

Utilização de Enzimas em Meio Orgânico

Enzimas imobilizadas e suas aplicações em síntese orgânica

Fotos cedidas pelos autores

Jair Juarez João

Professor e Pesquisador Dr. em Química Orgânica
Unisul - Universidade do Sul de Santa Catarina
jairj@unisul.rct-sc.br

Carla Rampinelli Zanella

Graduada (IC) em Química Industrial
Unisul - Universidade do Sul de Santa Catarina
carla@unisul.rct-sc.br

Enzimas são catalisadores de reações químicas em sistemas biológicos *in vivo*, envolvendo reações com substratos naturais e não naturais *in vitro*.¹⁻² As enzimas são geralmente de natureza protéica, altamente específicas e apresentam grande poder catalítico. As enzimas protéicas são proteínas de alto peso molecular formadas por subunidades conhecidas como aminoácidos, ligados entre si por ligações peptídicas. Possuem em suas estruturas grupos polares tais como COOH, OH, NH₂, SH e CONH₂, que atuam como catalisadores. Sua atividade e estrutura mais estável são mantidas em meio aquoso. As enzimas vêm sendo usadas por vários séculos, apesar de sua verdadeira natureza ter sido conhecida apenas recentemente. Elas, cada vez mais, apresentam grande importância na pesquisa científica, nos diagnósticos clínicos e na indústria.³⁻⁴

Aplicações de Enzimas em Síntese Orgânica

Na última década, as reações catalisadas por enzimas aumentaram dentro da química orgânica sintética. Estima-

se que das 25.000 enzimas presentes na natureza, cerca de 2.800 foram classificadas e perto de 400 são comercializadas de uma forma pura.⁵

O interesse em utilizar enzimas como catalisadores tem aumentado devido a sua alta versatilidade e às condições suaves de temperatura e pH em que se realizam as reações. Muitas são as vantagens de utilizar enzimas em métodos sintéticos, mas três características são as mais importantes: *Quimiosseletividade*, *Regiosseletividade* e *Enantiosse-*

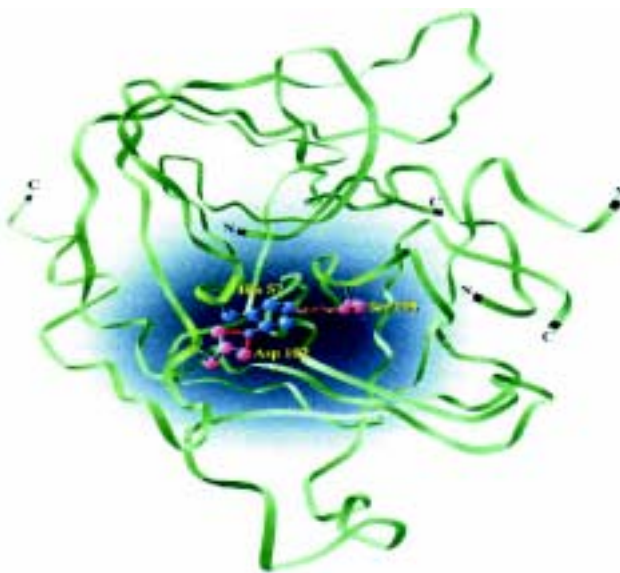


Figura 1 - Estrutura tridimensional da α -quimiotripsina¹

letividade.

A utilização de enzimas em meio aquoso foi extensivamente usada em processos catalíticos, tanto na área tecnológica como científica, por vários anos. Porém, seu uso tornou-se limitado, pelo fato de muitos substratos ser

pouco solúveis em água, o que necessitava de grande volume reacional e procedimentos de separação muito mais complicados. O uso de solventes orgânicos em reações enzimáticas superou esse problema e o desenvolvimento de novos métodos de imobilização permitiu que várias reações pudessem ser tornar viáveis.^{6 1 2 3 4 5 6} A adição de uma quantidade moderada de solvente orgânico é uma forma direta de aumentar a solubilidade de substratos hidrofóbicos e de tornar a reação possível.

