

Redução de compostos carbonílicos: os talos de mamoeiro (*Carica papaya*) como reagente biocatalisador

I. S. de Jesus¹; F. B. Nogueira¹; A. M. Fonseca¹

¹Centro de Formação de Professores, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 45300-000, Amargosa-BAHIA, Brasil

ivasouza.quimica@gmail.com;

(Recebido em 10 de dezembro de 2012; aceito em 25 de março de 2013)

Os termos biocatálise ou biotransformação, de maneira geral, abrangem o processo em que um catalisador biológico é utilizado para a conversão de um substrato em um número limitado de etapas enzimáticas. O mamoeiro (*Carica papaya*) é da família Caricaceae e seu fruto, conhecido como “mamão”, contém compostos biologicamente ativos. O presente artigo tem por finalidade verificar o potencial biotecnológico das enzimas encontradas em amostras de talos de mamoeiro, bem como, a utilização de células imobilizadas a fim de realizar inúmeras reações, pois as mesmas podem ser reutilizadas, otimizando o processo reacional.

Palavras-chave: *Carica papaya*, cetonas, biorredução.

Reduction of Carbonyl Compounds: the papaya tree shafts (*Carica papaya*) as biocatalyst reagent

The term Biocatalysis or biotransformation, generally encompass the processes in which a biological catalyst is used for the conversion of a substrate in a limited number of enzymatic steps. The papaya (*Carica papaya*) is the family *Caricaceae*, its fruit, known as "papaya", contains biologically active compounds. This article is intended to verify the biotechnological potential of enzymes found in samples of papaya stalks as well as, the use of immobilized cells in order to perform numerous reactions, because they can be reused by optimizing the reaction process.

Keywords: *Carica papaya*, ketones, biorreduction.

1. INTRODUÇÃO

A biocatálise é um tipo de biotransformação, que tem como finalidade a transformação química, e que consiste no uso de catalisadores naturais - as enzimas - para realizar estas transformações em compostos orgânicos. Envolve os processos em que um catalisador biológico é utilizado para a conversão de um substrato em um número limitado de etapas enzimáticas.¹⁻² A escolha de um biocatalisador em química orgânica envolve a especificidade (químio-, regio- e enantiosseletividade) e a velocidade que a transformação desejada é efetuada. Estes pontos envolvem atributos relacionados a bases estruturais e mecânicas das transformações químicas³. As enzimas podem ser encontradas em células animais ou de plantas, bem como em microrganismos. Entretanto, quando a permeabilidade da membrana celular é insuficiente para a passagem do substrato ou quando ocorrem reações laterais indesejáveis, é necessário conduzir a biotransformação com enzimas isoladas ou purificadas⁴. As enzimas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para biotransformações. São catalisadores versáteis, existindo um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica⁵.

Realizar biotransformação em compostos orgânicos utilizando apenas enzimas vegetais é de grande relevância para a química orgânica e tem uma forte veia para o desenvolvimento em novas tecnologias, contribuindo para o conhecimento em Biotecnologia e Química Orgânica, o que constitui em uma poderosa ferramenta para a chamada “química ecologicamente correta”, a química verde. Essas reações são de extrema importância para o desenvolvimento de medicamentos, cosméticos, feromônios e na indústria de biocombustíveis, e desta forma, poderão contribuir para as áreas ambientais, farmacêuticas, industriais e de biotecnologia⁶.

A imobilização de células ou enzimas representa uma alternativa para a condução de bioprocessos uma vez que, teoricamente, os biocatalisadores imobilizados ficam retidos para serem utilizados por tempo indefinido⁷. Uma vantagem relacionada ao uso da imobilização enzimática se dá pela dificuldade em se recuperar a enzima do meio reacional ao final da catálise, aliada à instabilidade e frequente inadequabilidade para uso em determinados solventes e/ou condições de pH, temperatura e exposição a agentes desnaturantes, podendo ser superadas por meio da imobilização. A enzima imobilizada pode ser reutilizada e é normalmente mais estável em relação à enzima livre, com a vantagem adicional de possibilitar a realização de um processo contínuo⁸.

O mamoeiro (*Carica papaya*) é da família Caricaceae, e seu fruto, conhecido como “mamão”, contém compostos biologicamente ativos. A papaína, por exemplo, é uma enzima encontrada na casca do fruto, sendo útil na digestão, por ter a capacidade de realizar hidrólise em certos compostos orgânicos no organismo⁹.

