



ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA

ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA

SÍNTESE VERDE DE CORANTES AZO UTILIZANDO LACASES

SARA RAQUEL TAVARES BAPTISTA

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do
Grau de Mestre em Engenharia Química e Biológica

Orientadores:

Professora Doutora Ana Catarina Cardoso de Sousa

Professora Doutora Maria Paula Alves Robalo

Júri:

Presidente: Professora Doutora Rita Isabel Dias Pacheco

Vogais: Professora Doutora Alexandra Maria Moita Antunes

Professora Doutora Ana Catarina Cardoso de Sousa

Lisboa

Dezembro 2017

Aos meus pais.

“Ninguém escapa ao sonho de voar, de ultrapassar os limites do espaço onde nasceu, de ver novos lugares e novas gentes. Mas saber ver em cada coisa, em cada pessoa, aquele algo que a define como especial, um objeto singular, um amigo – é fundamental. Navegar é preciso, reconhecer o valor das coisas e das pessoas, é mais preciso ainda!”

Antoine de Saint- Exupéry

Síntese verde de corantes azo utilizando lacases

Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade da lacase de origem bacteriana de *Bacillus subtilis* designada CotA-lacase em promover a formação de corantes azo por oxidação de diferentes aminas aromáticas, selecionadas com base na sua estrutura química. Foi também estudado o sistema catalítico CotA-lacase/mediador, onde se utilizou o ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS) como mediador para substratos que não sofrem oxidação com a enzima. Para ambos os sistemas oxidativos, CotA-lacase ou sistema CotA-lacase/ABTS, o foco foi o desenvolvimento de compostos azo em condições de síntese menos agressivas, contribuindo para o desenvolvimento de protocolos mais seguros e de menor impacto ambiental para a indústria dos corantes.

O trabalho de investigação realizado envolveu três etapas: *i)* seleção e caracterização de 18 substratos agrupados segundo a estrutura química apresentada; *ii)* avaliação de diferentes parâmetros e seleção das condições ótimas de reação a serem utilizadas (pH 6,0; [CotA-lacase] = 1 U/mL; [ABTS] = 1 mM) e *iii)* síntese e caracterização dos corantes produzidos.

A oxidação de aminas aromáticas *para*-substituídas com aminas terciárias e de aminas aromáticas *orto,para*-disubstituídas origina a formação de compostos azo, isolados com elevados valores de rendimento. Para os restantes substratos *para*-substituídos a formação de compostos azo ocorre em conjunto com outros compostos, tendo os produtos de reação sido isolados e caracterizados por espectroscopia de RMN e espectrometria de massa.

Numa análise crítica do processo enzimático em estudo, a CotA-lacase apresenta-se como um biocatalisador eficiente e capaz de substituir com sucesso o uso de oxidantes químicos para as reações estudadas.

Palavras-chave: Biocatálise, compostos azo, CotA-lacase e oxidação

Green synthesis of azobenzene dyes mediated by laccase

Abstract

This dissertation aims to evaluate the ability of the bacterial origin laccase - *Bacillus subtilis*, designated CotA-laccase, to promote the formation of azo dyes by oxidation of different aromatic amines selected based on their chemical structure. A catalytic laccase/mediator system was also studied in which 2,2'-azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) was used as a mediator for substrates that do not experience oxidation with the enzyme. For both oxidative systems, CotA-laccase and CotA-laccase / ABTS system, the focus was on the development of azo compounds under less aggressive synthetic conditions, contributing to the development of safer protocols and less environmental impact for the dye industry.

The research work involved three main steps: i) selection and characterization of 18 substrates grouped according to the chemical structure; ii) evaluation of different parameters and selection of the optimal reaction conditions to be used (pH 6,0; [CotA-laccase] = 1 U/mL; [ABTS] = 1 mM); and iii) synthesis and characterization of the dyes produced.

Oxidation of *para*-substituted aromatic amines with tertiary amines and *ortho*-disubstituted aromatic amines gives rise to the formation of isolated azo compounds with high yield values. For the remaining *para*-substituted substrates the formation of azo compounds occurs together with other compounds, being the reaction products isolated and characterized by NMR spectroscopy and mass spectrometry.

In a critical analysis of the enzymatic process under study, CotA-laccase presents itself as an efficient biocatalyst capable of successfully replacing the use of chemical oxidants for the examined reactions.

Keywords: Biocatalysis, azo compounds, CotA-laccase and oxidation

Agradecimentos

Ao longo deste último ano de trabalho, tive a sorte de poder contar com o apoio e incentivo de diversas pessoas que me ajudaram, direta ou indiretamente, a cumprir os meus objetivos e a realizar mais uma etapa do meu percurso académico. Desta forma, quero expressar o meu sentido e profundo agradecimento.

À minha orientadora, Professora Doutora Ana Catarina Cardoso de Sousa, por poder contar com o seu entusiasmo contagiante, com a sua alegria e com a sua palavra amiga, de reconhecimento e de incentivo a cada momento. O apoio incondicional, disponibilidade, partilha de conhecimentos e exigência que sempre manifestou contribuíram decisivamente para a realização deste trabalho. Agradeço também a oportunidade que me deu de integrar o seu Grupo de Investigação e pela confiança que deposita em mim diariamente. Muito Obrigada e espero poder sempre contar com a sua amizade.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Maria Paula Alves Robalo, pela partilha de conhecimentos científicos, disponibilidade manifestada, sugestões e revisão crítica.

Ao Centro de Química Estrutural do Instituto Superior Técnico por disponibilizar o acesso aos equipamentos de RMN e Espectrometria de Massa.

Ao Professor Doutor José Coelho, do Centro de Estudos de Engenharia Química do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa pelas facilidades concedidas no acesso ao aparelho de Espectroscopia UV-Vis.

Aos meus eternos amigos, Bruno Andrade, Catarina Pires, Corina Cotafe, Filipa Branco, Marta Silva, Ricardo Matias e Soraia Pinheiro, pelo carinho, companhia e incentivo em todos os momentos da minha vida. Perdoem-me a minha ausência ao longo dos últimos anos, mas acreditem que em nenhum momento vos esqueci.

Às minhas amigas de licenciatura, Ana Basílio, Catarina Sambado, Catarina Barbosa e Cláudia Rodrigues que, apesar de termos seguido caminhos diferentes, sempre estiveram presentes com boas recordações, amizade e apoio constante. Em especial à Rita Castanheira, por ser a amiga de todas as horas e companheira de aventuras.

Aos meus amigos de mestrado, Rodolfo Matos e Daniela Abreu pelo espírito de ajuda, amizade e boa disposição. Gostaria de agradecer em especial à Andreia Cardoso e Nicole Jesus pela absoluta disponibilidade, apoio, coragem, partilha de angústias e felicidades. Só me ficaram ótimas memórias e a certeza que ganhei duas amigas para a vida.

Ao Pedro Cardoso pelo apoio incansável ao longo destes últimos anos, pela motivação, amizade e valorização sempre tão entusiasta do meu trabalho.

À minha tia, Paula Tavares, pelo apoio, pela força e pela presença constante em todos os momentos da minha vida. Obrigada pelo amor incondicional e por cuidares sempre de mim.

Finalmente, às pessoas mais importantes da minha vida. Aos meus pais que sempre abriram as janelas para que pudesse voar e a quem devo tudo o que tenho. Obrigada pela vossa dedicação, esforço, amor incondicional e por me terem ensinado a perseguir os meus sonhos sem nunca pensar em desistir.

A todos vós, o meu Muito Obrigada!

Lista de Abreviaturas

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico
CCF	Cromatografia de camada fina
CotA-lacase	Lacase recombinante da bactéria <i>Bacillus subtilis</i>
¹³C-RMN	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono-13
d	Dupleto
dd	Dupleto de dupletos
ESI(+)-MS	Espectrometria de massa com ionização por <i>electrospray</i> em modo positivo
ESI(-)-MS	Espectrometria de massa com ionização por <i>electrospray</i> em modo negativo
<i>E</i>^o	Potencial redox
<i>E</i>_{pc}	Potencial de pico catódico
<i>E</i>_{pa}	Potencial de pico anódico
ENH	Elétrodo normal de hidrogénio
¹H-RMN	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão
Hz	Hertz
IV	Espectroscopia de radiação infravermelha
<i>J</i>	Constante de acoplamento (Hz)
m	Multiplete
MM	Massa molecular
<i>m/z</i>	Relação massa/carga (espectrometria de massa)
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância magnética nuclear
s	Singuleto
sl	Singuleto alargado
t	Triplete
TvL	Lacase comercial isolada de fungo <i>Trametes versicolor</i>
UV-vis	Espectroscopia de ultravioleta-visível
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda máximo
δ	Desvio químico em relação ao tetrametilsilano (em ppm)

Índice

Resumo	i
Abstract.....	iii
Agradecimentos.....	v
Lista de abreviaturas.....	vii
Índice Geral.....	ix
Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Tabelas.....	xvii

