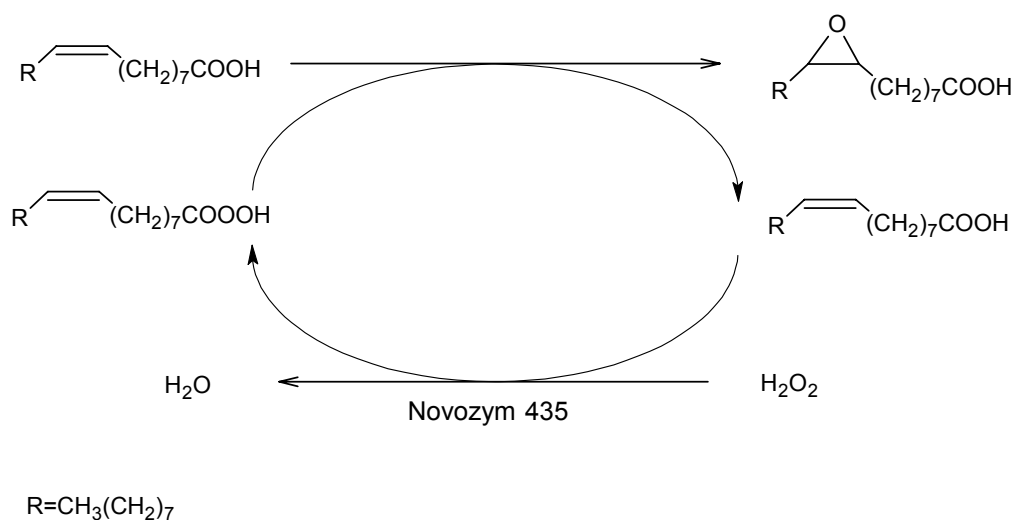


Figura 15. Epoxidação químio-enzimática do ácido oleico.

A utilização de enzimas na produção de compostos quirais, tem sido cada vez mais utilizada, visto que a atividade biológica muitas vezes reside em apenas um enantiômero. Dentre as drogas quirais sintetizadas via catálise enzimática pode-se destacar o S-Naproxen e o S-Ibuprofen, ambos agentes anti-inflamatórios.³⁰ (Figura 16)

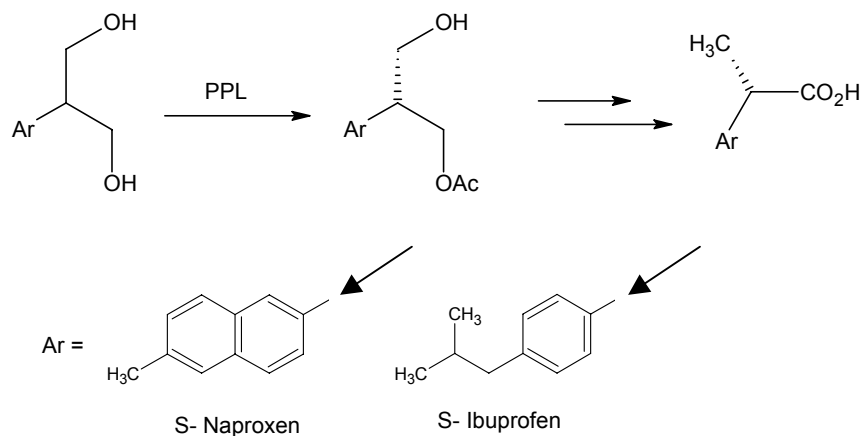


Figura 16. Síntese enantiocontrolada de S-Naproxen e S-Ibuprofen mediada pela lipase pancreática do porco (LPP).

2. OBJETIVOS

2. 1. Objetivo Geral

Preparar via enzimática, epóxidos derivados do cicloexeno sob diferentes condições experimentais em sistema bifásico.

2. 2. Objetivos Específicos

1. Avaliar a influência do comprimento da cadeia alquílica do doador acila (ácido carboxílico), bem como sua concentração;
2. Utilizar lipases de diferentes procedências, no estudo anterior;
3. Avaliar a influência da massa de lipases na epoxidação do cicloexeno.
4. Avaliar a influência do tempo na reação de epoxidação quimio-enzimática do cicloexeno com a Novozym 435.

