

BIOESTERIFICAÇÃO DO RAC-BUTAN-2-OL USANDO BROMELINA EM SUPORTE POLIMÉRICO

Antônio Luthierre Gama Cavalcante ¹, José Cleiton Sousa dos Santos ², Brunna Angélica Evarista Silva ³, Ícaro Bezerra de Freitas ⁴, Regilany Paulo Colares ⁵, Aluísio Marques da Fonseca ⁶

RESUMO

A biocatálise é um ramo da biotecnologia que visa a transformação química de um composto por uso de enzimas de especificidade conhecida. Através dos tempos, o homem vem desenvolvendo esses processos por meio da experimentação, sem se dar conta de sua origem e tem trazido bastantes benefícios à sociedade, como por exemplo, nos processos fermentativos na produção de alimentos ou bebidas. As fontes enzimáticas são diversas, podendo ser encontradas em microrganismos, animais, vegetais ou comerciais (enzimas isoladas). As enzimas encontradas nas cascas do abacaxi (*Ananas comosus* L.), reportada na literatura como agente biocatalítico pela presença de uma lipase (bromelina), tem grande relevância na química orgânica e uma forte ligação com a sustentabilidade e a química verde, para a aplicação em novas tecnologias, contribuindo para o conhecimento em Biotecnologia. Essas reações biocatalíticas podem contribuir para o desenvolvimento de produtos nas áreas de energias, como a produção de biocombustíveis e farmacêutica, como nos cosméticos e fármacos. Neste contexto, o presente projeto tem por finalidade verificar o potencial biotecnológico das enzimas encontradas nas cascas do abacaxi (lipase) in natura, bem como, a utilização na forma imobilizada a fim de realizar reações de esterificação, como é o caso do rac-butan-2-ol.

Palavras-chave:

biocatálise. biotransformações. lipase. bioesterificação.

¹ Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, Discente, e-mail: luthi2011@gmail.com

² Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, Docente, e-mail: jcs@unilab.edu.br

³ Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO, Discente, e-mail: brunna.angelica@yahoo.com.br

⁴ Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, Discente, e-mail: bezerraicaros@gmail.com

⁵ Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira., Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, Docente, e-mail: regilany@unilab.edu.br

⁶ Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, Docente, e-mail: aluisiomf@unilab.edu.br

INTRODUÇÃO

Muitos pesquisadores nos últimos anos têm utilizado materiais vegetais como catalisadores naturais. Isso se deve ao fato de que esses biocatalisadores possuem amplo potencial biotecnológico, principalmente para aplicação no setor industrial, como agente de obtenção de drogas, cosméticos, fungicidas e possuem grande importância sintética para produção de intermediários chave quirais de interesse farmacológico e agroquímico (CORDEL et al., 2007).

Os termos biocatálise ou biotransformação, de maneira geral, abrangem os processos em que um catalisador biológico é utilizado para a conversão de um substrato em um número limitado de etapas enzimáticas. As biotransformações utilizando enzimas vegetais ou microrganismos vêm sendo utilizadas pelo homem desde os primórdios na fabricação de pães, bebidas alcóolicas e de derivados do leite em processos fermentativos (JONG et al., 1992). Essas enzimas atuam como catalisadores específicos e quirais, pela alta versatilidade em realizar vários tipos de reações orgânicas tais como: reações de diels-alder, rearranjo de COPE, reações sigmatrópicas [3,3], rearranjo de Claisen, entre outras (FABER, 2004). As reações biocatalíticas são usualmente seguras, podendo ocorrer em condições brandas de temperatura, pH próximo de neutro, minimizando assim problemas de isomerização, racemização e epimerização de centros estereogênicos, que são frequentes quando se usam catalisadores convencionais (FABER, 2004; SILVERMAN, 2002; ALMEIDA, 1995; BARALDI et al., 2004). As enzimas possuem três tipos de seletividade: a quimiosseletividade, atuando em um único tipo de grupo funcional, preservando assim outras funções existentes na molécula; a regioseletividade que podem distinguir grupos funcionais os quais estão quimicamente situados em diferentes regiões no mesmo substrato e a enantioseletividade, que prevê a estereoquímica do produto final, ou seja, sua configuração absoluta, caso este composto já possua centro estereogênico, ou seja um composto com proquiralidade (FABER, 2004).