Índice Geral

1. Introdução.....	1
1.1. Enzimas como biocatalisadores.....	2
1.2. Enzimas oxidoreduases.....	3
1.3. Lacases	5
1.3.1. Caracterização estrutural.....	6
1.3.2. Centros catalíticos	8
1.3.3. Ciclo catalítico	10
1.3.4. Reações de acoplamento catalisadas por lacases	12
1.4. Corantes.....	16
1.4.1. Corantes Azo.....	18
1.4.1.1. Estrutura e propriedades.....	18
1.4.1.2. Métodos de síntese.....	19
2. Resultados e Discussão	23
2.1. Substratos estudados	23
2.1.1. Caracterização dos substratos	26
2.1.1.1. Determinação do potencial de oxidação.....	27
2.1.1.2. Espectroscopia de UV-Vis.....	30
2.2. Reações enzimáticas de <i>screening</i>	31
2.3. Reações de oxidação de aumento de escala.....	38

2.3.1.	Oxidação de aminas aromáticas <i>para</i> -substituídas.....	39
2.3.1.1.	Grupos substituintes -N(CH ₃) ₂ , -N(CH ₂ CH ₃) ₂ e -N(CH ₂ CH ₃ OH) ₂	39
2.3.1.1.1.	Caracterização estrutural dos compostos azo 1, 2 e 3.....	40
2.3.1.1.2.	Monitorização das reações de oxidação por UV-Vis.....	46
2.3.1.2.	Grupos substituintes -OCH ₃ , -OPh.....	48
2.3.1.2.1.	Caracterização estrutural dos compostos 4, 5, 6 e 7.....	50
2.3.1.2.2.	Monitorização da reação de oxidação por UV-Vis.....	54
2.3.1.3.	Grupos substituintes -CH ₂ CH ₃ , -Cl, -SO ₃ H e -SO ₂ -NH ₂	55
2.3.1.3.1.	Caracterização estrutural dos compostos 8 e 9.....	57
2.3.2.	Oxidação de aminas <i>orto</i> , <i>para</i> -disubstituídas.....	59
2.3.2.1.	Caracterização estrutural dos compostos 10 e 11.....	60
2.3.3.	Oxidação de compostos aromáticos policíclicos.....	62
2.3.3.1.	Oxidação dos derivados de naftaleno.....	62
2.3.3.2.	Oxidação do derivado de quinolina (8-amino-quinolina).....	64
2.3.4.	Oxidação de compostos heteroaromáticos.....	65
2.3.5.	Reação de acoplamento heteromolecular.....	66
2.4.	Proposta de mecanismo de oxidação enzimática.....	67
3.	Conclusões e Perspetivas Futuras.....	71
4.	Parte Experimental.....	75
4.1.	Considerações gerais.....	75
4.2.	Determinação dos potenciais de oxidação por voltametria cíclica.....	75
4.3.	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	76
4.4.	Espectrometria de massa.....	76
4.5.	Espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-vis).....	76
4.6.	Ensaio enzimáticos em placas de 96 poços.....	77
4.7.	Reações Enzimáticas.....	77
4.7.1.	Oxidação da <i>N,N</i> -dimetilfenilamina (<i>N,N</i> -DA).....	77
4.7.2.	Oxidação <i>N,N</i> -dietil- <i>p</i> -fenilenodiamina (<i>N,N</i> -DEA).....	78

4.7.3.	Oxidação do sulfato <i>N,N</i> -bis(2-hidroxietil)-1,4-fenilenodiamina (<i>N,N</i> -bOH-DA)	78
4.7.4.	Oxidação da 4-metoxifenilamina (4-MA)	79
4.7.5.	Oxidação da 4-fenoxianilina (4-PA)	79
4.7.6.	Oxidação da 4-etilanilina (4-EA)	80
4.7.7.	Oxidação da 4-cloroanilina (4-CIA)	80
4.7.8.	Oxidação do ácido 4-aminobenzenossulfônico (4-ABSA)	80
4.7.9.	Oxidação da sulfanilamida (4-SA)	81
4.7.10.	Oxidação da 4-nitro- <i>o</i> -fenilenodiamina (4-NPDA)	81
4.7.11.	Oxidação da 3,4-diaminobenzonitrilo (3,4-DABN)	81
4.7.12.	Oxidação da 1-naftilamina (1-NA)	82
4.7.13.	Oxidação do ácido 5-aminonaftalenossulfônico (5-ANSA)	82
4.7.14.	Oxidação da 8-aminoquinolina (8-AQA)	83
4.7.15.	Oxidação da 2,3-diaminopiridina (2,3-DAPA)	83
4.7.16.	Oxidação da 3-aminopiridina (3-APA)	83
4.7.17.	Oxidação da 2,6-diaminopiridina (2,6-DAPA)	84
4.7.18.	Oxidação do pirazol	84
4.7.19.	Reação de acoplamento heteromolecular	84
5.	Referências Bibliográficas	85

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Formação das espécies intermediárias e a conversão do substrato em produtos.....	3
Figura 1.2 - Classificação das enzimas oxidoredutases.	4
Figura 1.3- A) Estrutura tridimensional da CotA-lacase, onde estão representados os centros de cobre a cor amarela. B) Organização estrutural do centro catalítico da CotA-lacase, destacando a existência de dois centros de cobre, um centro mononuclear (T1) e um centro trinuclear (T2 e T3).....	7
Figura 1.4 – Modelo do centro catalítico da CotA-lacase isolada do <i>Bacillus subtilis</i>	9
Figura 1.5- Mecanismo simplificado da transferência de elétrons dos centros de cobre em lacases.	10
Figura 1.6 – Estruturas moleculares de alguns mediadores: A) ABTS; B) TEMPO; C) HBT.	11
Figura 1.7- Mecanismo de oxidação de substratos catalisados por lacases: A) sem presença de mediadores; B) na presença de mediadores.	12
Figura 1.8- Formação de dímeros homomoleculares por oxidação de substratos fenólicos com lacases; A) Oxidação catalítica do álcool coniferílico; B) Oxidação da molécula de trans-resveratrol.....	12
Figura 1.9- Exemplos de reações catalisadas por lacases que resultam em dímeros heteromoleculares: A) Adição de 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)benzamida a diferentes álcoois; B) Adição da hidroquinona ao ácido benzeno sulfônico; C) Adição de derivados de triazole à hidroquinona.	13
Figura 1.10 - Reações de acoplamento cruzado utilizando lacases: A) Formação de derivados de quinonas a partir de uma reação de Diels-Alder; B) Formação de derivados de benzofuranos a partir de uma adição de Michael.....	14
Figura 1.11 - Degradação enzimática do corante antraquinonico (Acid Blue 62 - ABu62) catalisada com lacase de <i>Trametes versicolor</i>	14
Figura 1.12 – Reações de aminas aromáticas substituídas catalisadas por lacases: A) Oxidação da 4-aminofenilacetamida com formação de um trímico e de um composto azo; B) Oxidação do ácido 2,5-diaminobenzenosulfônico com formação de uma fenazina; C) Oxidação do 2,5-diaminofenol com formação de uma fenoxazinona; D) Reação heteromolecular da 1,4-fenileno-diamina com 2,4-diaminotolueno com formação do corante indoanilina.	15

Figura 1.13- Oxidação de amins a aldeídos e iminas utilizando lacases: A) Oxidação da 4-metóxi-benzilamina com formação de um aldeído; B) Oxidação de benzilaminas substituídas com formação de cetonas.	16
Figura 1.14- Representação de grupos cromóforos e auxócromos de corantes: A) Corante Azo Reactive Red 2; B) Corante Azo Mordant Yellow 2; C) Corante Antraquinónico Reactive Blue 9.	17
Figura 1.15- Estrutura de alguns tipos de corantes sintéticos; A) Corante Azo (Chrysoidine); B) Antraquinona (Alizarina); C) Trifenilmetano (Verde Malaquita); D) Indigóide.	18
Figura 1.16 – Diferentes estruturas de corantes azo; A) Corante monoazo (Acid Orange 7); B) Corante diazo (Acid Red 151); C) Corante triazo (Direct Blue 71)	19
Figura 1.17- Método de síntese tradicional de corantes azo.	20
Figura 1.18- Oxidação da 4-metóxi-anilina catalisada com CuCl, em que se variou o solvente de forma a maximizar o rendimento da reação.	21
Figura 1.19- Oxidação de amins aromáticas primárias sob irradiação com ultra-sons e /ou micro-ondas	21
Figura 1.20 – Reação de diazotação e de acoplamento diazo utilizando como catalisador	22
Figura 1.21- Reação de hidrogenação do nitrobenzeno.	22
Figura 2.1 – Estruturas moleculares das amins aromáticas <i>para</i> -substituídas.	24
Figura 2.2 – Estruturas moleculares das orto-diaminas aromáticas substituídas.....	25
Figura 2.3- Estruturas moleculares dos compostos aromáticos policíclicos.	25
Figura 2.4 – Estruturas moleculares dos compostos heteroaromáticos.....	26
Figura 2.5 - Voltamogramas cíclicos, obtidos em solução 1:9 etanol:tampão fosfatos 20 mM a pH 6,0, com velocidade de varrimento de 100 mV/s, com 1×10^{-3} M de A) N,N-bOH-DA e B) 3,4-DABN	28
Figura 2.6 - Espectro de absorção UV-Vis de 1×10^{-4} M do substrato N,N-DEA.	30
Figura 2.7 - Cores observadas nas reações de screening de 5 mM dos substratos N,N-DEA, N,N-bOH-DA e 4-MA no instante t_0 (aproximadamente um minuto após a adição da enzima) e após 24 h, nas reações controlo e com CotA-lacase.....	32
Figura 2.8- As duas etapas de oxidação do ABTS	35
Figura 2.9 - Cores observadas nas reações de screening de 5mM do substrato 4-EA após 24 h com a presença de dois sistemas catalíticos (CotA-lacase e CotA-lacase/ABTS).....	36
Figura 2.10 – Cores observadas nas reações de screening para 5 mM de substratos 4-ABSA, 4-SA, 3-APA, 2,6-DAPA e pirazol com a presença de dois sistemas	

