



## ESTUDO INICIAL PARA O DESENVOLVIMENTO DE UMA REAÇÃO DE HENRY BIOCATALISADA POR PAPAÍNA BRUTA LIVRE E IMOBILIZADA

Jhonatas G. de S. Tiago<sup>1</sup>; Angelo A. T. da Silva<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Instituto Federal do Rio de Janeiro, Campus Nilópolis, Nilópolis-RJ, 26530-060, Brasil.

**Palavras-Chave:** Biocatálise enzimática, Sustentabilidade, Imobilização enzimática

### Introdução

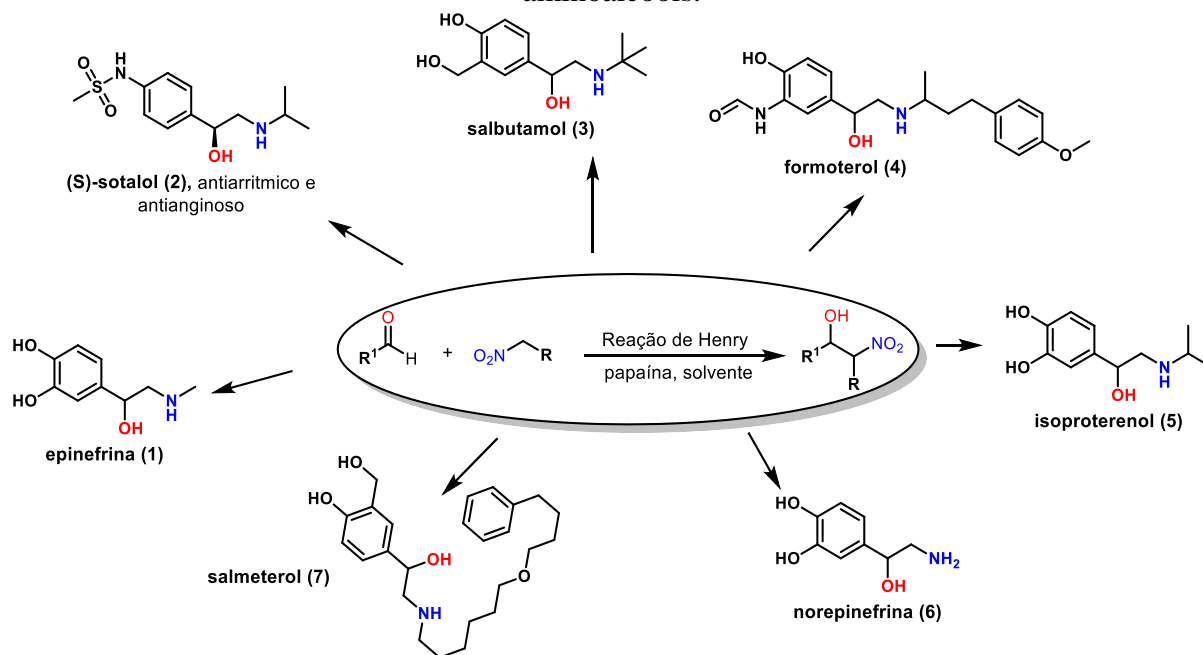
A reação de Henry desempenha um papel fundamental na transformação química de compostos orgânicos, e é altamente empregada na síntese de diversos intermediários que são utilizados nas áreas farmacêuticas, medicinais e até mesmo em química de materiais (Bao *et al.*, 2022). Esse processo consiste em uma reação de adição entre um aldeído (ou cetona) e um composto nitro, onde o hidrogênio ácido desse composto é desprotonado na presença de um catalisador, formando um íon nitro que ataca a carbonila do substrato, formando um nitro-álcool. Para a desprotonação do composto nitrogenado, comumente, são utilizadas bases, que atuam como base de Bronsted-Lowry, recebendo o próton e catalisando a reação, porém, o objetivo do nosso projeto é substituir as bases que são comumente utilizadas por papaína, que é uma enzima proteolítica encontrada no látex do mamão verde *Carica papaya*. A papaína (EC 3.4.22.2), também chamada de Papaína protease I (PPI), é uma endopeptidase cisteína de 23,4 kDa e 212 resíduos, pertencente à subfamília C1A das proteases semelhantes à papaína. Sua importância comercial se deve principalmente à sua forte atividade proteolítica contra uma ampla gama de substratos proteicos e à sua atividade em diversas condições operacionais. Essas características permitiram que a papaína liderasse o mercado de proteases, superando outras proteases derivadas de plantas, como a bromelina (*Ananas comosus*) e a ficina (*Ficus carica*), bem como proteases de origem fúngica (Fernández-Lucas; Castañeda; Hormigo, 2017).