Existem diversos materiais que podem ser utilizados como suporte para imobilização das células. A poliácridamida é um polímero formado pela mistura de dois monômeros, acrilamida e bisacrilamida, formando uma espécie de rede. Nesta perspectiva, foi utilizada a poliácridamida, que com o seu alto potencial de absorção se destaca como uma matriz bastante utilizada para a imobilização de enzimas¹⁰.

Face ao exposto, e dando continuidade ao projeto de detectar agentes biorredutores em determinados vegetais, o presente trabalho tem como objetivo investigar o potencial enzimático dos talos de mamão bem como, investigar o potencial enzimático dos talos de mamoeiro na forma imobilizada, pois as enzimas são catalisadores extremamente eficientes e são sensíveis à inativação por fatores como temperatura, solvente, pH, entre outros. Assim, um mecanismo de proteção das enzimas é essencial para que seu potencial catalítico se mantenha.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Experimental

2.1.1 Para células íntegras:

Os talos do mamoeiro (*Carica papaya*), após coletados, foram lavados com solução a 5% de hipoclorito sódico em repouso por 10 minutos. Em seguida, foram cortados em pequenos pedaços (cerca de 1 centímetro de comprimento) utilizando-se uma faca esterilizada. Logo em seguida, foram adicionados 200mg dos substratos: benzaldeído (1) e acetofenona (2) a cada 20g dos talos de mamoeiro e 140 mL de água destilada. Essa mistura reacional (**Figura 1**), foi posta sob agitação durante 72 horas, em agitador orbital na velocidade de 150 r.p.m. Após o término do tempo reacional, a mistura foi coletada e extraída com solvente orgânico (20 mL de acetato de etila), por três vezes, depois foi secada com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida.



Figura 1: Mistura reacional.

2.1.2. Para células imobilizadas:

Repetiu-se o experimento anterior, em seguida, as enzimas dos talos do mamoeiro foram imobilizadas com poliacrilamida em meio aquoso (**Figura 2a**), por tempo necessário para absorção das enzimas pelas poliacrilamidas (24 horas). Depois as esferas foram colocadas em uma placa de petri e postas em estufa biológica com temperatura controlada de 40° C, para secagem (**Figura 2b**).

Logo em seguida, foram utilizados 200 mg de linalol, 148 mg de anidrido acético, 20 mL de hexano e 100 mg de esferas imobilizadas e secas sob agitação a 150 rpm, à temperatura de 30°C durante 72 horas de reação.



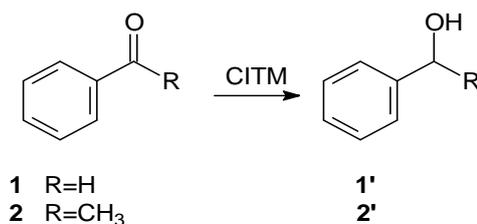
Figura 2a: As esferas das poliacrilamidas incorporadas.



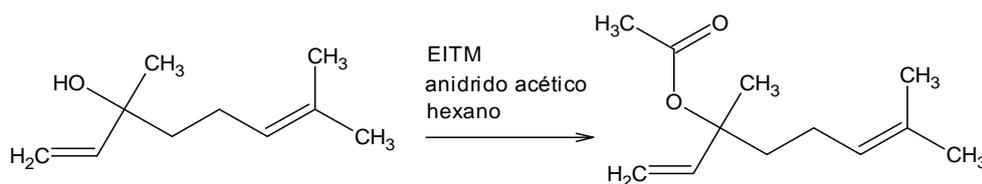
Figura 2b: As esferas incorporadas e secas.

2.2 Extração e isolamento

Após os procedimentos de extração, a fase orgânica devidamente seca, foi colocada em um balão e concentrada sob pressão reduzida. Os resíduos foram separados por filtração numa coluna curta de sílica gel, utilizando-se como eluentes o acetato de etila e o hexano numa proporção de 2:8. Assim, obtiveram-se os produtos reduzidos de *Carica papaya*, com uma conversão em massa de 112mg (56%) do álcool formado a partir do benzaldeído e uma conversão de 90mg (45%) do álcool formado e um e.e. de 97%, através da reação com o uso da acetofenona (**Esquema 1**). Para as células imobilizadas foi possível obter relativo resultado com reação de acetilação. As enzimas encontradas nos talos de mamoeiro foram incorporadas a uma matriz polimérica de poliacrilamida, com a finalidade de fornecer maior estabilidade, facilitar a recuperação e reutilização desses catalisadores. O acetato de linaloila foi obtido com rendimento de 35%. (**Esquema 2**).