catalíticos (CotA-lacase a 1 U/mL e CotA-lacase/ABTS a 1 U/mL/1 mM) a pH 6,0 no final de 24h.....	36
Figura 2.11- Estruturas moleculares dos produtos obtidos nas reações de oxidação do <i>N,N</i> -DA, <i>N,N</i> -DEA e <i>N,N</i> -bOH-DA catalisadas por CotA-lacase.	40
Figura 2.12 - Detalhe, na região dos prótons aromáticos, dos espectros de ¹ H-RMN (400 MHz); A) do composto 1 em DMSO- <i>d</i> ₆ (400 MHz); B) do composto 2 em MeOD- <i>d</i> ₄ (400 MHz); C) do composto 3 em DMSO- <i>d</i> ₆ (400 MHz).....	41
Figura 2.13 - Espectros de ¹ H-RMN em DMSO- <i>d</i> ₆ (400 MHz): A) do precursor <i>N,N</i> -DA; B) do composto 1	41
Figura 2.14 - Detalhes dos espectros de ESI-MS em modo positivo. A) do composto 1 ; B) do composto 2 ; C) do composto 3	43
Figura 2.15 – Espectro ESI(+)-MS ² da molécula protonada <i>m/z</i> 269 do composto 1 com as respectivas propostas de fragmentação.	44
Figura 2.16 – Espectro ESI(+)-MS ² da molécula protonada com <i>m/z</i> 325 do composto 2	44
Figura 2.17 – Proposta de fragmentação para a espécie protonada a <i>m/z</i> 325 do composto 2	45
Figura 2.18 – Espectro ESI(+)-MS ² da molécula protonada com <i>m/z</i> 389 do composto 3	45
Figura 2.19 – Proposta de fragmentação para a espécie protonada <i>m/z</i> 389 do composto 3	46
Figura 2.20 - Espectros de absorção UV-Vis das reações de oxidação de 1x10 ⁻⁴ M dos substratos A) <i>N,N</i> -DEA e B) <i>N,N</i> - bOH-DA, catalisadas por CotA-lacase no decorrer de 24h de reação.....	47
Figura 2.21 - Estruturas moleculares dos compostos obtidos nas reações de oxidação da 4-MA e da 4-PA catalisadas por CotA-lacase.	49
Figura 2.22- Espectro ESI(+)-MS ² da molécula protonada <i>m/z</i> 243 do composto 4 e respectiva proposta de fragmentação.....	51
Figura 2.23- A) Espectro ESI(+)-MS do composto 5 , B) Espectro ESI(+)-MS ² da molécula protonada <i>m/z</i> 364 do composto 5 , C) Proposta de fragmentação.	52
Figura 2.24 - Detalhes dos espectros de ESI-MS em modo positivo A) MS do composto 6 e B) MS ² do íon <i>m/z</i> 367.....	53
Figura 2.25 - Proposta de fragmentação para o íon <i>m/z</i> 367 do composto 6	53
Figura 2.26 - Espectro MS ² do íon <i>m/z</i> 550 e respectiva proposta de fragmentação para o íon <i>m/z</i> 550 do composto 7	54
Figura 2.27 - Espectros de absorção UV-Vis da reação de oxidação com CotA-lacase 3x10 ⁻⁴ M do substrato 4-MA.	55

Figura 2.28 - Estruturas moleculares propostas para os compostos obtidos nas reações de oxidação do 4-EA E 4-CIA catalisada por CotA-lacase/ABTS.....	56
Figura 2.29 – Esquema reacional dos substratos 4-ABSA e 4-SA nos sistemas catalíticos (CotA-lacase e CotA-lacase/ABTS).....	57
Figura 2.30 - Detalhes dos espectros de ESI-MS em modo positivo A) MS do composto 8 e B) MS ² do íon <i>m/z</i> 241.....	58
Figura 2.31 - Proposta de fragmentação para o íon <i>m/z</i> 241 do composto 8	58
Figura 2.32 - Detalhes dos espectros de ESI-MS em modo positivo do composto 9 ...	59
Figura 2.33 - Estruturas moleculares dos compostos obtidos nas reações de oxidação do 4-NPDA e 3,4-DABN catalisada por CotA-lacase/ABTS e CotA-lacase, respetivamente.	60
Figura 2.34 - Espectros de ¹ H-RMN em Acetona- <i>d</i> ₆ (400MHz); A) do precursor 3,4-DABN; B) do composto 11	61
Figura 2.35 - Estruturas propostas para os produtos 12 e 13 obtidos pela oxidação do 1-NA catalisada por CotA-lacase/ABTS.....	62
Figura 2.36 - Espectro ESI-MS em modo do meio reacional da oxidação do 1-NA.	63
Figura 2.37 - Estrutura proposta para os produtos 14 obtido pela oxidação do 8-AQA catalisada por CotA-lacase/ABTS.....	64
Figura 2.38 - Espectro ESI-MS em modo positivo; A) do composto 14 ; B) MS/MS da espécie <i>m/z</i> 287.....	65
Figura 2.39 – Esquema reacional proposto para a formação do Disperse Yellow 3 catalisado por CotA-lacase	66
Figura 2.40 - Estrutura proposta para o produto 15 obtido pela oxidação da 2-A- <i>p</i> -cresol catalisada por CotA-lacase.....	67
Figura 2.41 - Mecanismo proposto para a formação de compostos azo por ação da CotA-lacase.....	68
Figura 2.42 - Formação do intermediário catião benzoquinona-diimina na oxidação de aminas aromáticas com aminas terciárias em posição para relativa ao grupo amina..	69

Índice de Tabelas

Tabela 1.1- Propriedades da CotA-lacase isolada do <i>Bacillus subtilis</i>	8
Tabela 2.1 - Dados eletroquímicos para os diferentes substratos (1×10^{-3} M) vs ENH, em solução etanol:tampão fosfatos pH 6 (1:9) para uma velocidade de varrimento de 100 mV/s.	29
Tabela 2.2 – Valores de comprimento de onda e do coeficiente de absorvidade molar dos substratos N,N-DEA e N,N-bOH-DA a 1×10^{-4} M e da 4-MA a 3×10^{-4} M.	31
Tabela 2.3 – Resultados observados nas reações de 5 mM de substrato, a pH 6,0, 7,0 e 8,0 com 1 U/mL de CotA-lacase ao fim de 24h	34
Tabela 2.4 – Resumo das condições catalíticas das reações dos ensaios de screening (pH 6,0, [CotA-lacase] = 1 U/mL, [ABTS] = 1 mM).	37
Tabela 2.5 - Dados de espectroscopia de ^1H e ^{13}C -RMN (DMSO- d_6) para os pares substrato/composto azo: N,N-DA /composto 1 , e N,N-DEA /composto 2 e N,N- bOH-DA /composto 3	42
Tabela 2.6 - Dados de espectroscopia de ^1H e ^{13}C -RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) para o par substrato/composto azo: 4-MA/composto 4	50
Tabela 2.7 - Dados de espectroscopia de ^1H RMN (Acetona- d_6) para os pares substrato/composto azo: 3,4-DABN /composto 11 e 4-NPDA /composto 10	61

1. Introdução

Atualmente existe uma grande preocupação com o desenvolvimento de processos ambientalmente mais favoráveis, gerando menos quantidades de resíduos e reduzindo assim a utilização de reagentes tóxicos e solventes perigosos.¹

Estas necessidades globais têm constituído novos desafios de pesquisa para a química e a biotecnologia e vários têm sido os esforços em desenvolver iniciativas em “Química Verde” e/ou sustentável, levando ao investimento em estudos e desenvolvimento de protocolos de síntese realizados em condições reacionais mais suaves de temperatura, pressão e que possam ser desenvolvidos em solventes aquosos.^{2,3}

A “Química Verde” tem como principal objetivo promover tecnologias químicas inovadoras que reduzam e/ou eliminem o uso ou o fabrico de substâncias perigosas e incentiva o uso de processos e produtos químicos mais aceitáveis para o meio ambiente. De forma a alcançar processos químicos mais ecológicos, optou-se pela utilização mais intensiva de matérias-primas renováveis, foram desenvolvidas várias tecnologias como o uso de solventes alternativos (fluidos supercríticos, líquidos iónicos), fontes energéticas não térmicas (micro-ondas, ultra-sons, campos elétricos, energia solar), processos de separação com membranas (ultrafiltração, nanofiltração) e utilização de biocatalisadores, permitindo a criação de processos mais eficientes em termos energéticos.⁴