As reações de biocatálise enzimática são extremamente importantes na síntese orgânica, devido a várias vantagens que as enzimas oferecem em comparação com os catalisadores químicos tradicionais, tais como: alta especificidade e seletividade, versatilidade, condições reacionais brandas, eficiência catalítica, sustentabilidade e amigabilidade ambiental (Bell *et al.*, 2021; Winkler; Schrittwieser; Kroutil, 2021). Soma-se a essas vantagens a capacidade de reduzir alguns danos que o uso de catalisadores químicos pode gerar em relação a eficiência e impactos ambientais, incluindo a geração de resíduos, o alto consumo de energia, a emissão de gases poluentes. Dito isso, a utilização de um biocatalisador nessa reação mostra-se como uma alternativa altamente promissora, visando principalmente a sustentabilidade.

O projeto tem como objetivo principal o desenvolvimento da reação de Henry biocatalisada por papaína imobilizada. A imobilização “é o confinamento da enzima a uma fase (matriz/suporte) diferente da dos substratos e produtos” (Datta; Christena; Rajaram, 2013), p. 1, tradução nossa). A imobilização visa melhorar e conferir algumas propriedades das enzimas, tais como facilidade de manipulação e aumento da atividade. Uma enzima imobilizada é composta basicamente por um suporte (ou matriz), a enzima e um modo de fixação. Esses suportes podem ser orgânicos ou inorgânicos, e podem ser subdivididos em polímeros naturais e sintéticos (Mohamad *et al.*, 2015). Dentre as vantagens da imobilização estão: aumento da estabilidade e tolerância a solventes orgânicos, a temperatura, ao pH e a contaminantes; além disso, aumenta a eficiência da reciclagem enzimática, reuso da enzima após um ciclo de reação catalítica, o qual é objetivado quando se imobiliza uma enzima, conferindo, assim, um ganho econômico, principalmente em escala industrial com operações de fluxo contínuo (Mohamad *et al.*, 2015; Sheldon; Brady, 2018).

O produto reação de Henry, um  $\beta$ -nitroálcool, é um importante intermediário para a síntese de fármacos  $\beta$ -aminoálcoois:  $\beta$ -bloqueadores antiasmáticos, antiarrítmico e antianginoso (isoproterenol, sotalol, salmeterol, salbutamol, formoterol) e de algumas monoaminas (epinefrina, noradrenalina) (**Esquema 1**) (BLAY; HERNÁNDEZ-OLMOS; PEDRO, 2010; BALLINI; PETRINI, 2008; SUKHORUKOV; SUKHANOVA; ZLOTIN, 2016; SUN *et al.*, 2018).

**ESQUEMA 1**– Reação de Henry biocatalisada por papaína e sua aplicação na síntese de  $\beta$ -aminoálcoois.



**FONTE** – Elaboração própria.

Por fim, a aplicação desta promissora metodologia sustentável possibilitará a ampliação das linhas de pesquisa em biocatálise voltadas para esse tema.

## Material e Métodos

Para a extração da papaína diretamente do mamão verde, obtido do horto do IFRJ-campus Nilópolis, foi utilizada a metodologia modificada descrita na literatura (Pereira, 2015; Rojas *et al.*, 2018), onde o mamão verde (*Carica papaya*) sofreu incisões longitudinais de até 2 mm de profundidade, as quais eram realizadas com um estilete lavado e higienizado. O látex liberado pelo mamão era recolhido em recipientes adequados, congelado e liofilizado (K105 LIOTOP) durante 5 (cinco) dias. Antes da imobilização, o resíduo obtido (papaína bruta) foi submetido ao processo de biocatálise.

O protocolo de imobilização da enzima com alginato executado foi o da literatura: a) verter uma solução aquosa de alginato de sódio 4% (Sigma-Aldrich) em uma suspensão em tampão fosfato 0,2M da papaína bruta liofilizada a 10% e misturar; b) gotejar lentamente uma solução de  $CaCl_2$  a 7%; c) filtrar as esferas e rinçar com água destilada; e d) secar ao ar ou à vácuo a temperatura ambiente (Datta; Christena; Rajaram, 2013; Guisan, 2013).

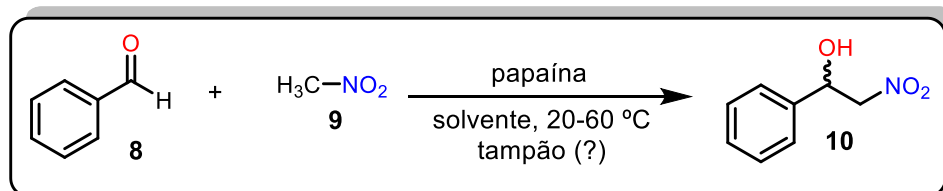
Foram utilizadas placas DiagTech DT3110H e blocos de aquecimento, visando controlar a temperatura das reações em aproximadamente  $60^\circ C$ . As reações eram feitas sob atmosfera inerte, com a utilização de argônio, para evitar que o benzaldeído sofresse oxidação pelo oxigênio presente na atmosfera e formasse ácido benzóico, o que possivelmente impossibilitaria a reação de acontecer.