3. METODOLOGIA

3.1. Reagentes, Solventes e lipases utilizadas.

Os reagentes, utilizados neste trabalho foram:

- ✓ Aldrich: ácido octanóico, ácido hexanóico, ácido decanóico, tetra metil silano (TMS), clorofórmio deuterado (CDCl_3);
- ✓ Merck: tolueno;
- ✓ Vetec: peróxido de hidrogênio 30%, ácido láurico, ácido propiônico, ácido butírico;
- ✓ Grupo Química: acetato de etila, etanol;
- ✓ Reagen: cicloexanol, ácido fosfórico;
- ✓ Nuclear: clorofórmio;

As lipases utilizadas neste trabalho foram:

Lipases	Nome Comercial	Atividade (u/g)*
<i>Pseudomonas</i> sp.	LPS ^a	30000
<i>Candida antarctica</i>	Novozym 435 ^b	10000

(a)Amano Pharmaceuticals CO. (b) Novozymes

*Quantidade de enzima que libera um μmol de ácido graxo por minuto.

3.2. Equipamentos e Caracterização dos Produtos.

As reações foram realizadas com o auxílio de um banho termostático MQBTZ99-20 (Microquímica) e quatro agitadores magnéticos (Microquímica – MQAMA-301). Os produtos foram caracterizados e analisados por Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (^1H -RMN) em um espectrômetro Bruker AC200F (200MHz), utilizando CDCl_3 como solvente.

3.3. Sistema Bifásico

Para a preparação do sistema bifásico foi utilizado um balão de fundo redondo de 125 mL, 5 mL de água, 6 mL de solvente orgânico, 1mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30%, e quantidades de lipases livres (LPS) ou imobilizada em resina aniônica (Novozym 435). O sistema foi mantido a temperatura constante de $30^{\circ}C$ em banho termostaticado conforme mostrado na **Figura 17**.

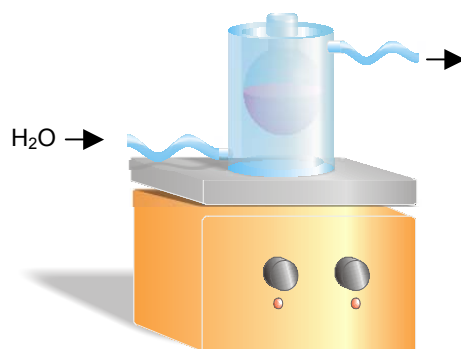


Figura 17. Representação gráfica de um sistema bifásico.

3.4. Métodos Experimentais

3.4.1. Preparação do Cicloexeno³¹

Para a preparação do cicloexeno, utilizou-se 10g (100mmol) de cicloexanol e 3mL (44mmol) de ácido fosfórico concentrado em um balão de fundo redondo de 100mL, alguns fragmentos de porcelana foram adicionados ao balão para um maior controle da ebulição dos reagentes. O balão foi ajustado a um sistema de destilação fracionada e a temperatura controlada para no máximo $90^{\circ}C$. A destilação foi interrompida quando ainda restava apenas um pouco de resíduo a ser destilado.

O destilado foi transferido para um funil de separação e saturado com cloreto de sódio. Adicionou-se 2mL de carbonato de sódio a 5%. O cicloexeno bruto foi colocado em um erlenmeyer, e a este foi adicionado cerca de 3g de

cloreto de sódio anidro. A mistura foi filtrada e o cicloexeno foi destilado novamente ($P_{exp}=81-83^{\circ}\text{C}$, $P_{lit.}=83^{\circ}\text{C}$, 75% rend.).³²

3.4.2. Reações de Epoxidação Químio-Enzimática em Sistema Bifásico (Sistema Padrão).

Em um balão de fundo de redondo, com o sistema descrito na Seção 3.3, adicionaram-se, quantidades e tipos variados do doador acila (Seção 4.1 e 4.2) e 5 mmoles do cicloexeno. O sistema foi colocado em um reator termostaticado e mantido sob agitação e temperatura constantes em tempos variados (Seção 4.4).

A conversão em epóxido do cicloexeno, foi determinada através de comparação das integrais dos singletos referentes aos hidrogênios ligados ao carbono da dupla ligação em 5,6 ppm e em 3,1 ppm, referentes ao cicloexeno e o epóxido respectivamente. (**Figura 18**)