A característica de instabilidade em meio orgânico, a faixa limitada de substrato específico e o alto custo têm sido considerados como os problemas mais sérios para o uso de enzimas como catalisadores sintéticos. A percepção, portanto, de que elas são intrinsecamente limitadas como catalisadores mudou atualmente devido aos novos desenvolvimentos em química e biologia e às novas exigências industriais. Um grande número de reações orgânicas podem ser realizadas com o uso de enzimas.⁷

Entre todos os tipos de reações catalisadas por enzimas, as transformações hidrolíticas, envolvendo a formação de ligações imídicas e éster podem ocorrer facilmente usando-se proteases, esterases ou lipases. Quando a enzima está operando em um ambiente que tenha baixa concentração de água, qualquer outro nucleófilo pode competir com a água e formar o produto a partir de um intermediário acil-enzima, levando assim a várias transformações sinteticamente úteis. Durante o curso da reação catalisada enzimaticamente, qualquer

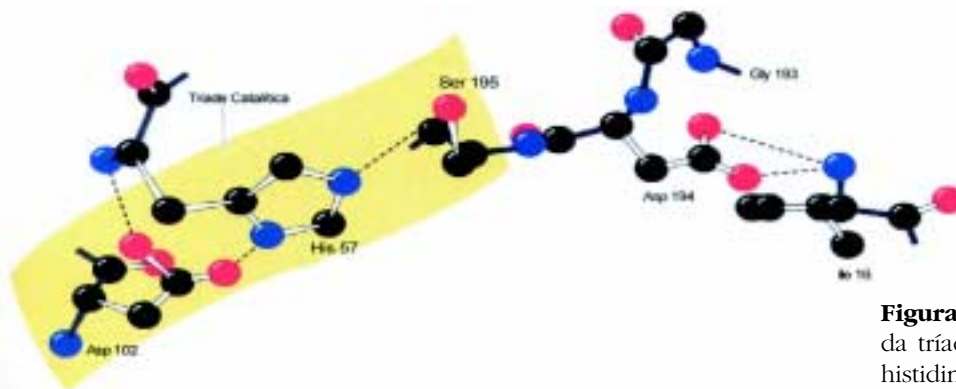


Figura 2 - Conformação da tríade catalítica serina-histidina-aspartato na quimiotripsina¹

Tabela 1 - Exemplos de atividades biológicas exercidas por formas enantioméricas puras de algumas drogas⁹

Fármacos	Efeitos
Etambutol	Forma SS: tuberculostático; forma RR : pode provocar cegueira
Penicilamina	Forma S: anti-artrítico; forma R : extremamente tóxico
Estrona	Forma (+): hormônio estrogênico; forma (-) : inativo
adrenalina	A forma levógira é 20 vezes mais ativa e igualmente mais tóxica
talidomida	Forma R: sedativo; forma S : teratogênico
salbutamol	Forma R(-) é 80 vezes mais ativo que a forma S(+)
bupivacaína	Forma (±): ambos os isômeros possuem atividade anestésica local, mas apenas os isômeros (-) apresentam ação vasoconstritora, prolongando assim a ação anestésica local.
anfetamina	A forma dextrógira é 2 vezes mais ativa que o enantiômetro (-)
indacrinosa	Forma (+): ação diurética e retenção do ácido úrico; Forma (-) : efeito uricosúrico
clorfeniramina	A atividade anti-histamínica é devida essencialmente à forma S(+).

tipo de quiralidade do substrato é reconhecida pela enzima, e isso causa uma preferência para as duas direções possíveis com relação à estereoquímica da reação.

Para a indústria farmacêutica, a utilização de enzimas como reagentes quirais em meio orgânico é de grande importância, visto que muitas drogas (fármacos) são comercializadas em sua forma racêmica, ou seja, impura.^{8,9}

As enzimas representam uma classe de catalisadores quirais potencialmente ativos e úteis para uma ampla faixa de transformações. Em muitos casos, são utilizadas como a única maneira possível de se detectar dois enantiômeros de um composto quiral e de se obter uma forma pura.

As enzimas hidrolíticas são os biocatalisadores mais usados em síntese orgânica, sendo de particular e grande interesse para o nosso trabalho as lipases. As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de triglicerídeos para formar ácidos graxos livres e glicerol. Apresentam peso molecular entre 40-50 kda com cerca de 300 resíduos de