Os ensaios iniciais com a papaína imobilizada seguiram os resultados obtidos nos projetos anteriores (Silva; Lima; Luz, 2021; Silva; Trevisan; Luz, 2020):

- papaína comercial pó (ACS Científica e Dinâmica) e a extraída brutas imobilizadas em alginato;
- benzaldeído P.A. (PROQUIMIOS) como substrato e nitrometano P.A. (PROQUIMIOS) como solvente;
- temperatura de 40°C a 60°C e baixa rotação magnética (<1500 rpm) por até 72h;
- cossolventes: hexano 95% (HPLC-S - BIO-GRADE); TBME HPLC >98,5% (SIGMA ALDRICH); acetonitrila 99,8% anidra (SIGMA ALDRICH); acetato de etila 99% (HPLC-S - BIO-GRADE); heptano P.A. (PROQUIMIOS); acetona (HPLC-S - BIO-GRADE); THF ≥99.9% HPLC (SIGMA ALDRICH).

Essas reações foram realizadas em *vial* de 7 mL em sistema fechado sem troca de atmosfera e foram acompanhadas por cromatografia em camada fina (CCF) (MCHENERY-NAGEL ALUGRAM Xtra SIL G/UV<sub>254</sub>) com fluoresceína (eluente 20% acetato de etila / hexano), e as manchas visualizadas em câmara de UV e, também, reveladas por KMnO<sub>4</sub>.

#### ESQUEMA 2– Protocolo para os estudos iniciais da biocatálise proposta.



FONTE - Elaboração própria.

O padrão reacional do produto racêmico foi preparado seguindo a metodologia descrita na literatura (Tanemura; Suzuki, 2018), utilizando benzaldeído como substrato, trietilamina como catalisadora e nitrometano como solvente e reagente ao mesmo tempo, sob agitação magnética e aquecimento entre 50°C e 60°C por duas horas.

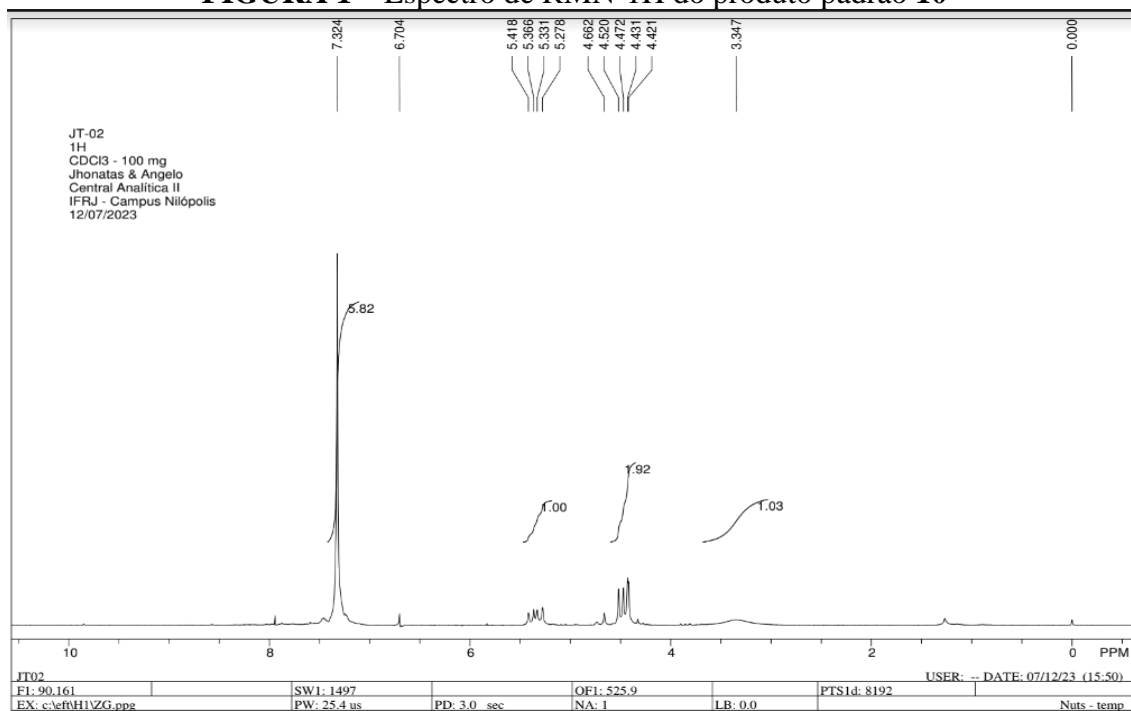
As substâncias isoladas foram identificadas através da combinação de várias técnicas espectrométricas, sendo elas: IV, RMN-13C e 1H (ressonância magnética nuclear de 90 MHz).