Esquema 1: Biorredução dos compostos carbonílicos a partir das células íntegras dos talos do mamoeiro (CITM).



Esquema 2: Acetilação do Linalol utilizando as enzimas imobilizadas dos talos do mamoeiro (EITM).

2.3 Dados espectroscópicos

Os produtos foram analisados por GC-MS e FID e dados espectrais de RMN ^1H , em comparação com os valores da literatura, e foram totalmente caracterizados de acordo com os seus dados espectrais.¹¹⁻¹²

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados referem-se às reações descritas anteriormente de aldeído e cetona (benzaldeído e acetofenona). A análise inicial foi feita através de cromatografia em camada delgada (Figura 3a e 3b), na qual se pode perceber a diferença do fator de retenção do reagente e do seu respectivo produto.

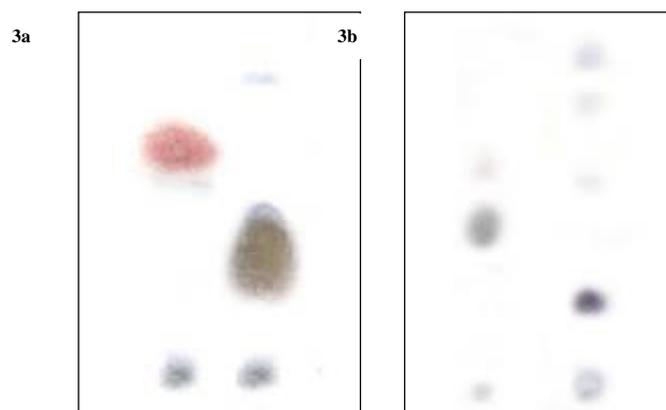


Figura 3. (3a) Cromatografia em camada delgada do benzaldeído e seu respectivo álcool. (3b) Cromatografia em camada delgada da acetofenona e seu respectivo álcool.

Os produtos foram analisados posteriormente por GC-MS, foi observado a partir das análises que houve a biorredução dos compostos carbonílicos, quando comparado os espectros dos substratos e seus respectivos produtos. A Figura 4 demonstra as análises para o benzaldeído (Figura 4a), e o seu respectivo álcool (Figura 4b).

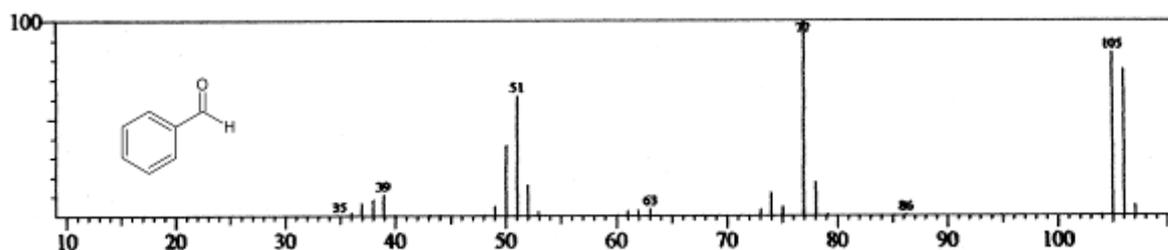


Figura 4a: Espectro de massa do benzaldeído.

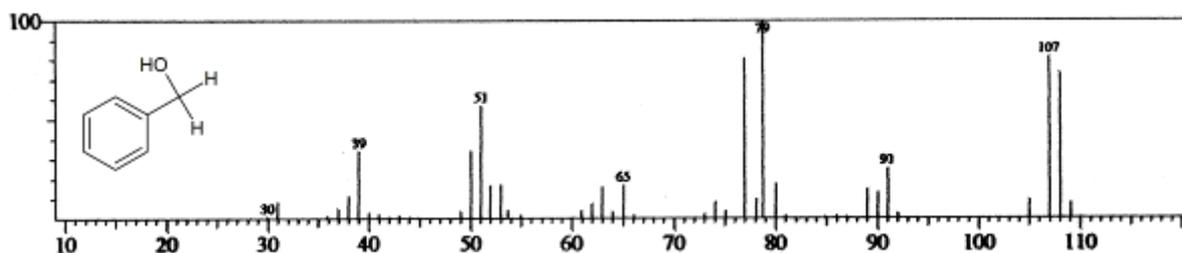


Figura 4b: Espectro de massa do álcool benzílico.