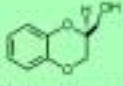
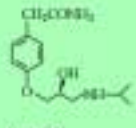
aminoácidos. As lipases são glicoproteínas nas quais a parte glicosilada hidrofóbica circunda o sítio ativo. Elas têm sido isoladas de uma variedade de tecidos de animais e plantas, podendo ser também produzidas por processos de fermentação usando várias espécies de microrganismos (fungos e bactérias).¹⁰ As vantagens de se utilizar lipases em meio orgânico, deve-se principalmente ao seu baixo custo, à disponibilidade comercial, à versatilidade catalítica, por não requererem cofatores, por serem regioespecíficas para a posição 1,3 de triglicerídeos, por serem estereosseletivas e atuarem em uma faixa de pH e temperatura bastante ampla. As reações catalisadas por lipases incluem esterificações, transesterificações, amidação, síntese de peptídeos e formação de lactonas macrocíclicas. A síntese de compostos orgânicos quirais via reações de esterificação e transesterificação enantiosseletivas de ésteres, são de interesse porque fornecem um método fácil para a preparação de álcoois e ácidos opticamente ativos. Mecanicamente, a síntese enzimática de éste-

res ou reação enzimática de transesterificação tem algumas características em comum com as reações da química clássica correspondente, mas os princípios que governam a especificidade estereoquímica são diferentes e assim justificam a sua utilização.¹¹

Vários estudos para a utilização de lipases em síntese orgânica têm sido direcionados para síntese (conversão) assimétrica, um dos temas mais importantes da síntese orgânica moderna e de grande interesse para a indústria farmacêutica, visto que a atividade biológica de muitos fármacos (drogas) racêmicos muitas vezes reside em um único enantiômero.¹² Portanto, a utilização de enzimas, e em especial as lipases, vem oferecendo excelentes possibilidades para obtenção de compostos enantiomericamente puros.

O uso desses biocatalisadores em meio orgânico vem superando muitas dificuldades encontradas quando se utilizam métodos químicos tradicionais. Além disso, a biotecnologia quiral produz compostos de uma forma mais pura.^{12,14}

Tabela 2 - Exemplos de algumas drogas resolvidas via catálise enzimática¹³

Compostos	Aplicação	Compostos	Aplicação
 1,4-benzodioxano	Agente cardiovascular	 Naproxen	Agente anti-inflamatório
 Castanospermina	Combate ao câncer (inibidor do vírus HIV)	 Dropropizina	Agente anti-tussígeno
 Atenolol	Tratamento da hipertensão e angina	 Taxol	Combate ao câncer

Nos últimos anos, estamos investigando o potencial catalítico de lipases imobilizadas em organo-gel, em resinas fenólicas e em quitina, para a formação de ésteres, formação de diésteres derivados de ácidos dicarboxílicos alifáticos e aplicação na resolução enantiosseletivas de álcoois secundários racêmicos. O presente trabalho aponta alguns resultados promissores na área de biocatálise e revela a eficiência desses sistemas de imobilização de enzimas. Este manuscrito tem por objetivo divulgar novas metodologias de imobilização de enzimas e suas aplicações em síntese orgânica.

Materiais e Métodos

Preparação do Organo-Gel^{7,11,15}

O organo-gel (MBG) foi preparado pela adição de uma solução de Aerosol-OT em hexano a 55°C a uma segunda solução de gelatina em água também a 55°C. A mistura foi, então, agitada, vigorosa e manualmente, e deixada esfriar a temperatura ambiente para formar um gel rígido e estável. A composição do organo-gel utilizado foi a seguinte: 1,40g de gelatina, 2,15 mL de água destilada, 4,00 mL de solução de Aerosol-OT 0,5M, 2,20 mL do solvente. A microemulsão água-óleo contendo a enzima foi preparada injetando 0,5 mL de uma solução aquosa de enzima

(*Lipolase*) na solução de Aerosol-OT. Após estabilização à temperatura ambiente, os géis foram armazenados em “freezer” para serem utilizados nas reações.

Os géis contendo enzima imobilizada foram retirados do “freezer”, rapida-

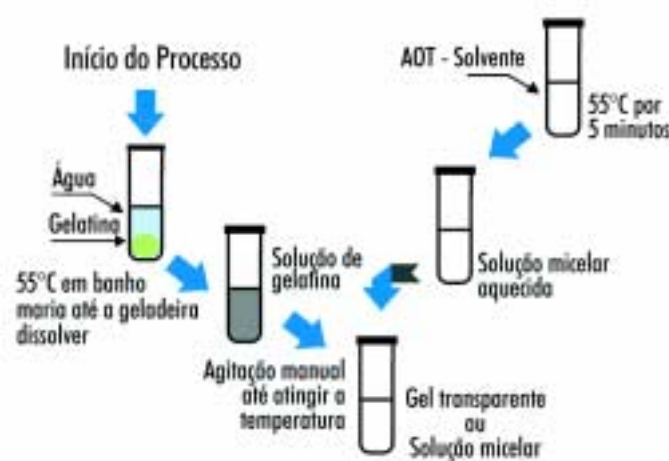


Figura 3 - Preparação do organo-gel

mente separados dos tubos de ensaio e, cortados em seções regulares de @ 125 mm³ e então removidos para um Erlenmeyer contendo 30 mL de hexano, estando assim prontos para serem utilizados nas reações em meio orgânico (Figura 4).