### Resultados e Discussão

Imobilizações com polissacarídeos diferentes da quitosana foram realizadas pelo grupo anteriormente. Os compostos utilizados foram quitosana, quitina, celulose (extraída da casca de abacaxi), dextrana e gel de ágar. Os pesquisadores não conseguiram testar as papaínas imobilizadas na reação de Henry, devido a pandemia inesperada no ano de 2020. Por mais que eles não tenham conseguido realizar ensaios utilizando papaína imobilizada, realizaram com papaína extraída, papaína comercial (SIGMA ALDRICH) e com a casca do mamão. A reação utilizando casca de mamão verde não apresentou nenhuma formação de produto, porém, tanto a extraída quanto a comercial apresentaram o produto desejado.

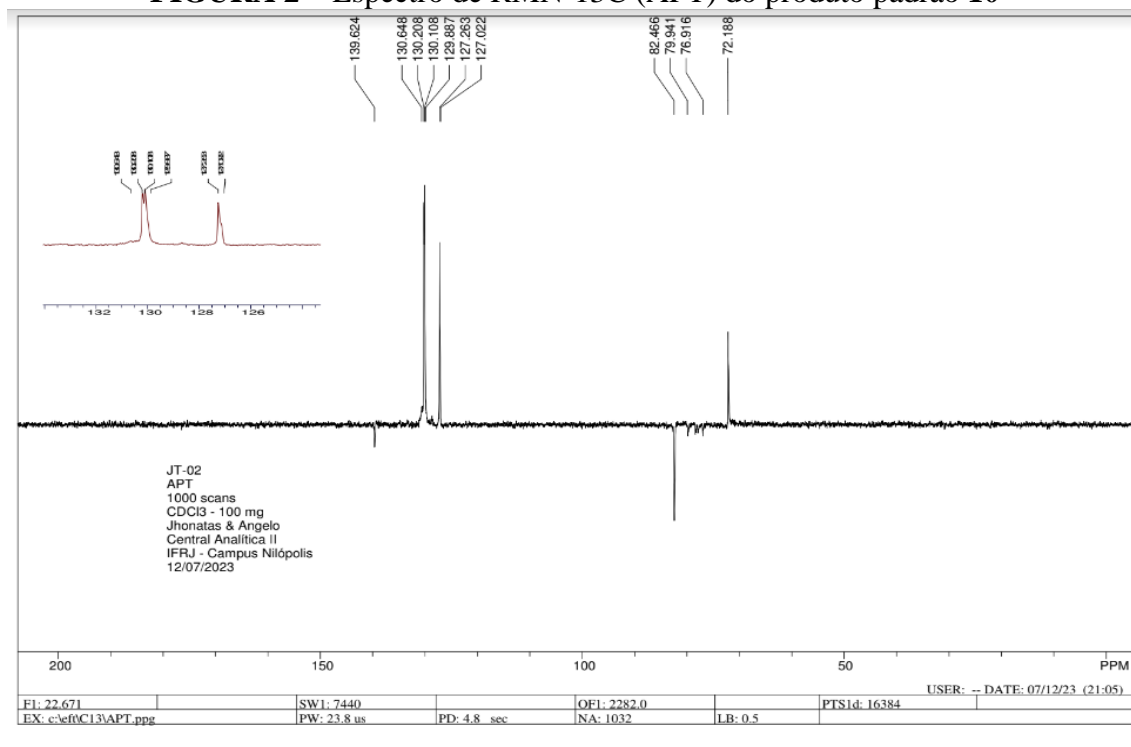
Desejando obter um padrão para o produto esperado, o atual grupo sintetizou o padrão do produto desejado, utilizando trietilamina como catalisadora da reação. O mesmo foi isolado e purificado. Os espectros da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (**Figuras 1 e 2; Tabela 1**) E infravermelho (**Figura 3**) deste produto final demonstraram que ele era o produto desejado.

