

Síntese de Derivados de Morita-Baylis-Hillman

Synthesis of Morita-Baylis-Hillman Adducts

RESUMO

A biocatálise trouxe um novo significado à química orgânica e às indústrias ao surgir como uma alternativa sustentável e segura aos processos químicos. A utilização de lipases microbianas é abrangente, principalmente em aplicações comerciais, devido a sua capacidade catalítica e seletiva. Três lipases produzidas pelos fungos *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium sp*, pertencentes à coleção da Prof^a. Dr^a. Adriana Knob do Departamento de Biologia Geral da Unicentro, serão utilizadas em reações de hidrólise de adutos racêmicos obtidos pela reação de Morita-Baylis-Hillman (MBH), assim como na reação de esterificação do ibuprofeno, a fim de se comparar o potencial de enantiosseletividade biocatalítica dessas enzimas. Devido a pandemia, não foi possível concluir todas as etapas da metodologia e, portanto, não se obteve resultados.

PALAVRAS-CHAVE: Reações. Química. Enzimas microbianas. Catálise.

ABSTRACT

Biocatalysis has brought new meaning to organic chemistry and industries by emerging as a sustainable and safe alternative to chemical processes. The use of microbial lipases is broad, mainly in commercial applications, due to its catalytic and selective capacity. Three lipases produced by the fungi *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum* and *Penicillium sp*, belonging to the collection of Prof^a. Dr^a. Adriana Knob of Unicentro's Department of General Biology, will be used in hydrolysis reactions of racemic adducts obtained by the Morita-Baylis-Hillman reaction (MBH), as well as in the esterification reaction of ibuprofen, in order to compare the potential of enantioselective biocatalysis of these enzymes. Due to the pandemic, it was not possible to complete all stages of the methodology and, therefore, no results were obtained.

KEYWORDS: Reactions. Chemical. Microbial enzymes. Catalysis.

Letícia Nunes Ribeiro

nr-leeticia@hotmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Luciano Fernandes

lfernandes@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Luciana de Boer Pinheiro de Souza

lucianaboer@gmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Lauanny Raira Bençal

lauannyrb@hotmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Jennyfer Caroline Dzazio

jennedzazio@gmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Helen Raquel Almeida Zander

helen_zander123@gmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Christopher Hilbert Dipp de Oliveira

dipp.christopher@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil



INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores biológicos utilizados para aumentar a velocidade das reações, as quais ocorreriam em velocidade mínima ou não ocorreriam em condições normais. Hoje são amplamente utilizadas em processos industriais, apresentando um cenário de maior sustentabilidade, uma vez que elas apresentam diversas vantagens em seu uso, como a menor geração de poluentes e de resíduos químicos, além de necessitarem de temperaturas brandas, pH neutro, apresentando alta eficiência catalítica e especificidade enantiomérica na síntese de produtos quirais (ADRIO; DEMAIN, 2014).

Existem classificações para os diversos tipos de enzimas de acordo com a reação que ela catalisa e, conseqüentemente, o seu modo de atuação. Dentre elas, têm-se as oxirredutases, as quais catalisam reações de oxidação ou redução, as transferases, as quais podem transferir grupos funcionais específicos, as hidrolases, que catalisam reações de hidrólise ou de esterificação conforme a quantidade de água existente no meio, as liases, uma vez que rompem ligações duplas, as isomerases, as quais permitem a conversão em formas cis ou trans de moléculas, e, por fim, as ligases, que possibilitam a ligação de duas moléculas ou grupos funcionais (NELSON; COX, 2019).

Dentre essas classificações, identifica-se a lipase como uma das enzimas hidrolíticas de maior interesse por sua capacidade catalítica em diversas reações. Ela pode ser de origem animal, vegetal ou microbiana, contudo as microbianas são as mais utilizadas, principalmente as obtidas pelos fungos, que as produzem em ambiente extracelular, permitindo a facilidade na recuperação (CARVALHO *et al*, 2005).

De acordo com Carvalho *et al* (2005), as lipases têm sido utilizadas principalmente em produção de fármacos por sua capacidade enantiosseletiva, ou seja, elas identificam centros quirais, e atuarem de forma preferencial em algum dos isômeros da mistura racêmica. Esta mistura racêmica, ou racemato, é uma mistura de enantiomêros causada pela produção de um composto quiral sem a indução de enantiosseletividade.