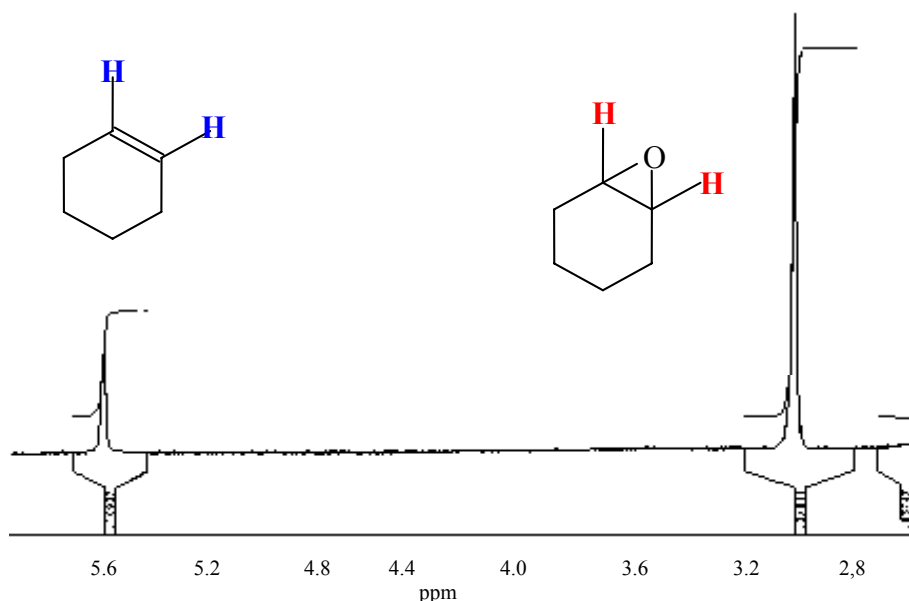


Figura 18. Espectro de RMN- ^1H , de uma alíquota da fase orgânica da reação de epoxidação químio-enzimática do cicloexeno, utilizando a Novozym 435 (50mg), 30°C , 6 h, tolueno, (CDCl_3 , 200MHz), 73% de conversão em epóxido.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

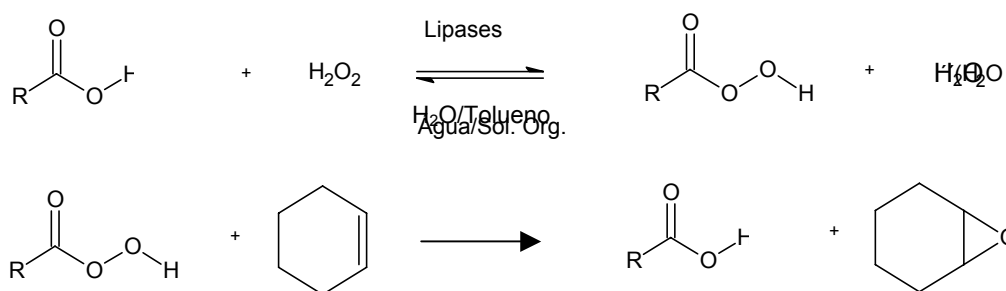
Os estudos iniciais relacionados a obtenção de epóxidos via quími-enzimática, envolveram a otimização do método e a busca das melhores condições experimentais principalmente para a obtenção do epóxido do cicloexeno.²¹

Estes dados mostraram que o epóxido do cicloexeno pode ser obtido com rendimentos quantitativos quando utilizou-se o octanoato de etila como doador acila, 100mg de Novozym 435, tolueno como solvente externo, 30 °C e por 24 h de reação.²¹

Foi também verificado que, a Novozym 435 é estável até 50 °C, estando de acordo com a sua ficha técnica.³³ Já está bem documentado que esta lipase é termoestável, sendo a temperatura ótima de 40-60°C. Não foram realizados estudos acima de 50°C devido a problemas de decomposição do peróxido de hidrogênio, evaporação do solvente e substrato, além da possível decomposição desta enzima.²¹

Dando continuidade a estes estudos, outros parâmetros experimentais foram avaliados e comparados com os resultados obtidos anteriormente. Fêz-se a avaliação da estrutura do doador acila e de sua concentração. A partir destes resultados, variou-se a massa de Novozym 435 e de lipase de *Pseudomonas* sp. (LPS) e do tempo de reação para que o epóxido seja obtido com rendimentos quantitativos (>99%).

As reações estudadas neste trabalho estão descritas na **Figura 19**.



R = CH₃CH₂-, CH₃(CH₂)₂-, CH₃(CH₂)₄-, CH₃(CH₂)₆-, CH₃(CH₂)₈-, CH₃(CH₂)₁₀-,

Figura 19. Equação geral das reações estudadas neste trabalho.

4.1. Influência do Doador Acila.

Neste experimento, foi verificada a influência do tipo de doador acila para a obtenção químico-enzimática do epóxido do cicloexeno. Foram utilizados como doadores acila os ácidos propanóico, butanóico, hexanóico, octanóico, decanóico, e dodecanóico (láurico), e como biocatalisadores a Novozym 435 e lipase de *Pseudomonas* sp (LPS).