**FIGURA 1 – Espectro de RMN-1H do produto padrão 10**



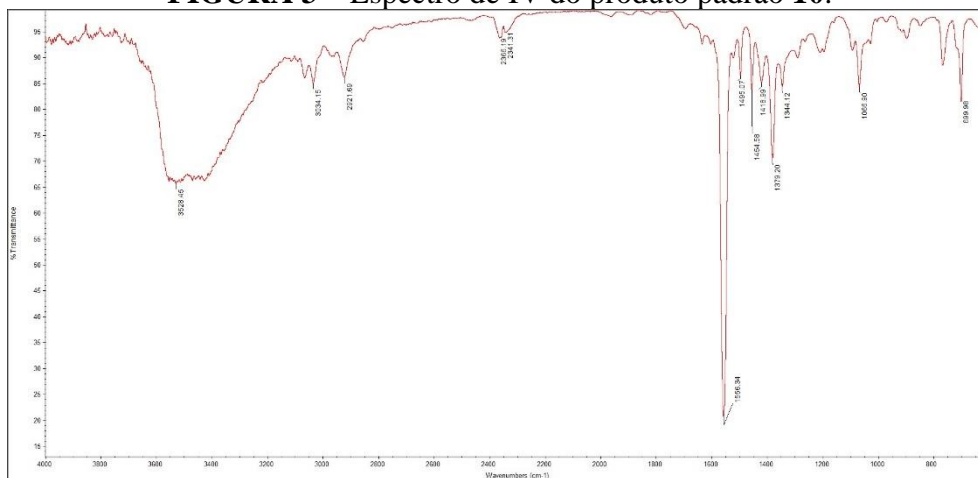
**FONTE -** Elaboração própria.

**FIGURA 2 – Espectro de RMN-13C (APT) do produto padrão 10**



**FONTE -** Elaboração própria.

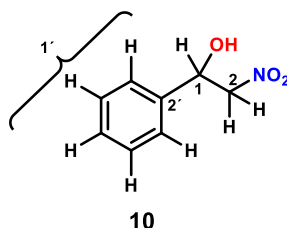
**FIGURA 3 – Espectro de IV do produto padrão 10.**



**FONTE -** Elaboração própria.

Os dados físicos (RMN e IV) foram analisados e condizentes com a estrutura esperada do produto, e compatíveis com os da literatura após comparação (Boobalan; Lee; Chen, 2012). Destaca-se principalmente os sinais do hidrogênio de OH (RMN-1H) e do carbono em C-OH (13C), bem como uma banda larga (deformação axial) de OH em 3528 cm<sup>-1</sup> e absorções fortes do grupo nitro em 1556 cm<sup>-1</sup> e 1379 cm<sup>-1</sup> (**Tabela 1**).

**TABELA 1 -** Dados de RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (em ppm) e IV (cm<sup>-1</sup>) do produto 10.



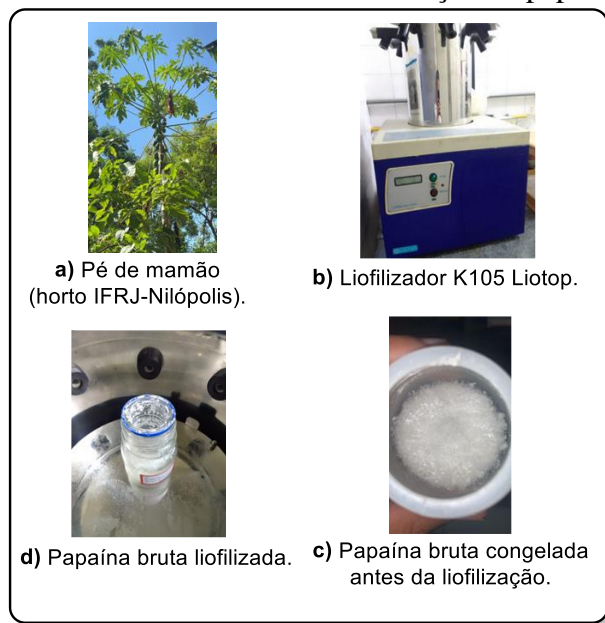
Posição	$\delta_H$ (J em Hz) <sup>2</sup>	$\delta_C$ (mult)
<b>1</b>	5,30-5,39 (m, 1H)	72,19 (CH)
<b>2<sup>1</sup></b>	4,42-4,52 (m, 2H)	82,47 (CH <sub>2</sub> )
<b>1'</b>	7,32 (central, m, 5H)	127,02; 127,26; 129,89; 130,11; 130,21 (CH)
<b>2'</b>	-	139,62 (Cq)
<b>OH</b>	3,35 (L)	-
<b>IV <math>\nu_{max}</math> cm<sup>-1</sup></b>	3528 (L), 3034, 2921, 2366 <sup>3</sup> e 2341 <sup>3</sup> , 1556 (F), 1495, 1454, 1418, 1379, 1066, 699.	