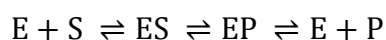
A biocatálise é definida como o processo químico promovido por meio de sistemas biológicos, tais como enzimas, células ou microrganismos.³ As suas áreas de aplicação industrial são vastas onde se destacam as indústrias farmacêutica, da cosmética, agro-alimentar e dos polímeros.¹

1.1. Enzimas como biocatalisadores

Enzimas são proteínas que atuam como catalisadores biológicos aumentando a velocidade das reações químicas que ocorrem nas células e organismos, sem se consumirem e sem interferirem no equilíbrio químico dessa reação.^{5,6} Estruturalmente, as enzimas são polímeros complexos constituídos por sequências de aminoácidos ligados entre si por uma ligação peptídica, dando origem a uma complexa estrutura tridimensional. A variedade de aminoácidos existentes e a sua combinação confere a diversidade funcional das enzimas.⁶

Comparativamente aos catalisadores químicos as enzimas apresentam diversas vantagens entre as quais se devem destacar a quimio-, regio- e estéreo-seletividades e na maioria dos casos diminuem o número de etapas de síntese, uma vez que evitam a necessidade de proteção de grupos funcionais nos substratos. É importante referir que as reações enzimáticas ocorrem em meios aquosos e a temperaturas e pressões moderadas.^{3,7,8} Como as reações ocorrem maioritariamente em meios aquosos minimiza-se o uso de solventes orgânicos, o que por vezes pode tornar-se um fator limitativo uma vez que grande parte dos substratos utilizados em síntese química são insolúveis em água.⁷ Assim, uma desvantagem para a biocatálise poderá ser a escolha do meio reacional apropriado tanto para o biocatalisador como para os reagentes. O processo também poderá tornar-se menos “verde” se for necessário remover a água com etapas adicionais de extração ou com recurso a evaporação com uso intensivo de energia.⁷

A região da enzima que participa diretamente na reação de conversão do substrato em produto é o centro ativo. A ligação do substrato ao centro ativo de uma enzima permite a formação de espécies intermediárias que resultam dos complexos enzima-substrato (ES) e enzima-produtos (EP) formados durante a reação. O mecanismo é conhecido como o modelo “*Induced fit*” e pode ser representada através do esquema da Figura 1.1.^{5,6}



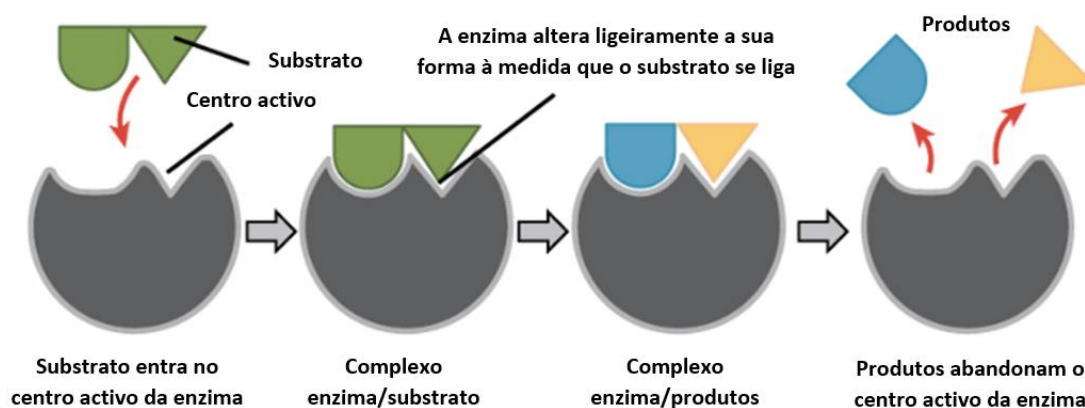


Figura 1.1 - Formação das espécies intermediárias e a conversão do substrato em produtos.⁹

A atividade enzimática depende de uma complexa variedade de fatores, nomeadamente da natureza do substrato, da presença de inibidores e de ativadores, da natureza do solvente, do pH e da temperatura.⁶

A temperatura condiciona a velocidade das reações e para a maioria das enzimas as temperaturas elevadas provocam a sua desativação por efeito da desnaturação da proteína.^{5,6}

O pH do meio é outro fator bastante importante uma vez que ao diminuir ou aumentar o seu valor, as cadeias laterais dos resíduos aminoácidos podem comportar-se como ácidos ou bases, alterando as conformações da estrutura da enzima e comprometendo a reação enzimática.^{5,6}

As enzimas são classificadas pela *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) em seis grupos através do número EC (*Enzyme Commission*), de acordo com a classe e a reação química que catalisam.⁵

1.2. Enzimas oxidoredutases

A reação de oxidação é de enorme importância em química orgânica. As reações de oxidação são fundamentais na introdução de funcionalidade química em materiais de partida baratos e disponíveis tais como alcanos, alcenos e compostos aromáticos. Apesar da sua importância, são utilizados agentes oxidantes que contêm na sua composição crómio, níquel ou cobre que

podem originar reações secundárias indesejáveis.⁷ De forma a minimizar os impactos ambientais nos processos catalíticos, tem-se apostado em alternativas menos agressivas como a utilização de agentes oxidantes como oxigénio e peróxido de hidrogénio.⁸

Atualmente os biocatalisadores oxidativos são muito procurados de modo a solucionar certos problemas das reações de oxidação da catálise química convencional tais como, a utilização de solventes orgânicos clorados e uso de catalisadores de metais pesados.^{1,8,10}

As enzimas oxidativas pertencem à classe das oxidoreductases. Todos os membros constituintes desta classe catalisam reações de oxidação-redução, promovendo assim a transferência de eletrões do substrato para o oxidante. Na classe das enzimas oxidoreductases a subclasse relaciona-se com os grupos doadores de eletrões e, dentro de cada uma, o aceitador eletrónico determina a sub-subclasse. Assim, as oxidoreductases subdividem-se em diferentes categorias, nomeadamente as desidrogenases, as oxidases, as oxigenases e as peroxidases, como esquematizado na Figura 1.2.^{5,6,8} As enzimas que pertencem à subclasse das oxidases utilizam o oxigénio no processo de oxidação como aceitador de eletrões que são removidos do substrato através dos centros catalíticos que contêm iões metálicos.¹⁰

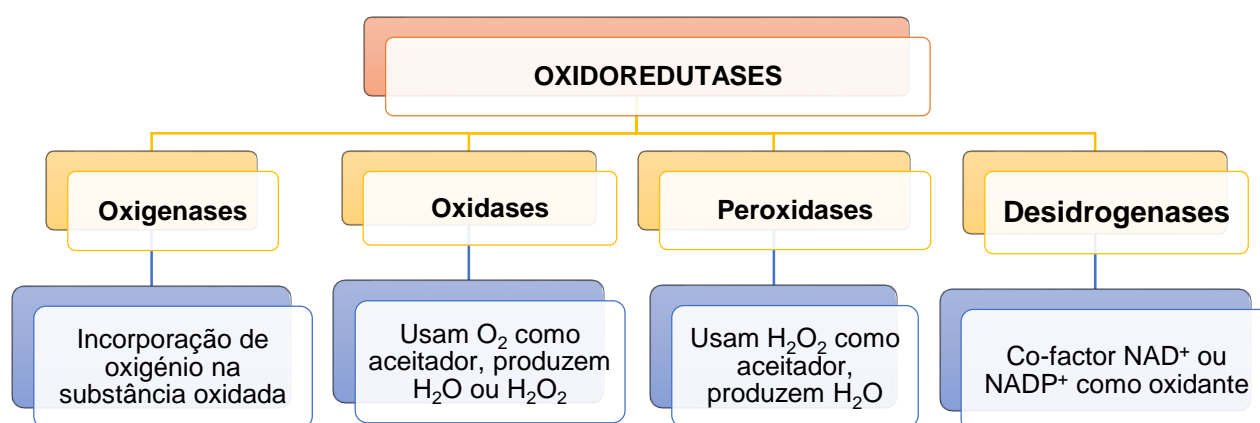


Figura 1.2 - Classificação das enzimas oxidoreductases. Adap. 6,10

1.3. Lacases

As lacases (benzenodiol:oxigénio oxidoreduções, EC 1.10.3.2) são enzimas extracelulares representantes de um grupo interessante de biocatalisadores, da subclasse das oxidases com múltiplos centros de cobre e com um grande potencial em aplicações industriais e ambientais.¹¹ A lacase foi descoberta por Yoshida em 1883 após observação do rápido endurecimento da resina de *Rhus vernicífera*, uma árvore que prolifera no Japão, em contato com o ar.¹² Desde essa altura já foram identificadas lacases em diversas plantas, diferentes géneros de insetos, bactérias e em vários fungos.^{12,13} No entanto, a maioria das lacases descritas na literatura foram isoladas de fungos de “podridão branca” envolvidos na degradação da lenhina e que podem ser encontrados em algumas espécies de cogumelos.¹⁴