As conversões em epóxidos utilizando estes sistemas estão demonstrados na **Figura 20**.

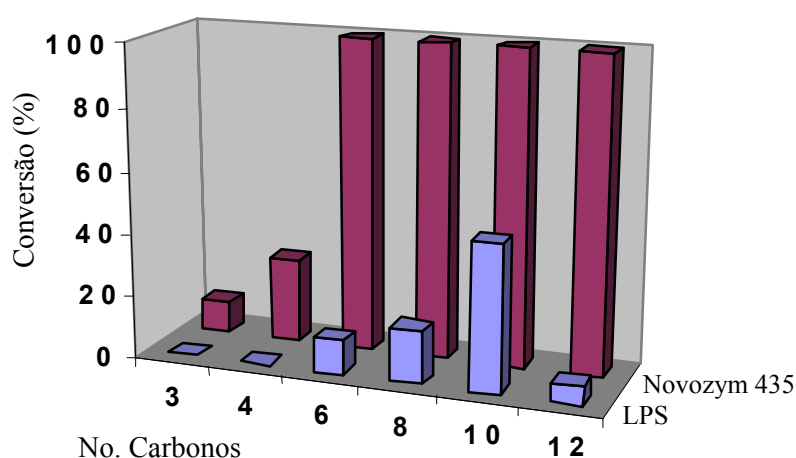


Figura 20. Conversão em epóxido (%) do cicloexeno(5mmol) em função do doador acila(10mmol) empregado, em sistema bifásico, com as lipases Novozym 435(50mg) e LPS(50mg), H₂O₂(30%, 1mL), 30°C, 24h, tolueno.

Pode-se observar na **Figura 20**, que as conversões em epóxidos foram menores com ácidos carboxílicos de cadeias menores (ácido propanóico e butanóico) em ambos sistemas. Utilizando ácidos de cadeias maiores, as conversões em epóxidos foram melhores. Para o sistema utilizando a LPS, a maior conversão foi obtida com o ácido decanóico (49%). Com a Novozym 435, as conversões em epóxidos foram quantitativas com os ácidos hexanóico, octanóico, decanóico e láurico (>99%).

Esses resultados podem estar relacionados com a conformação do sítio catalítico das lipases que se diferenciam muito de uma lipase para outra,

fazendo com que as conversões em epóxidos variem consideravelmente decorrente da quantidade do peróxi-ácido formado na primeira etapa da reação e conseqüente epoxidação do cicloexeno, (**Figura 19**).

Um outro fator que pode ter contribuído para tal diferença na conversão em epóxido, é a forma em que foram empregadas tais lipases. A Novozym 435, apresenta maior resistência a desnaturação e perda de atividade por estar imobilizada em resina aniônica, enquanto que a LPS foi utilizada na sua forma livre.

4.2. Influência da Quantidade de Doador Acila.

A influência da quantidade de ácido carboxílico (doador acila) utilizado, foi verificado em função da conversão em epóxido do cicloexeno (%). Este estudo foi feito para as lipases LPS(100mg) e Novozym 435(50mg), com os ácidos decanóico e octanóico respectivamente, utilizando tolueno com solvente.

Os resultados estão demonstrados na **Figura 21**.

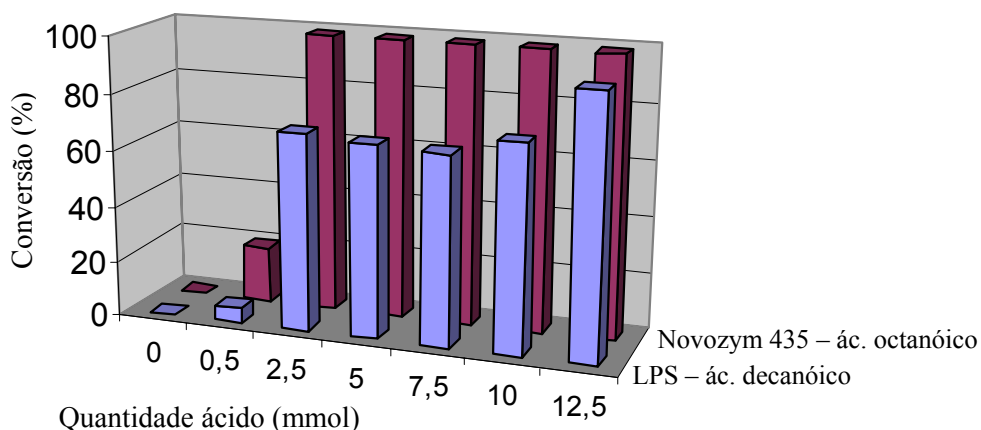


Figura 21. Variação da conversão em epóxido de cicloexeno catalisada pelas lipases Novozym 435 e LPS, em função da quantidade (mmol) de ácido carboxílico. 30°C, 24 h, H₂O₂(30%, 1mL), tolueno.