<sup>1</sup>Sinais de **2** referentes aos dois hidrogênios. <sup>2</sup>dd = duplo duplete; d = duplete, m = multiplete ou múltiplos sinais; L = largo. <sup>3</sup>Indicativo de impureza de CO<sub>2</sub>.

A extração da enzima foi realizada de três formas diferentes: com mamão (*Carica papaya*) verde comprado em mercado, com mamão verde arrancado direto do pé e com mamão verde ainda no pé. Os três mamões apresentaram presença da enzima, porém, em questão de quantidade, o mamão que ainda estava no pé foi o que mais ofereceu enzima. Isso ocorre porque a papaína é a enzima responsável pelo amadurecimento do mamão, e quando o mesmo é arrancado da árvore, a fonte enzimática é retirada, fazendo com que a concentração diminua. A extração seguiu o procedimento apresentado na metodologia, utilizando um estilete próprio e um pote adequado. Para o auxílio da extração, foi utilizado água destilada para lavar os mamões, que em seguida, era congelada e liofilizada, fazendo com que o produto final fosse um pó de coloração branca (**Figura 4a-d**).

A reação foi testada com três papaínas diferentes, a papaína extraída do fruto verde e duas papaínas comerciais de marcas diferentes (Dinâmica e ACS) (**Tabela 2**). Em todas as reações, a papaína extraída foi a que apresentou um melhor resultado.

**FIGURA 4** – Processo de liofilização da papaína.



**FONTE** - Elaboração própria.

A utilização do nitrometano como único solvente e reagente ao mesmo tempo foi algo reconsiderado ao longo da pesquisa, devido ao fato de que não estava sendo formado produto com as papaínas comerciais e do composto ser pouco econômico, tóxico, inflamável e até mesmo explosivo. Pensando nisso, foi realizado um estudo de cossolventes, na tentativa de aumentar o rendimento reacional e diminuir os possíveis impactos pela quantidade de nitrometano.

**TABELA 2** - Resultados do estudo de solventes.

Entrada	Cossolvente (1:1) <sup>a</sup>	Papaína extraída	Papaína pura (Dinâmica)	Papaína Pura (ACS)	Formação de subprodutos
1	-	<b>Positivo</b>	Negativo	Negativo	Negativo
2	Hexano	<b>Positivo</b>	Negativo	Negativo	Negativo
3	TBME	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4	Acetonitrila	<b>Positivo</b>	Negativo	Negativo	Negativo
5	Acetato de etila	<b>Positivo</b>	Negativo	Negativo	Negativo
6	Heptano	<b>Positivo</b>	Negativo	Negativo	Negativo
7	Acetona	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
8	Tetraidrofurano	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	Negativo	Negativo

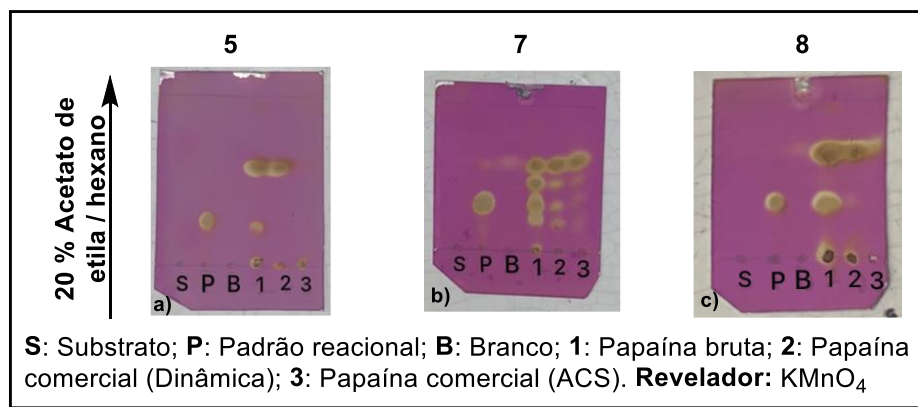
TBME: Éter de *t*-butila e metila. **Condição padrão:** 50 mg de papaína bruta livre, 1ml nitrometano (0,4 M; 46 eq.), 0,04 ml benzaldeído (0,4 mmol), 60 °C, 72 h.

<sup>a</sup> Com nitrometano para molaridade final de 0,4 M em relação ao benzaldeído.

**FONTE** - Elaboração própria.

O estudo foi qualitativo, ou seja, não houve uma quantificação de quanto produto estava sendo formado, sendo realizado apenas análise da cromatografia em camada fina (CCF) de cada reação, comparando com o padrão purificado anteriormente (**Figura 5**).