As lacases existentes em plantas têm uma função biológica importante no processo de polimerização dos constituintes da parede celular na presença de oxigénio, ou seja, são a solução para a lignificação, enquanto que as lacases fúngicas servem para degradar a lenhina e produzir esporos e por último, as lacases bacterianas têm como principal função proteger as células contra o peróxido de hidrogénio e a radiação UV. Por norma, as lacases bacterianas mostram-se mais estáveis do que as lacases fúngicas quando submetidas a valores de temperatura e pH mais elevados.^{13,15,16}

As reações catalisadas por lacases são realizadas em sistemas de solventes aquosos sob condições de pH e temperatura moderadas e tendo como produto residual produzido a água. Assim, as lacases oxidam os substratos, captando os eletrões e usando-os para a redução do oxigénio molecular a água. Geralmente, as lacases oxidam substratos fenólicos, que perdem um eletrão e um protão, formando radicais livres que são estabilizados por ressonância. Estes radicais são depois envolvidos em acoplamentos, originando espécies poliméricas. Apesar dos compostos fenólicos serem os substratos de “excelência” das lacases, estas enzimas também oxidam compostos de baixo peso molecular tais como aminas e diaminas aromáticas, metóxi-fenóis e aminofenóis.^{11,13,17}

Devido à elevada gama de substratos que oxidam, as lacases podem ser consideradas oxidases versáteis. Assim, as suas aplicações industriais são

vastas como por exemplo, na indústria do papel¹⁸, na indústria têxtil¹⁹, em cosméticos e corantes capilares²⁰, na indústria alimentar²¹, no desenvolvimento de biocombustíveis e biossensores²², na degradação de alguns poluentes orgânicos e na biorremediação de composto fenólicos.²³

1.3.1. Caracterização estrutural

As lacases apresentam-se sob a forma de monómeros e possuem uma estrutura tridimensional constituída geralmente por 520 a 550 aminoácidos.¹² As lacases são glicoproteínas com o peso molecular de cada monómero a variar entre 50 a 130 kDa. A fração de hidratos de carbono da maioria das lacases é constituída por manose, *N*-acetil-glucosamina e galactose e representam cerca de 45 % da massa da proteína em lacases de origem vegetal.^{14,24} Porém, as lacases fúngicas apresentam um menor teor de hidratos de carbonos que varia entre 10 % a 20 % do peso molecular, correspondendo assim a cerca de 60 a 70 kDa, o que contribui para a elevada estabilidade da lacase.^{12,14}

As lacases possuem uma unidade funcional constituída por quatro átomos de cobre por molécula, distribuídos por três diferentes tipos de centros, ou seja, um centro de cobre do tipo 1 (T1) localizado no domínio III, um centro de cobre do tipo 2 (T2) e dois centros de cobre do tipo 3 (T3) localizados na interface dos domínios I e II, de acordo com o apresentado na Figura 1.3.²⁵ As funções catalíticas das diferentes lacases dependem da distribuição dos ligandos nos átomos de cobre dos três diferentes centros.¹⁶

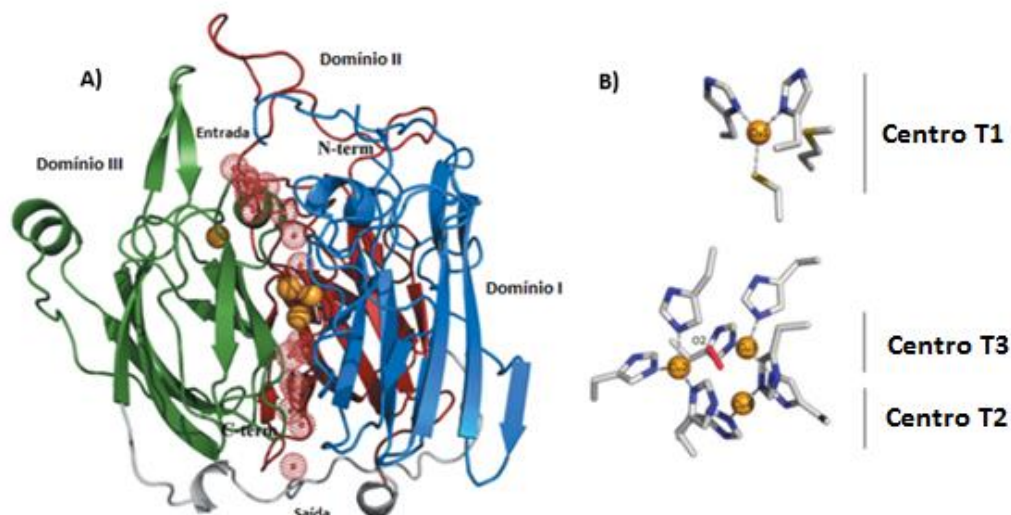


Figura 1.3- A) Estrutura tridimensional da CotA-lacase, onde estão representados os centros de cobre a cor amarela.^{Adap.26} B) Organização estrutural do centro catalítico da CotA-lacase, destacando a existência de dois centros de cobre, um centro mononuclear (T1) e um centro trinuclear (T2 e T3).²⁷

Os substratos são oxidados no centro mononuclear e, em seguida, os elétrons são transferidos para o centro trinuclear onde o oxigênio é reduzido a água.²⁵ Como o centro T1 é o principal aceitador dos elétrons provenientes dos substratos redutores, as lacases apenas podem oxidar diretamente compostos com potencial de oxidação inferior ou ligeiramente superior ao potencial redox do íon de cobre do centro T1 da enzima. Assim, o seu valor determina a eficiência catalítica na oxidação da maioria dos substratos da lacase, o que faz com que lacases com elevado potencial redox do centro T1 sejam mais promissoras para a área da biotecnologia.^{13,14} O potencial redox das lacases depende das características do ligando axial do centro T1. De acordo com esse potencial as lacases são geralmente classificadas em potencial elevado (730-780 mV), médio (470-710 mV) e baixo (340-490 mV), com os seus ligandos axiais sendo fenilalanina, leucina e metionina, respectivamente.¹³

O objetivo de estudo desta tese foi avaliar a ação catalítica da lacase de origem bacteriana CotA-lacase isolada do *Bacillus subtilis* na síntese de corantes azo, pelo que é importante referenciar algumas das suas propriedades. Assim, para além das propriedades que se encontram resumidas na Tabela 1.1, é de destacar que, de acordo com os resultados de Martins *et*

al. (2002), a CotA-lacase é extremamente termoestável, manifestando atividade a um temperatura de cerca de 80 °C durante um período de 2 a 4 horas.^{28,29}

Tabela 1.1- Propriedades da CotA-lacase isolada do *Bacillus subtilis*.^{29, 30}

Propriedade	CotA isolada do <i>Bacillus subtilis</i>
Massa Molecular (kDa)	65
Átomos de cobre	4
pH ótimo para substratos fenólicos	7,0-9,0
Temperatura (°C)	75
Potencial redox do cobre T1 (mV vs ENH)	535

1.3.2. Centros catalíticos

O centro catalítico das lacases é constituído por quatro átomos de cobre, de acordo com o apresentado na Figura 1.4.

O centro mononuclear de cobre T1 possui uma coordenação trigonal com dois resíduos de histidina e um resíduo de cisteína como ligandos equatoriais. Se a enzima for de origem bacteriana, como é o caso da CotA-lacase, apresenta como ligando axial a metionina, e se for de origem fúngica, como é o caso da *Trametes versicolor* (TvL), uma fenilalanina.³¹ Os centros ativos das lacases são classificados através das suas características espectrais e de Ressonância Paramagnética Eletrónica (EPR). O centro T1 detém uma cor azul clara característica destas soluções enzimáticas e é caracterizado por uma banda de absorção ótica no comprimento de onda de 600 nm ($\epsilon \sim 5000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e por um fraco desdobramento no espectro EPR ($g_{\parallel} = 2,30$; $A_{\parallel} = (40-95) \times 10^{-4}\text{cm}^{-1}$).^{14,32}

O centro mononuclear de cobre T2 encontra-se coordenado a dois resíduos de histidina e a uma molécula de água, é incolor e não é detetável nos espectros de absorção de eletrões, porém apresenta um desdobramento ultrafino no espectro de EPR ($g_{\parallel} = 2,24$; $A_{\parallel} = (140-200) \times 10^{-4}\text{cm}^{-1}$).^{14,32} Relativamente ao centro de cobre T3 encontra-se num centro binuclear constituído por dois átomos emparelhados antiferromagneticamente através de

uma ponte de hidroxilo, tornando-os diamagnéticos e impedindo assim a sua detecção nos espectros de EPR. Estes dois átomos encontram-se coordenados a seis resíduos de histidina e são caracterizados por uma banda de absorção na zona do ultravioleta, a 300 nm. É importante referir que no centro trinuclear, constituído pelos centros ativos T2/T3, ocorre a redução do oxigénio e a libertação de água.^{14,24,33} O átomo de cobre T1 encontra-se a uma distância de aproximadamente 12 Å do centro T2/T3 e o átomo de cobre T2 está distanciado cerca de 4 Å do átomo de cobre T3.¹³