Os resultados da **Figura 21**, demonstram que as conversões foram quantitativas (>99%) quando foi utilizada a Novozym 435, com quantidade de ácido octanóico superiores a 2,5mmol. A mesma tendência de conversão em epóxidos foi verificada quando foi utilizada a LPS, obtendo-se conversões de 70- 92%. Com 0,5mmol de ácido carboxílico, as conversões foram relativamente baixas, sendo de 5% e 18% com a LPS e a Novozym 435, respectivamente. Na ausência de doador acila, não houve formação do produto.

Pode-se verificar, a partir destes resultados, que a conversão em epóxido depende diretamente da quantidade de ácidos carboxílicos na concentração de 0-2,5 mmol para os dois sistemas, e que a partir deste valor a conversão em epóxidos independe da quantidade dos doadores acila. Provavelmente este fato se deve a regeneração do ácido carboxílico na última etapa da reação (**Figura 19**).

4.3. Influência da Massa de Lipases no Sistema Reacional.

Um parâmetro a ser analisado neste sistema, é a influência da massa de lipase empregada. Este estudo foi realizado com as lipases e com os doadores acila que apresentaram as melhores conversões em epóxidos (Novozym 435, LPS, com os ácidos octanóico e decanóico(10mmol) respectivamente.

Nas **Figuras 22 e 23** estão demonstradas a conversão em epóxido em função da massa de lipase empregada.

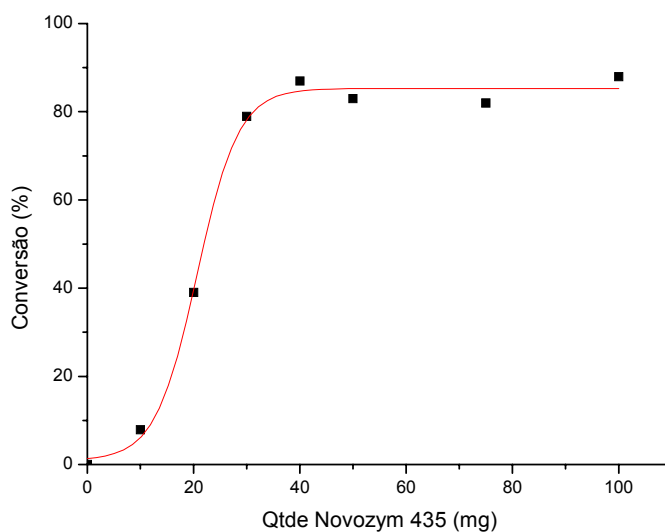


Figura 22. Conversão em epóxido de cicloexeno (%) em função da massa de Novozym 435, ác. octanóico(10mmol) como doador acila, cicloexeno=5mmol, 30°C, H₂O₂(30%, 1mL), 9h, tolueno.

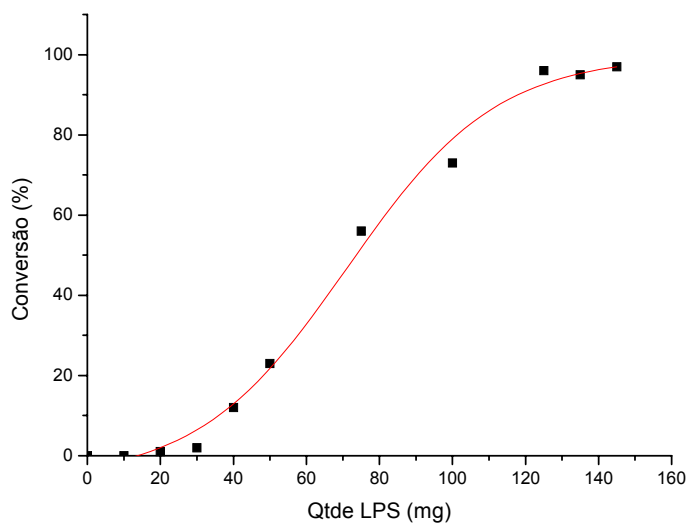


Figura 23. Conversão em epóxido de cicloexeno (%) em função da massa de LPS, ác. decanóico(10mmol) como doador acila, cicloexeno = 5mmol, 30°C, H₂O₂(30%, 1mL), 24h, tolueno.