Suporte de Resina Fenólica: O suporte de resina fenólica contendo

enzimas imobilizadas foi retirado do “freezer”, rapidamente lhe foram removidos 0,5 gramas para um Erlenmeyer contendo hexano, e foram adicionados os substratos (ácidos e álcoois) na proporção de 1:1 (0,02mols).

Suporte de Quitina: O suporte foi preparado da seguinte maneira: a quitina bruta foi tratada e lavada com água. A quitina foi então filtrada a vácuo e, logo a seguir, colocada em um recipiente com solução tampão fosfato, pH = 7,2, e levada ao ultra-som onde permanece por aproximadamente 30 minutos. Novamente foi filtrada a vácuo e seca na estufa a 120°C, por 24 horas. Após o tratamento, a quitina pode ser utilizada para estudos cinéticos de adsorção e posteriores aplicações em reações de esterificação e transesterificação em meio orgânico.

As reações foram efetuadas sob agitação em um banho-maria tipo Dubnoff termostatizado a 25°C (Figura 5), acompanhadas por cromatografia de camada delgada, Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN¹H).

Todas as reações realizadas neste trabalho foram também efetuadas nas mesmas condições experimentais utilizando-se suportes controle, isto é, sem enzima imobilizada, não observando reação nos períodos em que foram realizados os experimentos.

Resultados e Discussão

Efeito do Solvente

Em todos os sistemas biocatalíticos contendo solventes, a atividade catalítica e a estabilidade da enzima é influenciada pela natureza desses solventes. A polaridade do solvente é extremamente importante. Sendo assim, uma maior solvatação ou interação do solvente com o sítio ativo da enzima poderá levar a uma redução de sua atividade catalítica. Para investigar o efeito do solvente no sistema de enzimas imobilizadas em resina fenólica, diferentes solventes foram utilizados na reação de diesterificação do ácido adipico com o butanol (**eq.1**).

Relacionou-se os dados de rendimentos (Tabela 3) dos diésteres obtidos com parâmetros físicos-químicos dos solventes, tais como log P, solubilidade de Hildebrand e a constante

dielétrica.

Dos parâmetros apontados, o que apresenta uma melhor correlação entre atividade enzimática e a polaridade do solvente é o log P (Coeficiente de Partição).¹⁶ Esse coeficiente é um indicador da hidrofobicidade das substâncias, e é usado como medida da polaridade. De acordo com os resultados obtidos, observou-se um aumento no rendimento dos diésteres formados com o aumento dos valores de log P, ou seja, os melhores rendimentos foram obtidos com a utilização de solventes mais apolares (hexano, heptano, etc.).

Resultados semelhantes foram obtidos para a reação de esterificação do ácido octanóico com o pentanol, utilizando *Lipolase* imobilizada em organo-gel e *lipase de Candida cylindracea* (*CCL*) imobilizada em quitina.

Síntese de Ésteres Alifáticos

Ésteres podem ser obtidos enzimaticamente por síntese direta (ácido e álcool) ou por reações de transesterificação (éster e álcool). São compostos orgânicos com grande aplicação na indústria alimentícia como flavorizantes e aromatizantes. Esses compostos são sintetizados por métodos químicos, porém métodos enzimáticos estão tornando-se mais atrativos. Assim, a fim de avaliar o efeito da atividade de diferentes lipases imobilizadas em MBG e em resina fenólica, uma série de ésteres foram sintetizados usando ácidos e álcoois alifáticos primários via reações de esterificação.