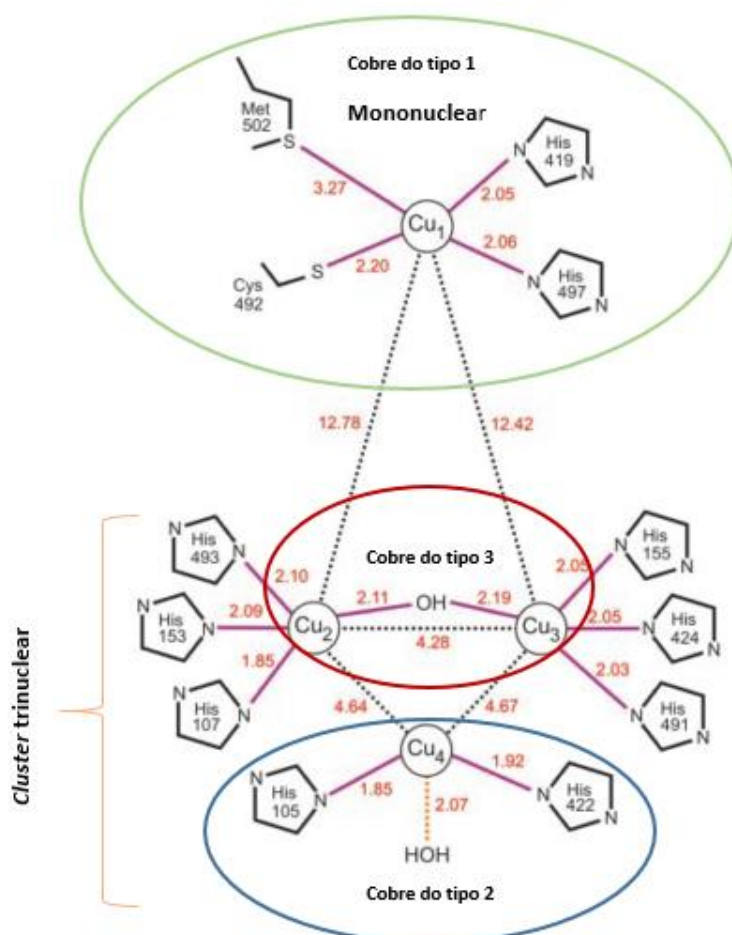


Figura 1.4 – Modelo do centro catalítico da CotA-lacase isolada do *Bacillus subtilis*.³⁰

1.3.3. Ciclo catalítico

O ciclo catalítico da lacase ocorre essencialmente em três grandes passos sequenciais, de acordo com o que se encontra esquematizado na Figura 1.5.

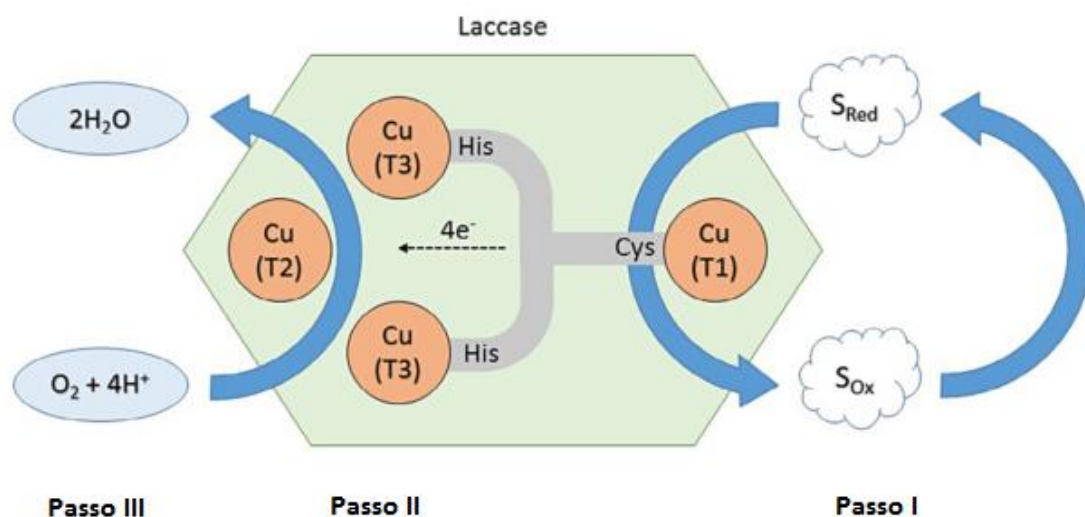


Figura 1.5- Mecanismo simplificado da transferência de elétrons dos centros de cobre em lacases.³⁴

No primeiro passo do mecanismo as lacases catalisam reações de oxidação nos quais o centro de cobre T1 remove um elétron de quatro moléculas do substrato, originando o respetivo radical. No segundo passo dá-se a transferência eletrônica interna do centro de cobre T1 para o centro trinuclear (T2/T3). O terceiro passo ocorre no “cluster” T2/T3, onde o oxigénio molecular é reduzido a água, utilizando quatro elétrons e quatro prótons.^{34,35,36}

A posição dos grupos substituintes do substrato é um fator bastante importante, pois as lacases têm atividade direcionada a compostos *orto* e *para* substituídos em detrimento dos compostos *meta*-substituídos, que de uma forma geral são considerados “maus substratos”.³⁴ Como já foi referido anteriormente, as lacases tipicamente têm um potencial eletroquímico que varia no intervalo entre 0,5-0,8 V vs ENH³⁶ sendo incapazes de oxidar diretamente substratos com valores de potenciais mais elevados. Porém, a gama de

compostos oxidáveis pode ser ampliada com recurso a mediadores redox de modo a oxidar os compostos considerados à partida “não-substratos”.³⁴

Existe uma grande diversidade de mediadores redox, de onde se destacam o ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-sulfónico (ABTS), o *N*-hidroxibenzotriazol (HBT) e o 2,2,6,6-tetrametil-piperidina-1-oxil (TEMPO), como representado na Figura 1.6.^{37,38} Todos estes mediadores são geralmente compostos fortemente oxidáveis pela lacase, intermediários utilizados na transferência dos eletrões envolvidos no processo de oxidação-redução. A forma de interação dos intervenientes nos sistemas lacase/mediador/substrato continua a ser objeto de diferentes estudos. No entanto, é conhecido que dependendo da sua estrutura química, os mediadores seguem diferentes mecanismos de oxidação. A oxidação do ABTS pela lacase é realizada através de uma transferência de eletrões, a oxidação utilizando o TEMPO é realizada através de um mecanismo iónico, enquanto que a oxidação utilizando o HBT ocorre por um mecanismo radicalar.^{38,39}

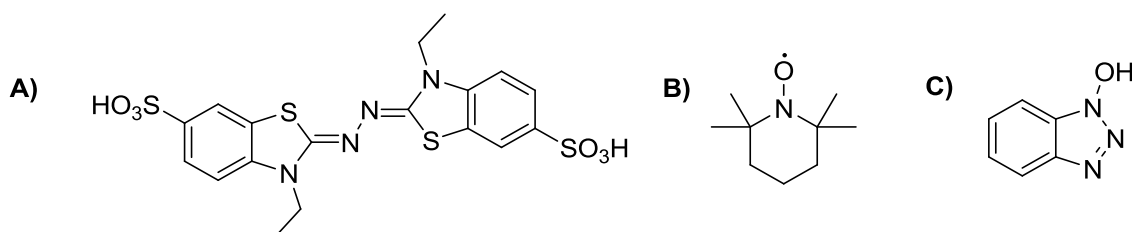


Figura 1.6 – Estruturas moleculares de alguns mediadores: **A)** ABTS; **B)** TEMPO; **C)** HBT.^{37,38}

O ABTS é utilizado no sistema como sal, solúvel em água. Por reação com a lacase forma rapidamente radicais estáveis (corados), que podem reagir com diferentes compostos aromáticos, de acordo com os seus potenciais redox, formando os seus respetivos radicais que serão precursores em novas reações (Figura 1.7-B). Nessa interação os radicais formados regeneram o ABTS.³⁹

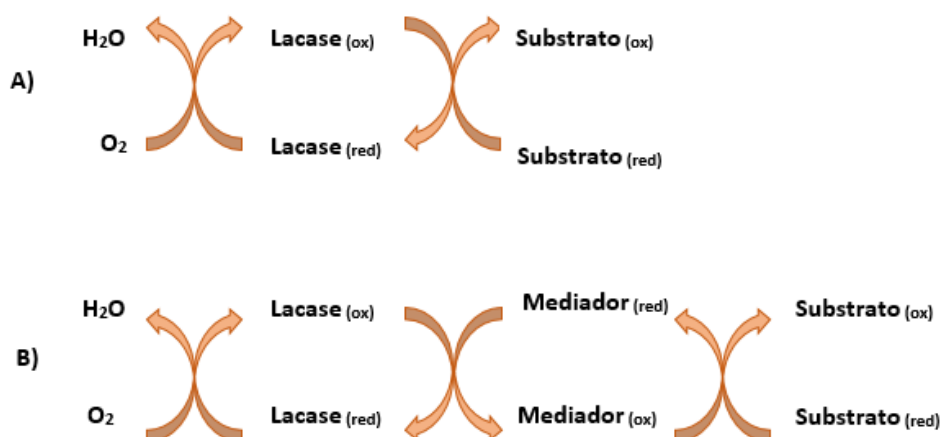


Figura 1.7- Mecanismo de oxidação de substratos catalisados por lacases: **A)** sem presença de mediadores; **B)** na presença de mediadores.³⁸