Os resultados da **Figura 22** e **Figura 23**, demonstram a dependência da conversão em epóxido em função da massa de biocatalisador empregado.

Quando utilizou-se a Novozym 435, as conversões mantiveram-se praticamente constantes (~82%) a partir de 35 mg de lipase em 9h de reação.

Utilizando a LPS, as conversões em epóxidos mantiveram-se constantes em ~96% a partir de 125mg em 24h de reação.

No caso da Novozym 435, as quantidades de biocatalisador e o tempo de reação foram menores, devido a esta possuir maior resistência a desnaturação decorrente da sua imobilização em resina aniônica conferindo-lhe maior resistência, conforme citado na Seção 4.1.

Trabalhos anteriores demonstraram que com a LPS, obtém-se ótimos resultados para a resolução de α -metileno β -hidróxi ésteres e *R, S* – mandelato de metila quando imobilizada em poli(óxido de etileno).^{17, 34}

Outro fator que também deve ser levado em consideração é a sensibilidade ao peróxido de hidrogênio que provavelmente deve ser diferenciada em cada uma das lipases.

4.4. Influência do tempo.

Na seqüência deste trabalho, foi realizado um estudo do tempo de reação, retirando-se alíquotas do meio reacional em tempos pré-determinados, utilizando tolueno com solvente externo.

Este estudo foi feito para a reação padrão deste trabalho, utilizando a Novozym 435 (50mg) e o ácido octanóico (10mmol) como doador acila. **(Figura 24)**

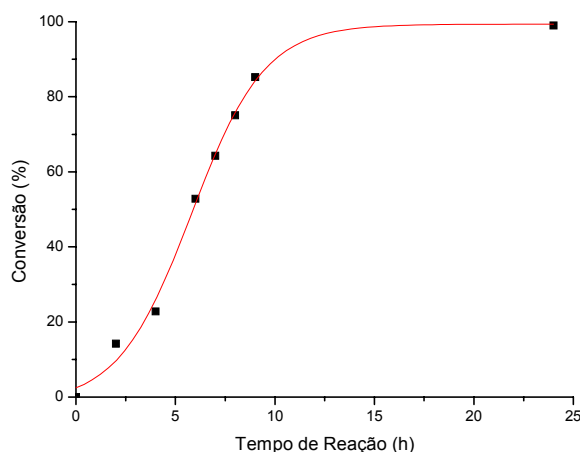


Figura 24. Influência do tempo na epoxidação quimio-enzimática do cicloexeno em sistema bifásico, com a Novozym 43530°C, H₂O₂(30%, 1mL), tolueno.

Os resultados desse estudo mostram, que após 9 horas, é possível obter epóxidos de cicloexeno com bons rendimentos (~85%), e que após 24h o produto pode ser obtido quantitativamente (>99%).

Num período de 0 a 9h de reação foi verificada a taxa de formação de epóxido por segundos, correspondendo a $2,1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Este valor foi calculado através do gráfico da concentração de epóxido formado (mol/L), em função do tempo de reação (s), que por regressão linear, obtêm-se o coeficiente angular. **(Figura 25)**

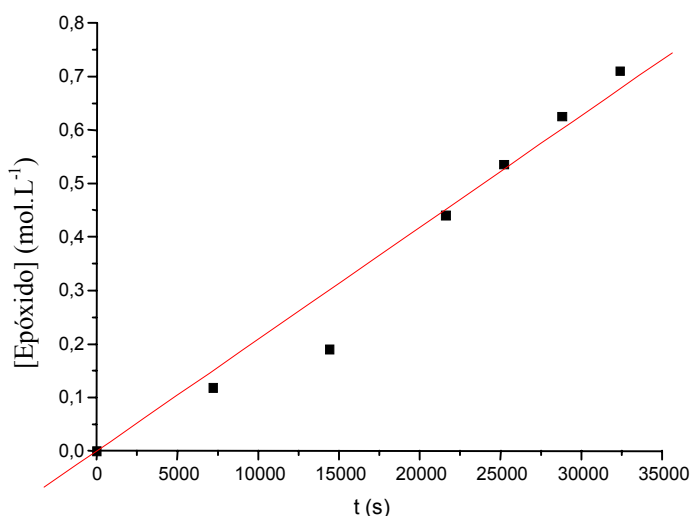


Figura 25. Concentração de epóxido formado em função do tempo de reação até 9h com a Novozym 435, a 30°C, H₂O₂ 30%, 1mL, R=0,9776.