As lipases podem ser de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), microbiana (bactérias e fungos) e vegetal, com variação em suas propriedades catalíticas. Lipases de origem microbiana ainda são as mais utilizadas, no entanto, o estudo de fontes vegetais (caule, folha e látex) tem crescido nos últimos anos.

Além da hidrólise, as lipases também podem catalisar outros tipos de reações químicas como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóolises e acidólises), aminólise (síntese de amidas) e lactonização (RAMOS et al., 2011).

Localizada na região nordeste, em Redenção no estado do Ceará, a sede da UNILAB situa-se na primeira cidade brasileira a abolir a escravidão, em 1883, cinco anos antes da Lei Áurea. A UNILAB foi implantada no âmbito de uma política brasileira de expansão da rede pública de educação superior. Em atenção ao Plano Nacional de Educação/PNE 2000-2010 e ao Plano de Desenvolvimento da Educação/PDE, lançado pelo Presidente da República em abril de 2007, o governo brasileiro busca expandir a rede pública federal de educação superior, especialmente em áreas que promovam a descentralização e interiorização, por meio da criação de ao menos uma instituição federal em cidades-polo do entorno regional.

A UNILAB está vinculada às diretrizes e convenções internacionais que reconhecem a educação e a formação humana como elementos estruturantes para o desenvolvimento sustentável da humanidade, no presente e para as gerações futuras. A ampliação da oferta de Cursos superiores se inscreve nesse esforço de mudar o patamar da produção e disseminação do conhecimento. Movimento este no sentido de promover não somente a democratização do acesso e da permanência de estudantes outrora excluídos do ensino superior, mas também oferecer às comunidades distantes dos grandes centros urbanos os benefícios agregados aos projetos de pesquisa e extensão.

A questão ambiental está presente na pauta da sociedade brasileira e mundial. Entre outros, dois aspectos são muito relevantes neste contexto: a questão do aproveitamento dos recursos naturais.

Da mesma forma que no ensino, pesquisa e extensão, a UNILAB deve buscar excelência na gestão do consumo de materiais, água e energia além da preocupação na destinação adequada de seus resíduos; considerando os potenciais impactos que nos causará vários segmentos do seu entorno, o Maciço de Baturité, bem como o seu potencial de difusão e aperfeiçoamento de ideias, conceitos e propostas, torna-se recomendável que, por meio de suas diversas unidades, adote bons exemplos de práticas ambientalmente corretas.

Ao visar o problema, que se encontra na produção de compostos orgânicos quirais sem usar reagentes

tóxicos ou que agredam o meio ambiente é um grande desafio. Principalmente por se usar soluções aquosas, biodegradáveis e poucas rotas reacionais.

METODOLOGIA

1ª Etapa - Imobilização das Enzimas

Para o processo de imobilização das enzimas, o procedimento será adaptado da metodologia de Kalogeris (KALOGERIS et al., 2006). Onde serão utilizados a 300,0 mL da solução das casacas do abacaxi, 3,0 g de poliacrilamida, que por sua vez estará sob agitação constante à temperatura ambiente por 2 horas até que seja completada a miscibilidade dos materiais. Após o fim da expansão das esferas de poliacrilamida, será deixado em repouso à temperatura ambiente por 20 horas. Ao fim deste período, a solução contendo as esferas é submetida à filtração, e obtiveram-se então as enzimas imobilizadas. Após filtrações, seguirá o processo de lavagem das esferas com água destilada. Terminadas as lavagens, as esferas serão deixadas à secar a temperatura de 32°C por dois dias, e apresentarão o aspecto esférico. Ao fim do processo as enzimas imobilizadas serão pesadas e desidratadas.