1.3.4. Reações de acoplamento catalisadas por lacases

A oxidação direta de fenóis catalisada por lacases pode originar radicais reativos intermediários e ainda sofrer auto-reações de acoplamento homomolecular conduzindo à produção de dímeros e formação de novas ligações C-O, C-C.^{37,38} Um exemplo da formação de dímeros ocorre na oxidação, promovida por lacase, do álcool coniferílico originando o dímero pinoresinol como produto principal, mas na forma racêmica (Figura 1.8-A) e na oxidação da molécula de trans-resveratrol que permite o isolamento de um único produto (Figura 1.8-B).³⁷

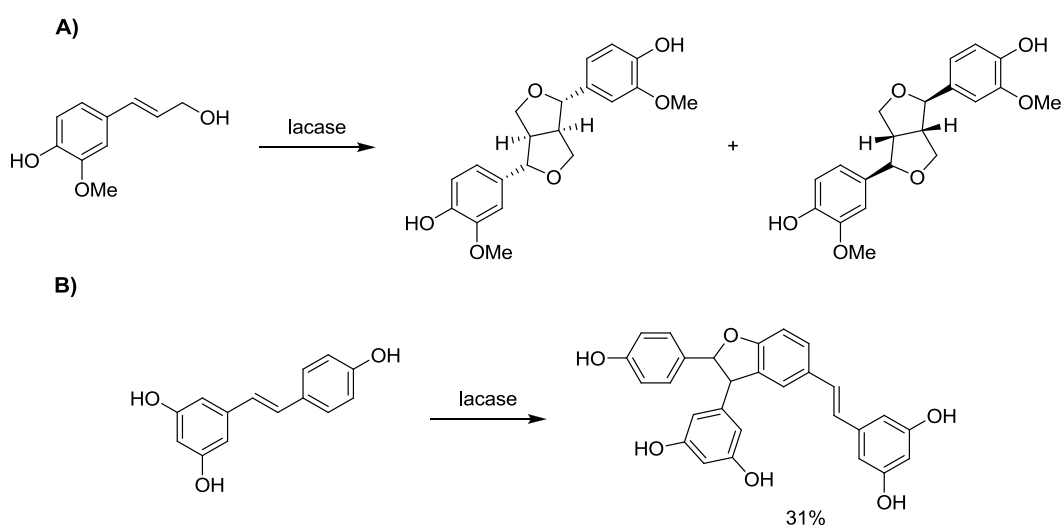


Figura 1.8- Formação de dímeros homomoleculares por oxidação de substratos fenólicos com lacases; **A)** Oxidação catalítica do álcool coniferílico; **B)** Oxidação da molécula de trans-resveratrol.³⁷

As lacases são catalisadores em reações de acoplamento heteromolecular, sendo que destas reações podem resultar dímeros e trímeros com formação de novas ligações C-O, C-S ou C-N, com diversos exemplos referenciados na literatura, como apresentado na Figura 1.9.^{36,40}

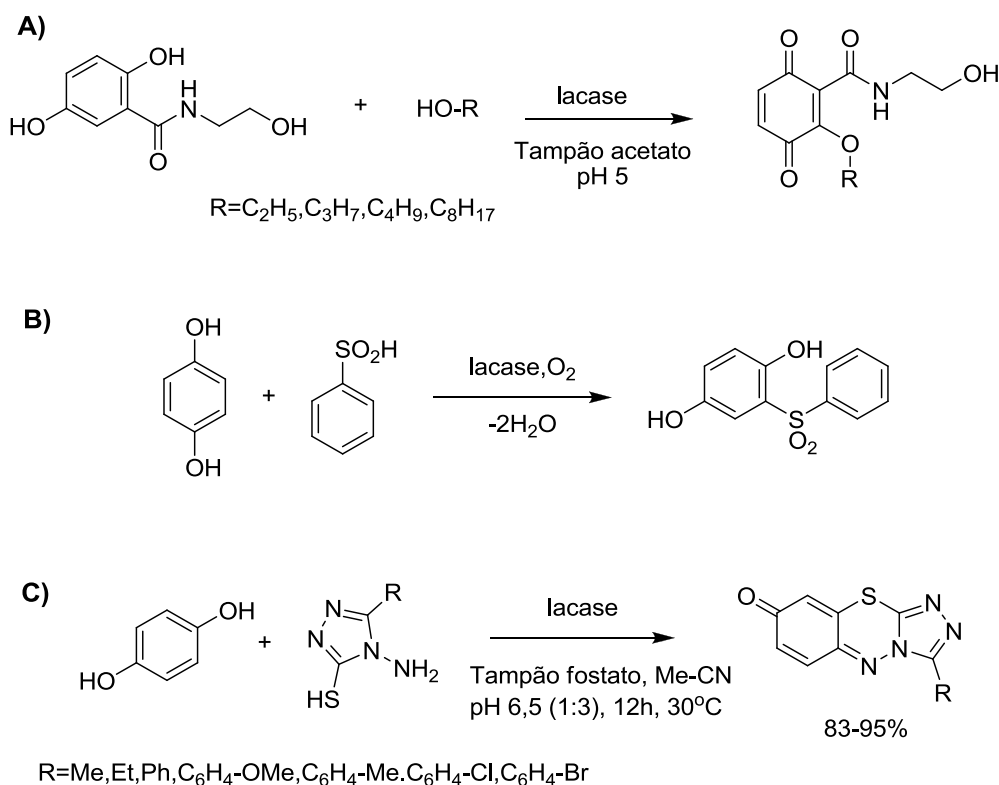


Figura 1.9-Exemplos de reações catalisadas por lacases que resultam em dímeros heteromoleculares: **A)** Adição de 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)benzamida a diferentes álcoois; **B)** Adição da hidroquinona ao ácido benzeno sulfônico; **C)** Adição de derivados de triazole à hidroquinona.^{36,40}

Outra possibilidade de reação catalisada por lacases é a reação de acoplamento cruzado com uma outra molécula, mas não ocorrendo a formação de dímeros ou oligômeros. Através de diferentes reações em cascata podem ser sintetizados derivados de quinonas e benzofuranos, a partir de uma reação de Diels-Alder (Figura 1.10-A) e de uma adição de Michael (Figura 1.10-B), respetivamente.³⁷

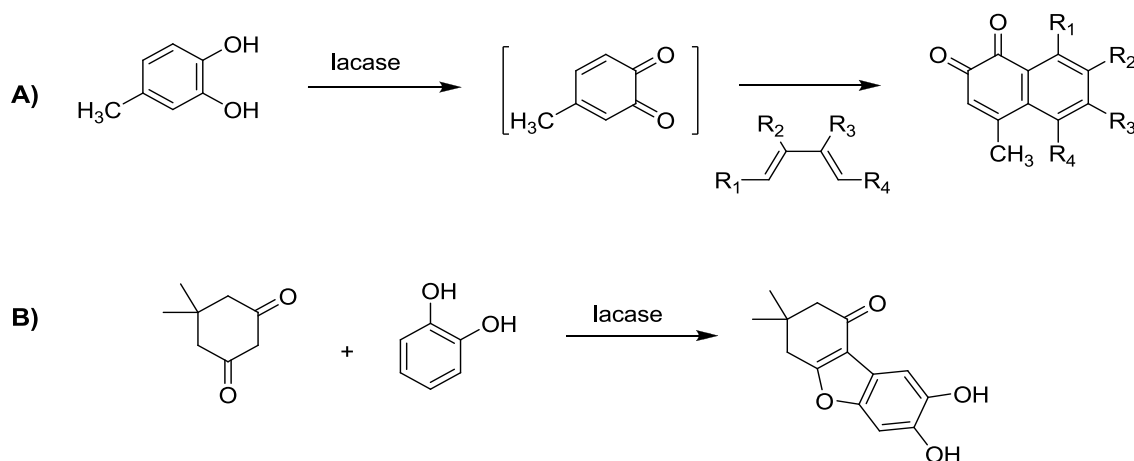


Figura 1.10 - Reações de acoplamento cruzado utilizando lacases: **A)** Formação de derivados de quinonas a partir de uma reação de Diels-Alder; **B)** Formação de derivados de benzofuranos a partir de uma adição de Michael.³⁷

Conforme já referido muitos são os trabalhos publicados referindo a ampla aplicação de lacases em diferentes processos industriais e aplicações em química fina onde estão envolvidas reações de oxidação.