Para a determinação da ordem de reação, seria necessário a repetição do experimento com concentrações iniciais de cicloexeno diferentes, sob a mesma temperatura.

5. CONCLUSÕES FINAIS

A partir dos resultados experimentais, concluiu-se que os principais parâmetros que influenciam na obtenção químico-enzimática do epóxido de cicloexeno são:

- ⇒ *Doador acila*: Utilizando a Novozym 435, as conversões em epóxido foram quantitativas (>99%) quando foram utilizadas quantidades superiores a 2,5mmol dos ácidos hexanóico, octanóico, decanóico e láurico. Com a LPS, as maiores conversões em epóxidos (92%) foram obtidas quando foi utilizado 12,5mmol do ácido decanóico.
- ⇒ *Lipases*: Os resultados demonstraram que, as maiores conversões em epóxido foram obtidas com a Novozym 435 (85%) a partir de 35 mg em 9h de reação. Com a LPS, as conversões se mantiveram constantes (~96%) a partir de 125 mg de enzima em 24h de reação.
- ⇒ *Imobilização*: De modo geral, as conversões em epóxidos foram maiores quando foi utilizada a Novozym 435, em comparação a LPS, provavelmente devido a primeira estar imobilizada em resina aniônica e a segunda na sua forma livre, menos protegida do solvente orgânico e do agente oxidante (H₂O₂).
- ⇒ *Tempo de reação*: O estudo do tempo demonstrou que com a Novozym 435, pode-se obter rendimentos quantitativos após 9h de reação à uma taxa de formação de epóxido de $2,1 \times 10^{-5} \text{ mol/L} \cdot \text{s}$

6. PERSPECTIVAS

Dando continuidade a este projeto, se faz necessário o estudo da epoxidação químico-enzimática do cicloexeno em função do seu tempo de reação em outras temperaturas. A partir destes resultados, pode-se obter a ordem de reação e os parâmetros termodinâmicos como ΔS , ΔG , ΔH e E_a .

Baseados nestas informações, serão estudadas a epoxidação químico-enzimática de outros sistemas insaturados (p. ex.: α -pineno, carvona, D-limoneno, etc) e a oxidação de cetonas cíclicas para a formação de lactonas (oxidação de Bayer-Villiger).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Murray, R. K.; Granner, D. K.; Harper, Bioquímica, Atheneus SP, 6^a Ed. Cap. 7. 1990.
2. Faber, K.; Biotransformations in Organic Chemistry, Springer-Verlag, New York, 1997.
3. Voet, D.; Voet, J. G.; Biochemistry – 2nd Ed., John Wiley & Sons Inc. 1995.
4. <http://bio.winona.msus.edu/bates/Bio241/enzymes.htm>, acessada em outubro em 2003.
5. Nelson, D. L.; Cox, M. M.; Lehninger: Principles of Biochemistry, 3rd Ed. USA, Saunders Publishing College, 2000.
6. Roberts, S. M. Biocatalysts for fine Chemicals Synthesis, John Wiley & Sons, Ltd. England, 1999.
7. Whitesides, G. M.; Wang, C. H.; Angew. Chem. Int. Ed. Engl.; 24, 617, 1985.
8. Moran, P. J. S., Rodrigues, J. A. R. Joekes, I, Breneli, E. C. S., Leite, R. A. Biocatalysis, 9, 321-328, 1994.
9. Loughlin, W.; Bioresour. Technol. 74, 49-62, 2000.
10. Biotimes – Revista Bioindustrial Trimestral da Novozymes, 1998-2002.
11. Wooley, P., Petersen, S. B., Lipases, their structure, biochemistry and application, Univ. Cambridge, 1994.
12. <http://www.pdb.org>, acessada em outubro de 2003.
13. Cygler, M.; Grochulski, P.; Kazlauskas, K. J.; Scharag, j. D.; Bouthillien, F.; Rubin, B. Sereqi, A. N.; Gupta, A. K.; J. Am. Chem. Soc. 116, 3180-3186 – 1994.