De maneira geral, os rendimentos obtidos para esterificação do ácido octanóico e hexanóico com os diferentes álcoois alifáticos primários, ficaram sempre acima de 90% (Tabela 2), independentemente da enzima e do suporte utilizado, que pode ser explicado pela alta eficiência das enzimas para estes substratos. Exceções foram observadas para o metanol e etanol, o que pode estar associado com a polaridade destes substratos. Isto se aplica para todos aqueles substratos que apresentam uma maior polaridade (por ex. ácido acético

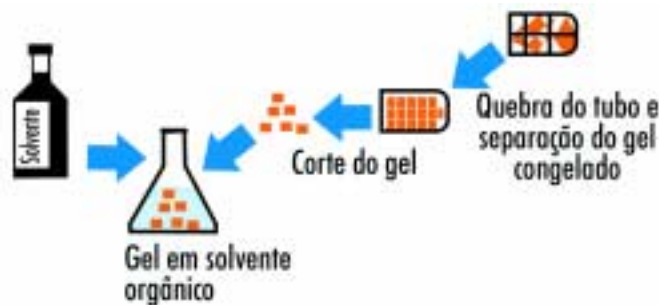


Figura 4 - Preparação do meio reacional do sistema organo-gel

e ácido benzóico). O efeito da diminuição no rendimento da reação causado pelo aumento da cadeia carbônica do álcool (acima de 5 átomos de carbono), pode ser atribuído ao efeito de reconhecimento da enzima, ou seja, subs-



Figura 5 - Banho maria tipo Dubnoff, utilizado nas reações

tratos de cadeia carbônicas maiores estão impedidos estericamente não se alojando efetivamente no centro ativo da enzima para que possa ocorrer a catálise.

O organo-gel foi destruído por alguns substratos polares, como o ácido acético e o metanol. Já o suporte de resina fenólica possibilitou a síntese de ésteres com aroma de frutas, que apresentam esses substratos (polares) como precursores.

Reutilização do Catalisador

Uma das grandes vantagens da utilização de enzimas imobilizadas em resina fenólica, organo-gel e quitina está na sua reutilização. Esse é um fator importante quando se considera a apli-

cação prática de um catalisador em um método particular de síntese, em razão de seu alto custo para os processos empregados.

As lipases, *Lipozyme IM*, *Lipolase* e *Candida cylindracea*, imobilizadas em resina fenólica, organo-gel e quitina, respectivamente, foram utilizadas em repetidas preparações do octanoato de butila.

As enzimas mantiveram-se ativas depois de 12 conversões com um rendimento na faixa de 80-95 %. Assim, fica claro que a atividade catalítica das enzimas, neste suporte, mantem-se num nível muito bom, considerando-se o número de repetições do experimento. Não foram observadas mudanças na aparência física do suporte durante a realização do experimento.

Considerações Finais: Os sistemas de organo-gel, quitina e resina fenólica mostraram-se eficientes para imobilização de enzimas e para sua aplicação em síntese orgânica. Simples preparação, facilidade para separar os produtos do biocatalisador e conservação das propriedades enzimáticas foram algumas das vantagens apresentadas por esses sistemas. Além disso, em contraste com outros processos comumente usados, esses sistemas apresentam um baixo conteúdo de água e têm a vantagem de ser reprodutíveis. Termodinamicamente estável, utiliza baixa concentração de enzima e pode ser reutilizado. É importante salientar que, no momento, estamos investigando o potencial das enzimas imobilizadas nesses suportes, na resolução enantiosseletivas de álcoois secundários racêmicos via reações de transesterificação. Até o momento, obtivemos baixos valores de excessos enantioméricos (**ee**) para resolução enantiosseletivas do (±)-2-hexanol e do (±)-2-octanol. Esses baixos valores de excessos enantioméricos encontrados talvez possam ser superados utilizando enzimas mais puras ou aumentando a sua concentração no meio reacional.

Referências Bibliográficas

1. STRYER, L. **Bioquímica**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1992.
2. WONG, C.; WHITESIDES, M. **Tetrahedron organic chemistry series**. 1ª ed. Pergamon, v.12, Enzymes in synthetic organic chemistry, 1994.