2ª Etapa - Reação de esterificação via enzimática

O substrato a ser esterificado (butan-2-ol) será adicionado ao sistema enzimático (enzimas imobilizadas em poliacrilamida) com acetato de vinila ou anidrido acético ou outra material fonte de esterificação, em meio orgânico (hexano, tetrahydrofurano ou éter etílico), de acordo com a literatura (MACHADO et al., 2008a e 2008b; FONSECA et al., 2013). Com os resultados encontrados, as reações poderão ser expandidas para benzilação (utilizando anidrido benzóico) ou outras esterificações (anidrido ftálico). Numa primeira condição, será sugerido (de acordo com a literatura já citada) (FONSECA et al., 2013), 200mg de enzimas imobilizadas, 1,92 mmol do substrato, 1,92 mmol de doador de grupo acila em 20mL de hexano ou acetonitrila, sob agitação mecânica com velocidade de 150 rotações por minuto (rpm) à temperatura de 30°C e tempo de reação de 72 horas. A fase orgânica será secada com sulfato de sódio. Em seguida, o solvente será removido por pressão reduzida.

3ª Etapa - Elucidação estrutural dos compostos isolados

Substâncias ativas ou não terão suas estruturas determinadas usando-se:

- Determinação das propriedades físicas (ponto de fusão e rotação específica);
- Obtenção dos espectros de infravermelho, massas, ultravioleta, ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C unidimensionais;
- Análise dos dados espectrais, proposição estrutural.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dados Físicos do 2-butanol e 2-butanol acetilado:

Material de partida: C₄H₁₀O

Fórmula empírica: C₄H₁₀O

[α]_D²⁵ = +13,52 (1,0) CHCl₃

Peso molecular: 74,12 g/mol

R_f (10% AcOEt/Hexano): 0,6

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ 3,53 (m, 1H, H-2), 3,46 (s, 1H, OH), 1,34-1,28 (m, 2H, H-3), 1,00 (d, 3H, H-1), 0,75 (t, 2H, H-4).

EM (IE+, m/z): 74 (3%), 59 (20%), 45 (92%).

(R)-2-butanol; $[\alpha]_D = -13,52^\circ$; PE = $99,5^\circ\text{C}$; d = $0,808 \text{ g.mL}^{-1}$

(S)-2-butanol; $[\alpha]_D = +13,52^\circ$; PE = $99,5^\circ\text{C}$; d = $0,808 \text{ g.mL}^{-1}$

(R,S)-2-butanol; $[\alpha]_D = 0^\circ$; PE = $99,5^\circ\text{C}$; d = $0,808 \text{ g.mL}^{-1}$

R-(-)-2-Acetoxibutano: 20% de rendimento, obtendo 17,5 mg a partir de 100mg de material de partida

Fórmula empírica: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2$

$[\alpha]_D^{25} = -20 (1,0) \text{ CHCl}_3$

Peso molecular: $116,16 \text{ g/mol}$

R_f (10% AcOEt/Hexano): 0,8

EM (IE+, m/z): 116 (2%), 87 (22%), 56 (20%), 43 (100%).

Separação analítica usando as seguintes técnicas:

Coluna Chiralsil Dex-CB: 2°C/min ($100-180^\circ\text{C}$) e 2°C/min ($130-160^\circ\text{C}$).

Tempo de retenção do isômero R: 6,796 min; Tempo de retenção do isômero

S: 6,956 min.

Calculo para obtenção do excesso enantiomérico:

Média dos alfas: $[(-0,043)+(-0,044)+(-0,046)]/3$ a $0,002 \text{ g.mL}^{-1}$, onde teremos:

$-0,044^\circ$; Se $0,002 \text{ g.mL}^{-1}$ equivale a $-0,044^\circ$, então qual o valor a $0,808 \text{ g.mL}^{-1}$ será de $-17,78^\circ$ de observado.