A seguir, nas Figuras 5a e 5b, são apresentados os espectros de RMN ^1H do benzaldeído e o álcool

benzílico, respectivamente. Estes resultados confirmaram aqueles já obtidos por GC-MS. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) tendo como referência interna para o RMN de ^1H o clorofórmio deuterado (CDCl_3).

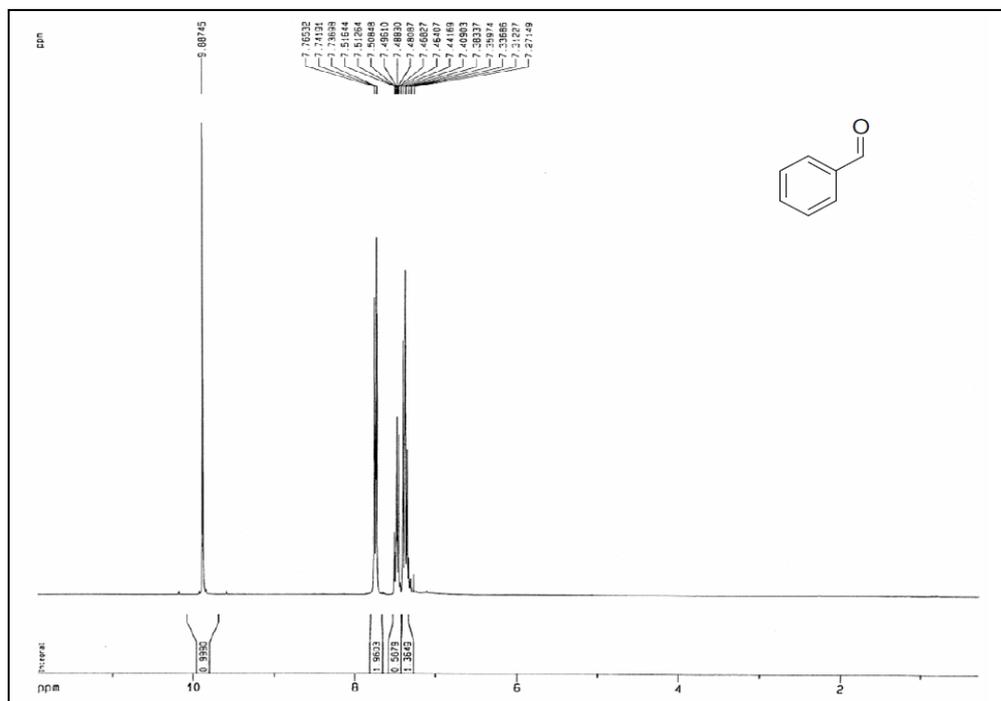


Figura 5a: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 1,88mmolL $^{-1}$ do benzaldeído).