Tabela 3 - Rendimentos da reação de diesterificação do ácido adípico com butanol em diferentes solventes orgânicos catalisada pela lipozyme IM imobilizada em resina fenólica

Solvente	Rendimento do diéster (%) ^(a)	Cte dielétrica (ε)	Parâmetro de solubilidade Hildebrand (δ)	Log P
1,4- dioxano	10	2,21	10,0	-1,10
DMF	12	36,7	-	-1,00
acetonitrila	37	37,5	11,9	-0,33
acetona	51	10,7	9,8	-0,23
éter etílico	55	-	-	0,85
diclorometano	58	9,08	9,7	0,93
clorofórmio	61	4,81	9,3	2,00
tolueno	66	2,44	8,9	2,50
CCl ₄	72	2,24	8,6	3,00
ciclohexano	92	2,02	8,2	3,20
hexano	93	1,89	7,3	3,50
heptano	100	-	-	4,00

(a) determinados por ¹H-RMN

Tabela 4 - Rendimento dos ésteres obtidos para a reação de esterificação dos ácidos carboxílicos com os diferentes álcoois alifáticos primários, catalisada pela Lipozyme IM imobilizada em resina fenólica e a lipolase imobilizada em organo-gel a 25°C

Éster formado	Rendimento (%) ^(a)	
	Lipozyme IM ^(b)	Lipolase ^(c)
Acetato de n-propila	5%	0%
Acetato de isopentila	7%	0%
Acetato de n-octila	4%	0%
Acetato de Benzila	8%	0%
Hexanoato de metila	65%	42%
Hexanoato de etila	76%	58%
Hexanoato de n-butila	93%	82%
Hexanoato de n-pentila	93%	88%
Hexanoato de iso-pentila	92%	80%
Hexanoato de undecila	90%	72%
Octanoato de etila	25%	24%
Octanoato de propila	67%	53%
Octanoato de butila	95%	92%
Octanoato de pentila	93%	93%
Octanoato de hexila	92%	78%
Octanoato de octila	82%	72%
Octanoato de decila	77%	57%
Octanoato de undecila	76%	49%

(a) Os rendimentos foram determinados por ressonância Magnética de próton (¹H-RMN);

(b) Lipozyme IM Imobilizada em resina fenólica; (c) Lipolase imobilizada em organo-gel

- LEHNINGER, A. **Bioquímica: Componentes moleculares das células**. Edgard Blücher Ltda, 1976.
- VOET, D.; VOET, J. **Biochemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1990.
- BERGER, D. L.; **Aroma Biotechnology**. Hannover, Springer. 1995.
- JONES, J. B.; "Enzymes in Organic Synthesis", **Tetrahedron**, 42, 3351, 1986.
- JOÃO, J. J.; "Estudos de reações de transesterificação com lipases imobilizadas e determinação de coeficiente de difusão de ésteres em organo-gel", **Tese de Doutorado**, UFSC, Florianópolis, SC, 1999.
- BARREIRO, E. J.; FERREIRA, V. F.; COSTA, P. R.R.; "Substâncias Enantiomericamente Puras: A Questão dos Fármacos Quirais", **Química Nova**, 20, 647, 1997.
- LIMA, V. L. E.; "Os Fármacos e a Quiralidade uma Breve Abordagem", **Química Nova**, 20, 657, 1997.
- FABER, K.; **Biotransformations in Organic Chemistry**, 3rd Edition, Spring-Verlag, New York, 1997.
- JESUS, P.C.; JOÃO, J. J.; BURLIN, G.; SILVA, P.L.F.; NASCIMENTO, M.G.; "Organo-Gel: Um Novo Sistema para a Imobilização de Lipases e sua Aplicação em Síntese Orgânica", **Química Nova**, 20, 664, 1997.
- JESUS, P.C.; SILVA, P.L.F.; JOÃO, J.J.; NASCIMENTO, M.G.; "Enantioselective Esterification of 2-Methylpentanoic Acid Catalysed via Immobilized Lipases in Chrysolite and Microemulsion-Based Gels", **Synthetic Communication**, 28, 15, 1998.
- JESUS, P. C.; "Enzimas Imobilizadas em Crisotila e Organo-gel: Aplicação na Resolução de Ácidos Racêmicos", **Tese de Doutorado**, UFSC, Florianópolis, SC, 1998.
- JOÃO J. J.; JESUS, P.C.; NASCIMENTO, M.G.; "Reações de Transesterificação Enantioselectivas com Lipases Imobilizadas em Organo-Gel", 20 Reunião da Sociedade Brasileira de Química, Livro de Resumos. v. 02, 1997.
- JOÃO, J. J.; JESUS, P.C.; NASCIMENTO, M.G.; "Diffusion Coefficient Measurements of Alkyl Benzoates in Organo-Gels", **Atualidades de Físico-Química Orgânica**, 519-533, 1998
- LAANE, C.; BEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C.; "Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents", **Biotechnol. and Bioeng.**; 30, 81, 1987.