14. Wong & Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, 12, Ed. Pergamon. p. 22-25
15. Neto, P. R. C., Mazzuco, L. M. Nascimento, M. G., *Biotransformação de óleos e gorduras. Biotecnologia & Ciência e Desenvolvimento*, 19, 28-31, 2001.
16. Zanotto S. P. *Utilização de Enzimas e Microrganismos para Obtenção de Compostos Oticamente Ativos*, Tese de doutorado, UFSC, julho de 2003.
17. Nascimento, M. G. Zanotto, S. P. Melegari, S. P. Fernandes, L. Sá, M. C. M.; *Tetrahedron: Asymmetry*, 14, 7, 2003, 3111-3115.
18. Jaeger K. E.; Eggert T.; *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 4, 2002, 390-397.
19. Skouridou, S., Kolisis, F.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 21, 2003, 67-69
20. Klibanov, A. M. , *Nature*, 409, 241-246, 2001.
21. Moreira, M. A., *Utilização de Lipases em Reações de Epoxidação Químio-Enzimática*, Dissertação de Mestrado, 2003, UFSC.
22. Solomons, T. W.; *Organic Chemistry*, 6th Ed. 448-453, 2000.
23. Patai, S.; *The Chemistry of Hydroxyl Ether and Peroxide Groups*, Chichester, John Wiley, 1993.
24. Schirmann, J. P.; Delavarenne, S. Y .; *Hydrogen Peroxide in Organic Chemistry*, (S.E.T.E. Lyon), 1979.
25. Klaas, M. R.; Warwel, S. J. *Mol. Catal. A: Chem.* 117, 311-319, 1997.
26. Carey, F.A.. *Organic Chemistry*, 3^a ed. McGraw Hill, 1996.
27. Morrison, R. T., Boyd, R.N., *Química Orgânica*, 11^a ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.
28. Bjorkling, F., Godtfredsen, S. E.; Kirk, O.; *Trends in Biotechnology*, 9, 360-363, 1991.

29. Klaas, M. R.; Warwel, S. J. *Mol. Catal. B Enzym.* 1, 29-35, 1995
30. Bando, T.; Namba, Y.; Shishido, K.; *Tetrahedron: Asymmetry*, 8, 2159-2165. 1997.
31. Fieser, M.; *Reagents for Organic Chemistry*, Vol. 17, John Wiley & Sons, p.61-64, 1994.
32. *HandBook of Chemistry and Physics*, CRC Press, Boca Raton, 1979.
33. Ficha Técnica da Novozymes 2002 – www.novozymes.com, acessada em outubro de 2003.
34. Queiroz, N.; Nascimento, M. G.; *Tetrahedron: Lett.*, 43, 5225-5227, 2002

8. PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS E EVENTOS CIENTÍFICOS

2003

Trabalho apresentado no 10TH Brazilian Meeting on Organic Synthesis realizado em São Pedro - SP de 24 a 28 de agosto, com o tema “**Regioselective Epoxidation of D-Limonene Mediated by Lipases**”, M. A. Moreira, T. B. Bitencourt, M. G. Nascimento.

Trabalho apresentado no XI Encontro de Química da Região Sul realizado em Pelotas-RS de 03 a 07 de novembro, com o tema “**Lipases como Biocatalisadores na Epoxidação Químio-Enzimática do Cicloexeno**”, M. A. Moreira, T. B. Bitencourt, M. G. Nascimento.

Trabalho apresentado no XI Encontro de Química da Região Sul realizado em Pelotas-RS de 03 a 07 de novembro, com o tema “**Epoxidação Regiosseletiva e Químio-Enzimática do D-Limoneno**”, M. A. Moreira, T. B. Bitencourt, M. G. Nascimento.

Trabalho apresentado no XI Encontro de Química da Região Sul realizado em Pelotas-RS de 03 a 07 de novembro, com o tema “**Estudo Preliminar da Epoxidação Enzimática do Óleo de Rícino**”, L. R. Wickert, T. B. Bitencourt, M. A. Moreira, M. G. Nascimento, R. C. S. Schneider.

2004

Trabalho submetido a 27^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química a ser realizado em Salvador-Ba no dia 30 de maio a 02 de junho com o tema “**Influência do Doador Acila na Epoxidação Químio-Enzimática do Cicloexeno em Sistema Bifásico**”, T. B. Bitencourt, M. A. Moreira, M. G. Nascimento.

Trabalho submetido a 27^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química a ser realizado em Salvador-Ba no dia 30 de maio a 02 de junho com o tema “**Epoxidação Enzimática do Óleo de Linhaça e Rícino**”, L. R. Wickert, T. B. Bitencourt, M. A. Moreira, M. G. Nascimento, R. C. S. Schneider.