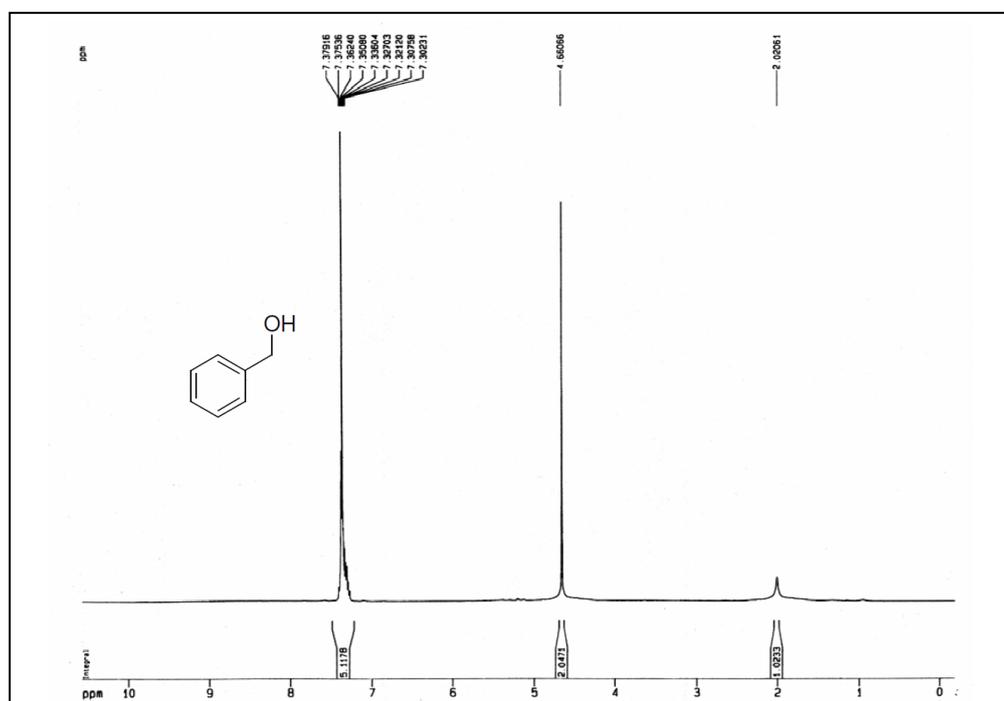


Figura 5b: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 do álcool benzílico).

As análises dos cromatogramas da acetofenona (**Figura 6a**), e do seu referido álcool (**Figura 6b**), assim como os espectros de RMN ^1H do substrato (**Figura 7a**) e do produto (**Figura 7b**), também comprovaram que houve biorredução a partir das CITM. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) tendo como referência interna para o RMN de ^1H o clorofórmio deuterado (CDCl_3).

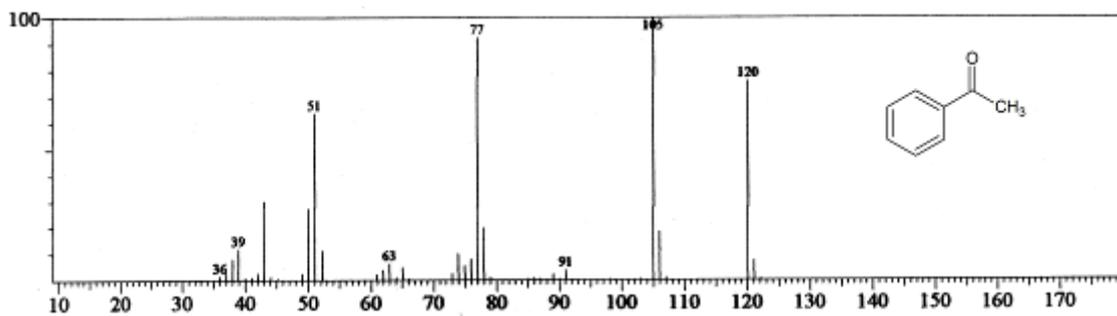


Figura 6a: Espectro de massa da acetofenona.