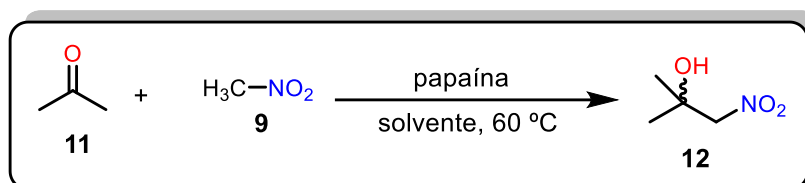
**FIGURA 5** - Cromatografia em camada fina (CCF) das reações das **entradas 5, 7 e 8** da **tabela 2**.



**FONTE** - Elaboração própria.

Como apresentado acima, até o presente momento, a reação com o tetraidrofurano (**Tabela 2, entrada 8**) apresentou ser o melhor cossolvente, pois foi catalisada por duas diferentes papaínas sem gerar subproduto. Embora todas as papaínas utilizadas tenham demonstrado atividade na reação com acetona, há formação de subprodutos indesejados. Tal formação já era esperada, mas não na quantidade qualitativamente observada, já que o benzaldeído ser bem mais reativo nesse tipo de reação. (**Esquema 3**).

**ESQUEMA 3** – Provável reação de formação do subproduto da reação da **entrada 7** na **tabela 2**.



**FONTE** - Elaboração própria.

A imobilização da enzima seguiu o procedimento descrito na metodologia, sendo obtidos no final do processo pequenas esferas de coloração branca (papaína imobilizada) (**Figura 6**). A única papaína imobilizada que demonstrou produto ao reagir foi a extraída, o estudo de solventes não havia sido feito ainda, mas pretendemos realizar novas reações para testar a atividade de todas as enzimas.

**FIGURA 6** - Papaína bruta imobilizada.



**FONTE** - Elaboração própria.

Buscando verificar as atividades enzimáticas das papaínas (bruta e imobilizada), foi realizado o teste de atividade com gelatina incolor (Sousa; Santos; Filho, 2017). O ensaio foi realizado em três tubos, dois desses continham um tipo de papaína, e no terceiro havia apenas água. A preparação das soluções de papaína consistiu na adição de aproximadamente 5,0g de papaína em 20,0 mL de  $2H_2O$  seguida de 1,50g do sal  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  e 10,0 mL de gelatina incolor (preparada pela dissolução de 2,0 g de gelatina incolor em 20,0 mL de água destilada sobre aquecimento), essas misturas foram levadas à centrífuga 3.050 r/min durante 20 minutos. Após esse tempo, os tubos foram levados à geladeira por aproximadamente 20 minutos. Foi observado que o único tubo em que a gelatina se solidificou foi o que não continha papaína, isso aconteceu porque a papaína é uma enzima proteolítica, que quebra as proteínas (como a gelatina) em fragmentos menores, destruindo a estrutura dela ao hidrolisar suas ligações peptídicas, impedindo a formação do gel e confirmando a atividade enzimática em ambas as papaínas.

### Conclusões

A extração e utilização da papaína extraída diretamente do mamão verde no pé se mostrou mais eficaz em comparação às papaínas comerciais testadas. O estudo de cossolventes revelou que o tetraidrofurano foi o melhor cossolvente, catalisando a reação de maneira eficiente sem a formação de subprodutos indesejados. A imobilização da enzima, embora não totalmente explorada nos testes, também apresentou potencial para futuras pesquisas. Esses resultados abrem novas perspectivas para a aplicação da papaína em processos biocatalíticos, destacando a importância da fonte e do método de extração na obtenção de enzimas de alta qualidade. Diante o estudo apresentado, pode-se concluir que a utilização da biocatálise enzimática, em especial a reação de Henry biocatalisada por papaína, apresenta-se como uma opção promissora na síntese de compostos orgânicos.

A procura por alternativas mais sustentáveis, eficientes e favoráveis ao meio ambiente vem sendo cada vez mais frequente na química orgânica, e a utilização de enzimas para biocatálise é uma resposta interessante para esses desafios. A imobilização enzimática e utilização do fluxo contínuo são auxiliares que apresentam um avanço de metodologias na área de síntese, demonstrando potencial de impactar positivamente pesquisas científicas de diversas áreas, principalmente na parte de fármacos.

O uso de papaína como biocatalisador na reação de Henry se apresentou como uma ótima alternativa durante o projeto apresentado, deve-se realizar mais estudos sobre a sua atividade enzimática e melhores comparações entre a enzima bruta e a enzima imobilizada. Intenciona-se, após o ajuste dos parâmetros de reação e obtenção de resultados mais robustos, a adaptação da reação para uso em sistema de fluxo contínuo de maneira a otimizar o processo e possibilitar o aumento da escala de formação de produto, objetivando, com isso, uma síntese total de moléculas biologicamente ativas de interesse.