A reação de Morita-Baylis-Hillman é muito utilizada por seu alto rendimento, pela utilização de reagentes de baixo custo, pela possibilidade de ser realizado em grande escala, pela não utilização de metais pesados e por seus produtos reacionais terem utilização variada e poderem facilmente serem transformados em outros produtos de interesse (SILVA, 2018). Ela é uma reação que ocorre entre um carbono eletrofílico de uma molécula, geralmente um aldeído, “com um composto carbonilado alfa-beta insaturado, catalisada por um reagente fortemente básico não nucleofílico (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano - DABCO)” (FERNANDES, 2007, p. 24). A molécula com grupo eletrofílico pode ser um aldeído, uma cetona ou uma imina. Assim, o produto final apresenta uma ligação carbono-carbono, que une os dois compostos iniciais, formando produtos com centros quirais, no entanto em suas formas racêmicas (SILVA, 2018).

Com a grande demanda industrial pela síntese de compostos enantioméricos puros, a biocatálise surgiu como uma alternativa sustentável e economicamente viável, uma vez que permite uma maior qualidade e segurança dos processos, bem como baixo impacto socioambiental (SANTOS, 2017). Devido a isso, diversos trabalhos, como o de Zhang *et al* (2017), Strub, Garboś e Lochyński (2016), Bençal

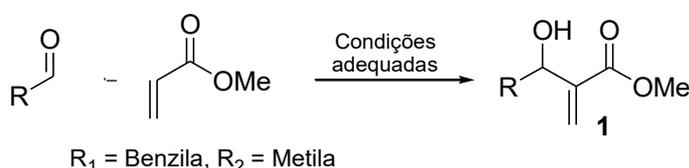
(2019), Carvalho *et al* (2002), Zanotto *et al* (2009) e Yousefi, Mohammadi e Habibi (2014), vêm sendo realizados para testar e identificar microrganismos capazes de produzir lipases que, em reações de síntese, de hidrólise, de esterificação, entre outros, desses compostos, obtenham alta eficiência na conversão de produtos enantioméricamente puros. Em Santos (2017), por exemplo, há um estudo sobre a biocatálise na síntese de α -metil- β -hidroxiésteres quirais, via síntese biocatalítica e biorredução enantiosseletivas.

Portanto, a fim de se estudar a capacidade enantiosseletiva de compostos pela lipase, produzida pelos microrganismos *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium sp*, serão realizadas reações biocatalíticas para a hidrólise dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (MBH) na forma quiral. Em paralelo, a enantiosseletividade dessas lipases também serão testadas na síntese de ésteres do ibuprofeno.

METODOLOGIA

Para a síntese de adutos padrão de MBH, adicionou-se, a um balão reacional, 3 equivalentes de acrilato de metila, 1 equivalente do aldeído correspondente e 0,15 equivalente de DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano). A mistura reacional é deixada à temperatura ambiente sob agitação magnética. Após 2-30 dias, diluiu-se com CH_2Cl_2 , a fase orgânica foi lavada com H_2O , brine, secada, purificada em coluna de sílica e concentrada em rota evaporador, obtendo-se após purificação os hidroxi ésteres α , β -insaturados **1**, como mostra a Figura 1.

Figura 1 – Reação geral de síntese de α -metil- β -hidroxiésteres



Fonte: Fernandes (2007, p. 25).

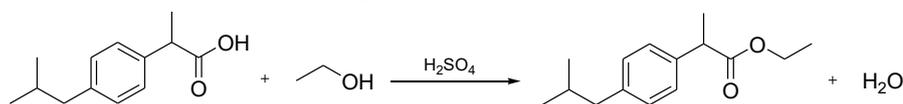
Ao final do tempo de reação, foi adicionado ao balão reacional um pouco de diclorometano e água a fim de parar a reação. Com o auxílio de um funil, o conteúdo do balão reacional foi transferido para um funil de extração, onde adicionou-se mais um pouco de diclorometano e água até a formação de fases. Após misturar bem, com agitação orbitalar, apoiou-se o funil de extração em um suporte, retirou-se a tampa e observou-se a formação de duas fases, uma aquosa, em cima, e outra orgânica, logo abaixo. A fase orgânica foi retirada para um erlenmeyer, deixando a fase aquosa no funil de extração. Retirou-se a fase aquosa do funil e repetiu-se o procedimento por mais duas vezes. Ao final, lavou-se com brine (solução saturada de NaCl) para aumentar a força iônica do meio e inibir possíveis formações de emulsões. Por fim, adicionou-se sulfato de sódio à fase orgânica, para que qualquer resíduo aquoso possa ser retirado, o produto então foi filtrado e rota evaporado.