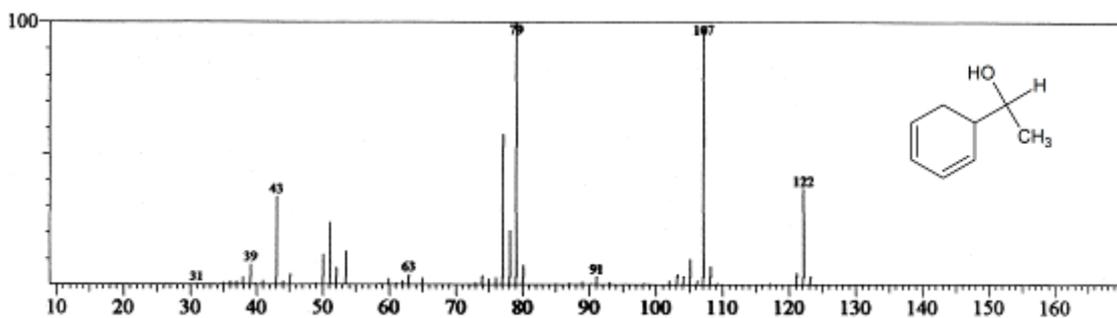
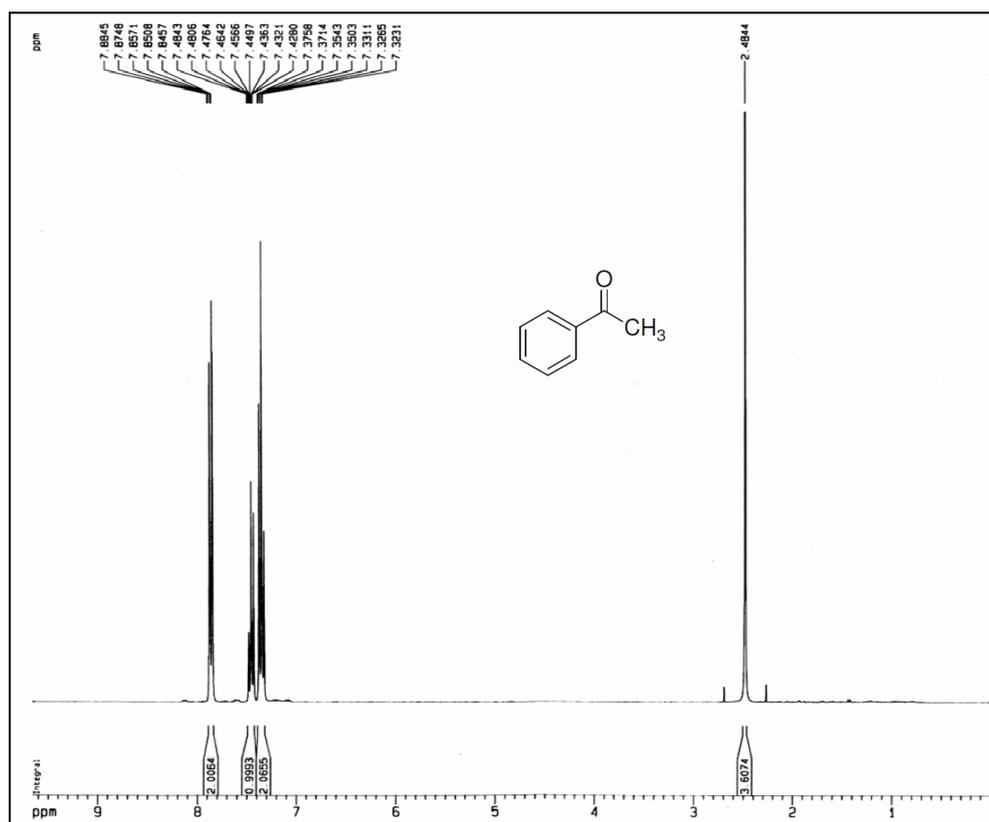


Figura 6b: Espectro de massa da 1-feniletanol.

Figura 7a: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , $1,66\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ da acetofenona).

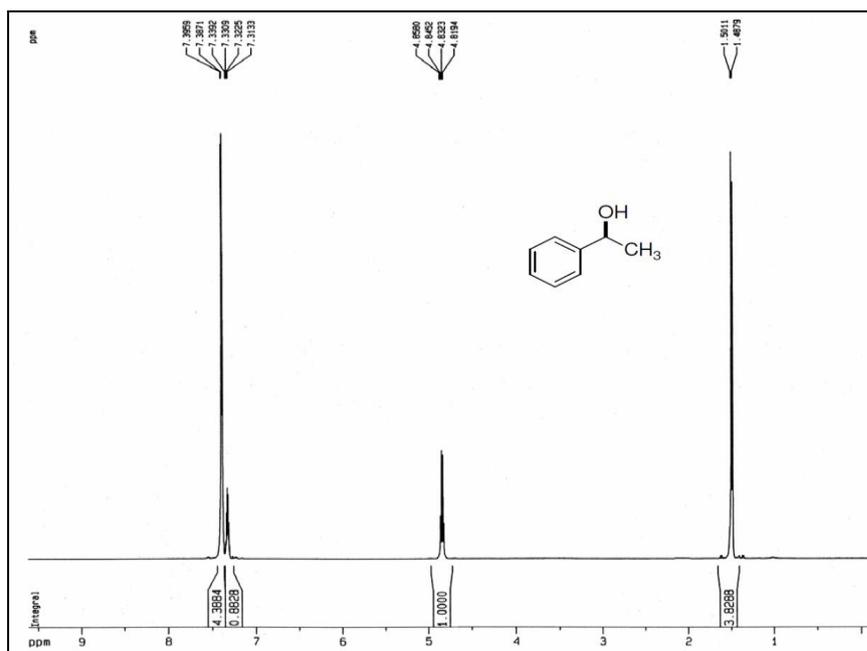


Figura 7b: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 do 1-feniletanol).