### Agradecimentos

Agradecemos ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro de Nilópolis e à Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPI) por todos os investimentos no projeto.

### Referências

BAO, Xuefei *et al.* Recent advances in catalysts for the Henry reaction. **Australian Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 75, 2022. Disponível em: <https://discovery.researcher.life/article/recent-advances-in-catalysts-for-the-henry-reaction/fb097f17072e3a27905ab524aace6306>. Acesso em: 8 jan. 2023.

BELL, Elizabeth L. *et al.* Biocatalysis. **Nature Reviews Methods Primers**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 46, 2021.





BLAY, Gonzalo; HERNÁNDEZ-OLMOS, Víctor; PEDRO, José R. Synthesis of (S)-(+)-sotalol and (R)-(-)-isoproterenol via a catalytic enantioselective Henry reaction. **Tetrahedron: Asymmetry**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 578–581, 2010.

BOOBALAN, Ramalingam; LEE, Gene-Hsian; CHEN, Chinpiao. Copper complex of aminoisoborneol schiff base Cu<sub>2</sub> (SBAIB-d)<sub>2</sub>: an efficient catalyst for direct catalytic asymmetric nitroaldol (henry) reaction. **Advanced Synthesis and Catalysis**, [s. l.], v. 354, n. 13, p. 2511–2520, 2012.

DATTA, Sumitra; CHRISTENA, L. Rene; RAJARAM, Yamuna Rani Sriramulu. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1–9, 2013.

FERNÁNDEZ-LUCAS, Jesús; CASTAÑEDA, Daniel; HORMIGO, Daniel. New trends for a classical enzyme: papain, a biotechnological success story in the food industry. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 68, p. 91–101, 2017.

GUISAN, Jose M. (org.). **Immobilization of enzymes and cells**. Third Editioned. New York: Humana Press, 2013. (Methods in molecular biology, v. 1051).

MOHAMAD, Nur Royhaila *et al.* An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015.

NITROALKANES AS KEY BUILDING BLOCKS FOR THE SYNTHESIS OF HETEROCYCLIC DERIVATIVES. **Arkivoc**, [s. l.], v. 2009, n. 9, p. 195, 2008.

PEREIRA, Natalia De Oliveira. **Extração de papaína presente no látex da casca do mamão, avaliação enzimática e microbiológica**. 2015. 57 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA, Assis, 2015.

ROJAS, Luisa Fernanda *et al.* Extraction and identification of endopeptidases in convection dried papaya and pineapple residues: A methodological approach for application to higher scale. **Waste Management**, [s. l.], v. 78, p. 58–68, 2018.

SHELDON, Roger A.; BRADY, Dean. The limits to biocatalysis: pushing the envelope. **Chemical Communications**, [s. l.], v. 54, n. 48, p. 6088–6104, 2018.

SILVA, Angelo Amaro Theodoro da; LIMA, Juliana Silva de; LUZ, Mariana Silva da. **Papaína extraída e comercial na reação de henry biocatalisada: efeito da imobilização**. Nilópolis: IFRJ - campus Nilópolis, 2021.

SILVA, Angelo Amaro Theodoro da; TREVISAN, Lilian Xavier; LUZ, Mariana Silva da. Reação nitroaldólica biocatalizada por papaína extraída e comercial: ensaios iniciais. *In: XIII JORNADA INTERNA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA*, 2020. **Resumos**. [S. l.: s. n.], 2020.

SOUSA, A G; SANTOS, R A S; FILHO, J W Souza. Extração da papaína do látex do fruto de mamão e avaliação enzimática. [s. l.], 2017.

SUKHORUKOV, Alexey Yu.; SUKHANOVA, Anna A.; ZLOTIN, Sergei G. Stereoselective reactions of nitro compounds in the synthesis of natural compound analogs and active pharmaceutical ingredients. **Tetrahedron**, [s. l.], v. 72, n. 41, p. 6191–6281, 2016.

SUN, Huihua *et al.* Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 1275–1284, 2018.

TANEMURA, Kiyoshi; SUZUKI, Tsuneo. Base-catalyzed reactions enhanced by solid acids: Amine-catalyzed nitroaldol (Henry) reactions enhanced by silica gel or mesoporous silica SBA-15. **Tetrahedron Letters**, [s. l.], v. 59, n. 4, p. 392–396, 2018.

WINKLER, Christoph K.; SCHRITTWIESER, Joerg H.; KROUTIL, Wolfgang. Power of Biocatalysis for Organic Synthesis. **ACS Central Science**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 55–71, 2021.