Para se obter o produto puro, em um béquer, misturou-se sílica com o solvente hexano grau PA. Logo após, transferiu-se o conteúdo do béquer para a coluna garantindo que ela ficasse bem compacta e sem rachaduras. Em seguida,

adicionou-se hexano, deixando ele descer até atingir a linha da sílica e fechou-se a saída. Colocou-se o material da reação Morita-Baylis-Hillman em cima da sílica de forma constante e espalhado igualmente em forma de disco. Depois, foi adicionado, constantemente, o eluente (20% de acetato de etila em hexano) de forma a não deixar secar a sílica. Acompanhou-se o material que saía da coluna por meio da corrida em placa cromatográfica e os béqueres foram separados de acordo com o material lá identificado, podendo ser álcool, aldeído ou ambos. O conteúdo dos béqueres que continham álcool foram rotaevaporados e obtivemos o álcool puro advindo da reação de Morita-Baylis-Hillman.

Em paralelo, a reação padrão de esterificação do ibuprofeno também foi realizada. Mas, anteriormente à essa reação, o ibuprofeno foi obtido da seguinte forma. Triturou-se 20 comprimidos de Ibuprofeno (Buprovil 600 mg) e solubilizou-os em 500 mL de acetato de etila grau PA. Manteve-se a solução sob agitação magnética por 20 minutos, filtrou e rotaevaporou-se, obtendo, assim, o ibuprofeno na sua forma única. Para realizar a esterificação, solubilizou-se, em um balão reacional, 7,7626 g de ibuprofeno em 50 mL de etanol e acrescentou-se 0,50 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄). No balão adicionou-se também esferas de vidro e deixou-o em refluxo por 4 horas. Após o término do refluxo, o conteúdo do balão foi transferido para um funil de extração e lavado com diclorometano e água por quatro vezes, sempre separando a fase aquosa da orgânica, adicionou-se sulfato de sódio à fase orgânica para retirar qualquer vestígio de água e rotaevaporou-se até que a massa permanecesse constante. Foi efetuada a cromatografia em papel do ibuprofeno puro e do produto esterificado em solução 10% de acetato de etila em hexano e em solução de 5% de acetato de etila em hexano, a fim de verificar o sucesso da reação. O mecanismo pode ser melhor observado no esquema 1.

Esquema 1 – Reação geral de esterificação do ibuprofeno



Fonte: Autoria própria (2020).

Para o crescimento das cepas fúngicas foi preparado um meio líquido de 1,5 L com 3 g de asparagina, 3 g de glicose, 1,5 g de fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄), 0,75 g de sulfato de magnésio (MgSO₄), 7,5 mg de cloridrato de tiamina, 2,175 mg de nitrato de ferro (Fe (NO₃)₃), 0,35 mg de sulfato de manganês (MnSO₄) e 30 mL de óleo de girassol. Separou-se 9 erlenmeyers com 150 mL de meio líquido em cada e foram levados para autoclavar por 15 minutos à 121°C. Utilizou-se três cepas, sendo elas a *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium sp*, pertencentes à coleção da Prof^a. Dr^a. Adriana Knob do Departamento de Biologia Geral da Unicentro. O crescimento das cepas foi realizado em triplicata, ou seja, 9 furos da primeira cepa foram inoculados em 3 erlenmeyers, sendo 3 furos em cada, e o mesmo foi feito com as outras cepas para os outros 6 erlenmeyers. A inoculação foi efetuada em um fluxo e os erlenmeyers foram levados ao shaker, à 200 rpm e temperatura de 31°C, onde permaneceram sob essas condições por 10 dias. Após retirá-los do shaker, filtrou-se à vácuo e o micélio de cada cepa foi colocado em placas de petri, envoltos por papel insulfilm e deixados no dessecador por mais 10 dias (ZANOTTO *et al*, 2009).