Para a imobilização das enzimas foi utilizado o processo de Kalogeris¹³. Primeiramente, uma leitura no espectrofotômetro de UV foi efetuada a partir do material enzimático e que foi utilizada para determinar o teor (0,9%) total de proteínas através de uma curva de calibração obtida utilizando soluções padrões de albumina bovina. Ao material enzimático (talos de mamoeiro em solução), foram adicionadas as microesferas de poliácridamida para imobilização das enzimas. As esferas foram separadas por filtração e a partir do filtrado foi efetuada uma leitura no espectrômetro. O valor dessa leitura (L_1) foi dividido pelo valor da primeira (L_0) e multiplicado por 100, obtendo-se assim, a percentagem de proteínas não imobilizadas (L_{ni}), como mostra na seguinte fórmula abaixo. Esta percentagem foi subtraída de 100 fornecendo a percentagem (95,0%) de enzimas imobilizadas dos talos-de-mamoeiro. As esferas de poliácridamida onde foram incorporadas as enzimas dos talos de mamoeiro foram testadas como biocatalisador na reação de acetilação do linalol, apresentando um relativo resultado (35%). A reação está mostrada no **Esquema 2**.

$$L_{ni} = \frac{L_1}{L_0} \cdot 100$$

4. CONCLUSÃO

Os talos da espécie *Carica papaya*, se apresentaram como um grupo de agentes biorredutores. Das células íntegras, foi possível realizar duas reações com resultados que comprovaram sua eficácia, com rendimentos que variam de 56% do álcool benzílico a 45% 1-feniletanol. O que implica que este material tem potencial enzimático que poderá possibilitar seu uso em preparação de compostos bioativos. Para as células imobilizadas foi possível obter relativo resultado com reação de acetilação com rendimento de 21,2% de acetato de linaloila. Assim, pode-se inferir que a matriz polimérica de poliácridamida, possibilita a reutilização desses catalizadores.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESB pelo suporte financeiro.

1. Omori, A. T.; Portas, V. B.; Oliveira, C. Redução Enzimática do 4-(dimetilamino) benzaldeído com pedaços de cenoura (*Daucus carota*): um experimento simples na compreensão da biocatálise. *Quím Nov.* 2012, 35 (2):1-3.
2. Oliveira, L. G.; Mantovani, S. M. Biological transformations: contributions and perspectives. *Quím Nov.* 2009 Abr; 32 (3): 745-756.
3. Koeller, K. M.; Wong, C. H.; Roberts, S. M. *Biocatalysis for fine chemicals synthesis*, Wiley: Weinheim, 1999. *Nature* 2001, 409,232;
4. Nascimento, M. G.; Soldi, V.; Dalla-Vecchia, R. Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros. *Quím Nov.* 2004 Mai; 27 (4): 623-630.
5. Faber, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry*. Springer-Verlag: Berlin, 1997.
6. Cordell, G. A.; Lemos, T. L. G.; Monte, F. J. Q.; De Mattos, M. C., *Vegetables as Chemical Reagents*, *J. Nat. Prod.* 2007, (70): 478-492.
7. Canilha, L.; Carvalho, V.; Biocatalisadores imobilizados: uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. *Biotec Ciên e Desenv.* IX 2006 Jul; 48 (36): 48-57.
8. Carvalho, V.; Canilha, L.; Silva, S. S. Uso de biocatalisadores imobilizados: Uma alternativa para condução de bioprocessos. *Rev Anal.* 2006, (23): 60-70.
9. Silva, J. A. T.; Rashid, Z.; Nhut, D. T.; Sivakumar, D.; Gera, A.; Souza, M. T.; Tennant, P. F. *Papaya (Carica papaya L.) Biology and Biotechnology*. Tree and Forestry Science and Biotechnology, Global Science Books. 2007, 39-46.
10. Hulst, A.C.; Tramper, J.; Brodelius, P.; Eijkenboom, L.J.c.; Lybem, K.C.A. Imobilized plant cells: respiration and oxygen transfer. *J. Chem Tec. Biotec.* 2009, 35 (3): 189-204.
11. Adams RP 2001. *Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Trap Mass Spectrometry*. Illinois: Allured Publishing Corporation.
12. Adams, R.P. 2007. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*. 4th edition. Allured Publishing Corporation, Carol Stream. 803 p.
13. Kalogeris, E.; Sanakis, Y.; Mamma, D.; Christakopoulos, P.; Kekos, D.; Stamatis, H. Properties of catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* immobilized in calcium alginate hidrogels. *Enz Micro Tec.* 2006; 39: 1113-1121.