Onde,

e.e. = 89% do isômero R

Produtos obtidos nas reações de bioesterificação

Análise A1 Esferas (6)+substrato (Anidrido acético) - 44,58% (2-butanol acetilado)

Análise A2 Esferas (12)+substrato (Acetato de etila) - 82,98% (4-hidroxi 4-metil-pentan-2-ona)

Análise A3 Esferas (6)+substrato (Acetato de etila) - 76,69% (4-hidroxi 4-metil-pentan-2-ona)

Melhor condição para reação ocorrer

Quantidade de reagentes

6 esferas com enzimas imobilizadas

0,25g de 2-butanol

2,5mL de anidrido acético

CONCLUSÕES

Portanto, no decorrer da pesquisa foi possível verificar o potencial biotecnológico das cascas do abacaxi (*Ananas comosus* L.) em reações de bioesterificação do rac-butan-2-ol. Nesta perspectiva, definiu-se que a partir das reações executadas formaram-se dois produtos um deles foi o 2-butanol acetilado e o outro foi o 4-hidroxi-4-metil-2-penta-2-ona. Assim sendo, fez-se uma variação dos fatores que impactaram diretamente na reação e pôde-se concluir que a melhor condição é utilizando o 0,250g de 2-butanol, 6 esferas e 2,5mL de anidrido acético. Deste modo, constatou-se ainda que o 2-butanol acetilado possui um excesso enantiométrico

de 89% do isômero R.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FUNCAP.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, T. L. de. Redução de aldeídos monoterpênicos aromáticos utilizando *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em quitina. 1995, Tese (Mestrado em Química Orgânica), Universidade Federal do Ceará;
- ASSUNÇÃO, J. C. C.; MACHADO, L. L.; LEMOS, T. L. G.; CORDELL, G. A.; MONTE, F. J. Q., Sugar cane juice for the bioreduction of carbonyl compounds, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 52-53, p.194-198. (2008)
- FONSECA, A. M.; MONTE, F. J. Q.; OLIVEIRA, M. C. F.; MATTOS, M. C.; CORDELL, G. A.; BRAZ-FILHO, R.; LEMOS, T. L. G., Coconut water (*Cocos nucifera* L.)—A new biocatalyst system for organic synthesis, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 57 (2009) 78-82.
- GIORDANI, R.; MOULINA, A.; VERGER, R.; *Phytochemistry*, v.30, n.4, p. 1069-1072. 1991.
- GRANADA, G. G.; ZAMBIAZI R. C.; MENDONÇA, C. R. B.; ABACAXI: Produção, Mercado e Subprodutos. *Revista B. CEPPA*, v.22, n.2, p. 405-422, jul./Dez. 2004.
- HARTREE, E. F., Determination of proteins: a modification of the Lowry method that give a linear photometric response, *Analytical Biochemistry*, v. 48, p. 422, 1972.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2013.
- JONG, S. C.; BIRMINGHAM, J. M., *Advances in Applied Microbiology*, 37, p. 101, 1992.
- KALOGERIS, E.; SANAKIS, Y.; MAMMA, D.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; STAMATIS, H. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 1113-1121, 2006.
- LAUFENBERG, G. Transformation of vegetable waste into added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technology*, 87, pp.167-198, 2003.
- MACHADO, L. L.; LEMOS, T. L. G. L.; DE MATTOS, M. C.; DE OLIVEIRA, M. C. F.; DE GONZALO, G.; GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; GOTOR, V. Immobilized *Manihot esculenta* preparation as a novel biocatalyst in the enantioselective acetylation of racemic alcohols, *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 19, 12, p. 1419-1424, 2008a.
- MACHADO, L. L.; SOUZA, J. S. N.; DE MATTOS, M. C.; SAKATA, S. K.; CORDELL, G. A.; LEMOS, T. L. G., Bioreduction of Aldehydes and Ketones Using *Manihot* species. *Phytochemistry*, v. 67, 1637, 2006.
- MACHADO, L. L.; MONTE, F. J. Q.; OLIVEIRA, M. C. F.; DE MATTOS, M. C.; LEMOS, T. L. G. Bioreduction of aromatic aldehydes and ketones by fruits' barks of *Passiflora edulis*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 54, p. 103-106, 2008b.