Após a realização das reações padrão de MBH e de esterificação do ibuprofeno, assim como a obtenção das enzimas lipase pelas cepas fúngicas, serão preparadas reações biocatalíticas enantiosseletiva de hidrólise dos adutos racêmicos de MBH, assim como foi realizada a de síntese de ésteres do ibuprofeno.

A enzima escolhida para a reação de hidrólise dos adutos de MBH obtidos é a lipase que será produzida pelas cepas fúngicas *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium sp.* A metodologia a ser utilizada se baseará na apresentada por Mukherjee e Kiewitt (1991) e Tanaka, Hirano e Funada (1992), como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Composição da reação de hidrólise dos adutos de MBH

Fungos	Enzima	α -metil- β -hidroxiéster	Água destilada
<i>Trichoderma harzianum</i>	18 mg	174 mg	12 μ L
<i>Fusarium oxysporum</i>	18 mg	174 mg	12 μ L
<i>Penicillium sp</i>	18 mg	174 mg	12 μ L

Fonte: Autoria própria (2020).

Essas reações serão realizadas em triplicata, dispostas no shaker à 500 rpm, em temperatura de 40°C por 4 dias. Após esse período de tempo, a enzima será separada dos produtos por centrifugação.

Para a esterificação do Ibuprofeno foram preparadas reações, baseando-se na metodologia utilizada por Yousefi, Mohammadi e Habibi (2014), como o apresentado na tabela 2.

Tabela 2 – Composição da reação de esterificação do ibuprofeno via biocatálise

Fungos	Enzima	Ibuprofeno	Álcool Etilico	Hexano
<i>Trichoderma harzianum</i>	100 mg	100 mg	0,3 mL	100 mL
<i>Penicillium sp</i>	100 mg	100 mg	0,3 mL	100 mL

Fonte: Autoria própria (2020).

Essas reações foram realizadas em triplicata, dispostas no shaker à 200 rpm e em 31°C por 5 dias. A cada dia foi retirada uma amostra de cada reação e reservada em eppendorf, devidamente identificado.

Por fim, a análise dos resultados por cromatografia gasosa será realizada verificando a formação de produto, assim como a porcentagem de conversão (%c), equação 1, o excesso enantiomérico (%ee) e o valor de enantiosseletividade (E), equação 2 (YOUSEFI; MOHAMMADI; HABIBI, 2014). Para tanto, será solubilizada 1 μ L de cada amostra que serão obtidas das reações acima descritas e dos padrões em hexano grau HPLC.

$$\%c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} * 100 \quad (1)$$

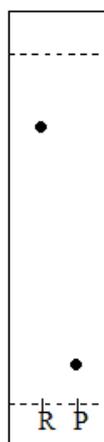
$$E = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_s)]}{\ln[(1-c)(1+ee_s)]} \quad (2)$$

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Cromatografia em camada delgada dos produtos obtidos pelas reações padrão.

Após a interrupção das reações da figura 1, de síntese de adutos de MBH, elas foram tratadas e purificadas. No entanto, antes dessas duas etapas realizou-se a cromatografia em camada delgada para confirmar a obtenção dos produtos desejados. Obteve-se os produtos esperados ao verificar, como mostra a figura 2, que os produtos ficaram mais retidos, pois os α -metileno- β -hidroxiésteres possuem maior afinidade pela fase estacionária polar, enquanto que o aldeído de partida com maior interação pela a fase móvel, foi mais eluído.

Figura 2 – Cromatografia em camada delgada do aldeído (reagente) e do produto da reação de MBH (r= reagente, p= produto)



Fonte: Autoria própria (2020).

A cromatografia em papel também foi realizada na verificação da síntese do éster e foi possível observar quando comparou-se a afinidade do ibuprofeno e do éster sintetizado, sendo que o ibuprofeno possui maior interação com a fase estacionária e o produto esterificado maior interação com a fase móvel, de acordo com a figura 3.

Figura 3 – Cromatografia em camada delgada do ibuprofeno e do produto da reação de esterificação (r= reagente, p= produto)



Fonte: Autoria própria (2020).

CONCLUSÃO

Não foi possível realizar algumas etapas da metodologia, a hidrólise de adutos derivados das reações de MBH e a análise dos resultados por cromatografia gasosa, devido ao início da pandemia ocasionada pelo COVID-19 em meados de março de 2020, a qual impossibilitou a utilização dos laboratórios da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). A pesquisa dará continuidade assim que o país voltar à normalidade e as universidades permitirem a entrada de alunos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu professor orientador Luciano Fernandes e à Prof^a. Dr^a. Luciana de Boer Pinheiro de Souza por toda a dedicação ao meu projeto de iniciação científica e à UTFPR pela disponibilização dos laboratórios e materiais necessários para a realização das reações e análises.

REFERÊNCIAS

ADRIO, Jose L.; DEMAIN, Arnold L. **Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes**. Biomolecules. p. 117-139. 16 jan. 2014.

BENÇAL, Lauanny Raira. **Biorredução da p-Nitroacetofenona utilizando cepas fúngicas produtoras de enzimas desidrogenases**. 2019. 51 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharelado em Química Tecnológica Com Ênfase em Química Ambiental, Departamento de Química, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2019.

CARVALHO, Patrícia de Oliveira; CALAFATTI, Silvana Ap.; MARASSI, Maurício; SILVA, Daniela M. da; CONTESINI, Fabiano J.; BIZACO, Renato. **Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas**. Quím. Nova, v. 28, n. 4, p. 614-621, 13 abr. 2005. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/23681/1/S010040422005000400012.pdf>. Acesso em: jun. 2020.

CARVALHO, Patrícia de Oliveira; CAMPOS, Paula Renata Bueno; NOFFS, Maximiliano D'Addio; OLIVEIRA, Joaquim Gilberto de; SHIMIZU, Mário Tsunezi; SILVA, Daniela Martins da. **Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados**. Quím. Nova, Bragança Paulista, v. 26, n. 1, p. 75-80, jul. 2002. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422003000100014. Acesso em: jul. 2020.

FERNANDES, Luciano. **Estudos da reatividade de brometos alílicos derivados da reação de Morita-Baylis-Hillman frente a diferentes nucleófilos com aplicação em síntese de heterociclos**. 2007. 275 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

MUKHERJEE, K. D.; KIEWITT, I.; **Enrichment of 7-linolenic acid from fungal oil by lipase-catalysed reactions.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 1991, 35, 579.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

SANTOS, Luna Schlittler dos. **Sínteses quimioenzimáticas de moléculas bioativas: uma abordagem à química verde.** 2017. 204 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2017.

SILVA, Annelési Lopes da. **Epóxidos derivados dos adutos de Morita-Baylis-Hillman.** 2018. 66 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharelado em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2019.

STRUB, Daniel J.; GARBOŚ, Agata; LOCHYŃSKI, Stanisław. **Synthesis, lipase catalyzed kinetic resolution, and determination of the absolute configuration of enantiomers of the Morita-Baylis-Hillman adduct 3-hydroxy-2-methylenebutanenitrile.** Arkivoc. p. 313-323. 29 set. 2016. Disponível em: <http://www.arkat-usa.org/get-file/58049/>. Acesso em: jul. 2020.

TANAKA, Y.; HIRANO, J.; FUNADA, T.; **Concentration of Docosahexaenoic Acid in Glyceride by Hydrolysis of Fish Oil with Candida cylindracea Lipase.** J. Am. Oil Chem. Soc. 1992, 69, 1210.

YOUSEFI, Maryam; MOHAMMADI, Mehdi; HABIBI, Zohreh. **Enantioselective resolution of racemic ibuprofen esters using different lipases immobilized on octyl sepharose.** Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Tehran, p. 87-94. 18 mar. 2014.

ZANOTTO, Sandra P. *et al.* **Potencial Application in Biocatalysis of Micelium-Bound Lipases from Amazonian Fungi.** J. Braz Chem Soc., Manaus, v. 20, n. 6, p. 1046-1059, 2009.

ZHANG, W.; ZHAO, Z.; WANG, Z.; GUO, C.; WANG, C.; ZHAO, R.; WANG, L. **Lipase-Catalyzed Synthesis of Indolyl 4H-Chromenes via a Multicomponent Reaction in Ionic Liquid.** Catalysts, 2017, 7, 185. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/0781/d5fbc1a1472935d69d2139b1f921e74b5926.pdf>. Acesso em: jul. 2020.