No que se refere à formação de corantes por via enzimática, nomeadamente por lacases, Pereira *et al.* e Vanhulle *et al.* reportaram a formação de um corante vermelho com estrutura azo, designado por LAR1, no processo de degradação enzimática do corante antraquinonico (Acid Blue 62 - ABu62), de acordo com o apresentado na Figura 1.11.^{41,42}

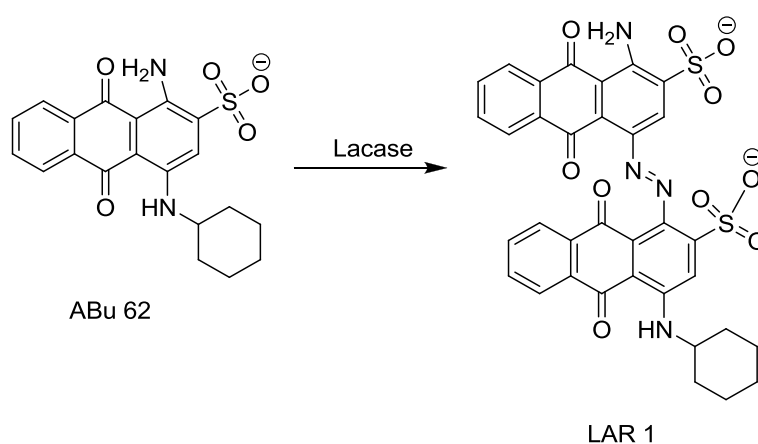


Figura 1.11 - Degradação enzimática do corante antraquinonico (Acid Blue 62 - ABu62) catalisada com lacase de *Trametes versicolor*.⁴¹

A oxidação de aminas aromáticas é uma reação importante na síntese de muitos produtos, entre os quais, compostos azo e hidroxilaminas. A oxidação destes compostos pode ser efetuada com recurso a oxidantes químicos tais como ácido peracético, dióxido de manganês, tetra-acetato de chumbo, manganato de bário, hipoclorito de sódio e ferrocianeto de potássio.

Relativamente à oxidação de aminas aromáticas por lacases, Sousa *et al.* reportaram a formação de produtos como fenazinas, fenoxazinonas, dímeros e trímeros através de reações de oxidação homomoleculares e heteromoleculares, de acordo com alguns exemplos apresentados na Figura 1.12. Os produtos foram obtidos com bons valores de rendimentos, o que poderá conduzir à utilização de lacases em bioprocessos alternativos nas indústrias de cosméticos e corantes.^{11,17}

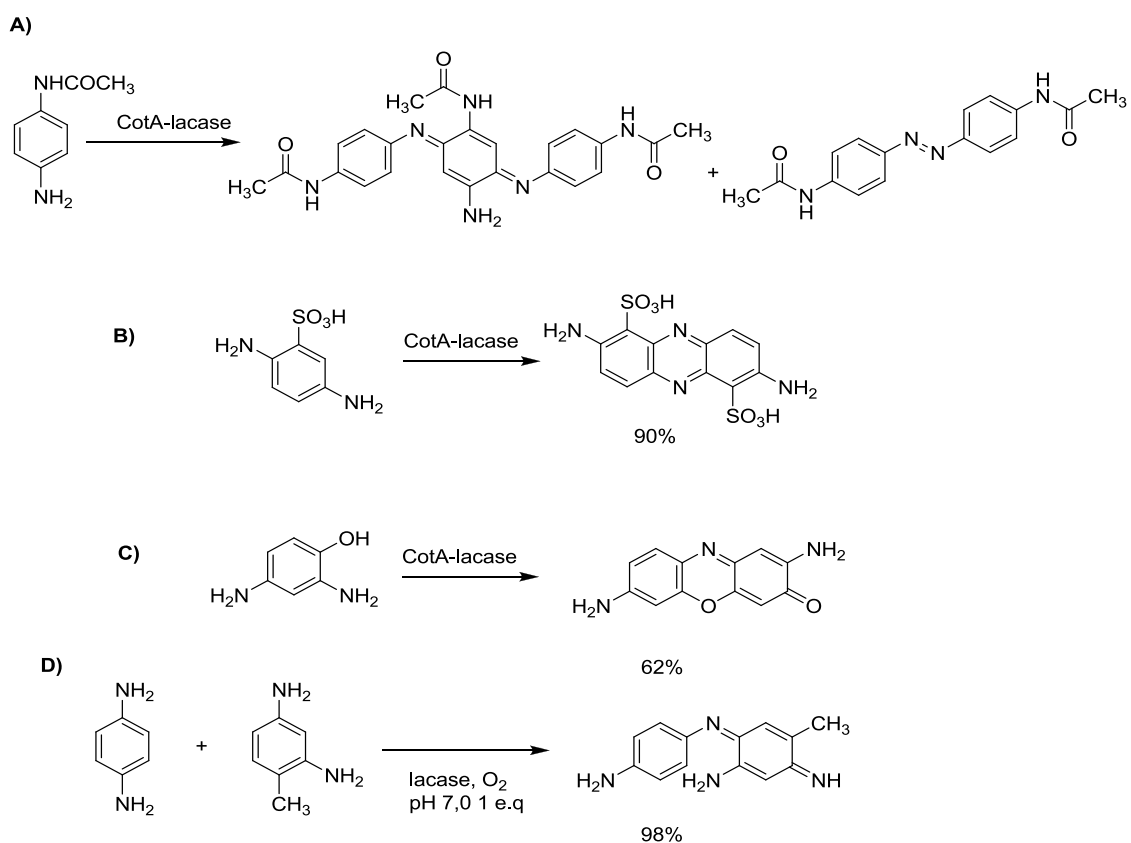


Figura 1.12 – Reações de aminas aromáticas substituídas catalisadas por lacases: **A)** Oxidação da 4-aminofenilacetamida com formação de um trímero e de um composto azo;¹¹ **B)** Oxidação do ácido 2,5-diaminobenzenosulfónico com formação de uma fenazina;¹⁷ **C)** Oxidação do 2,5-diaminofenol com formação de uma fenoxazinona;¹⁷ **D)** Reação heteromolecular da 1,4-fenileno-diamina com 2,4-diaminotolueno com formação do corante indoanilina.²⁰

Na literatura encontram-se também exemplos de reações de oxidação aeróbica de benzilaminas através de lacases originando aldeídos como produtos (Figura 1.13).

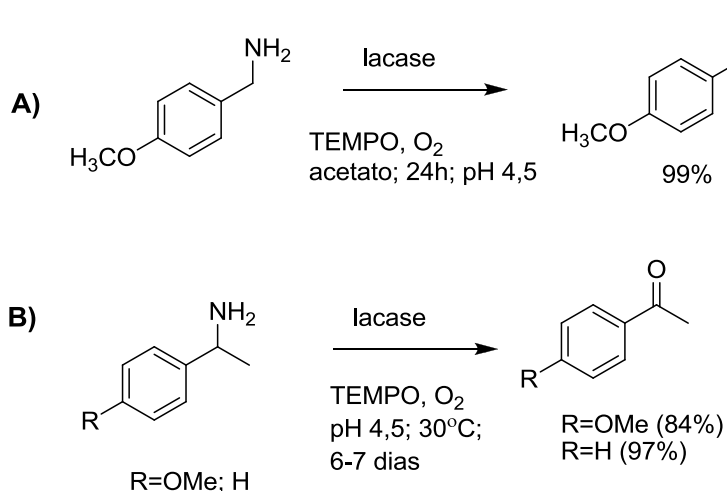


Figura 1.13- Oxidação de aminas a aldeídos e iminas utilizando lacases: **A)** Oxidação da 4-metóxi-benzilamina com formação de um aldeído; **B)** Oxidação de benzilaminas substituídas com formação de cetonas.⁴³

1.4. Corantes

Os corantes são compostos que, quando aplicados a materiais, transmitem cor aos mesmos. Diferem dos pigmentos no que respeita essencialmente à solubilidade uma vez que os corantes são solúveis no meio em que são aplicados e os pigmentos são insolúveis.^{44,45} A cor dos corantes depende da sua capacidade de absorver luz com comprimento de onda na região do visível (400-800 nm) e estes são detetáveis mesmo em baixos valores de concentração, como a 1 mg/L.^{46,47} A absorção de radiações eletromagnéticas nas regiões do ultra-violeta e do visível origina a excitação eletrónica e os eletrões movem-se de um menor nível de energia eletrónica para um maior.⁴⁸

Os corantes são moléculas com sistemas de eletrões deslocalizados conjugados com ligações duplas e triplas, constituídos por um grupo cromóforo e um grupo auxóromo (Figura 1.14).⁴⁹ Os cromóforos podem ou não ser responsáveis pela cor do corante, dependendo se o grupo absorve a radiação na região do visível ou do UV. Como cromóforos mais importantes destacam-

se os grupos azo ($-\text{N}=\text{N}-$), carbonilo ($-\text{C}=\text{O}$), metino ($-\text{CH}=\text{}$), nitro ($-\text{NO}_2$) e quinonas.⁴⁸

Cromóforos como $\text{C}=\text{C}$ ou $\text{C}\equiv\text{C}$ que possuem elétrons π apresentam transições eletrônicas $\pi-\pi^*$, enquanto que grupos como $\text{C}=\text{O}$, $-\text{C}\equiv\text{N}$ ou $-\text{N}=\text{N}-$ têm elétrons π e não ligantes exibindo transições eletrônicas em $\pi-\pi^*$, $n-\pi^*$ e $n-\sigma^*$.⁴⁸

Os grupos auxócromos são grupos substituintes que, quando introduzidos na molécula, intensificam a cor da mesma. Os auxócromos mais importantes são os grupos amina ($-\text{NH}_2$), carboxilo ($-\text{COOH}$), sulfonato ($-\text{SO}_3\text{H}$) e hidroxilo ($-\text{OH}$).^{46,47,50}

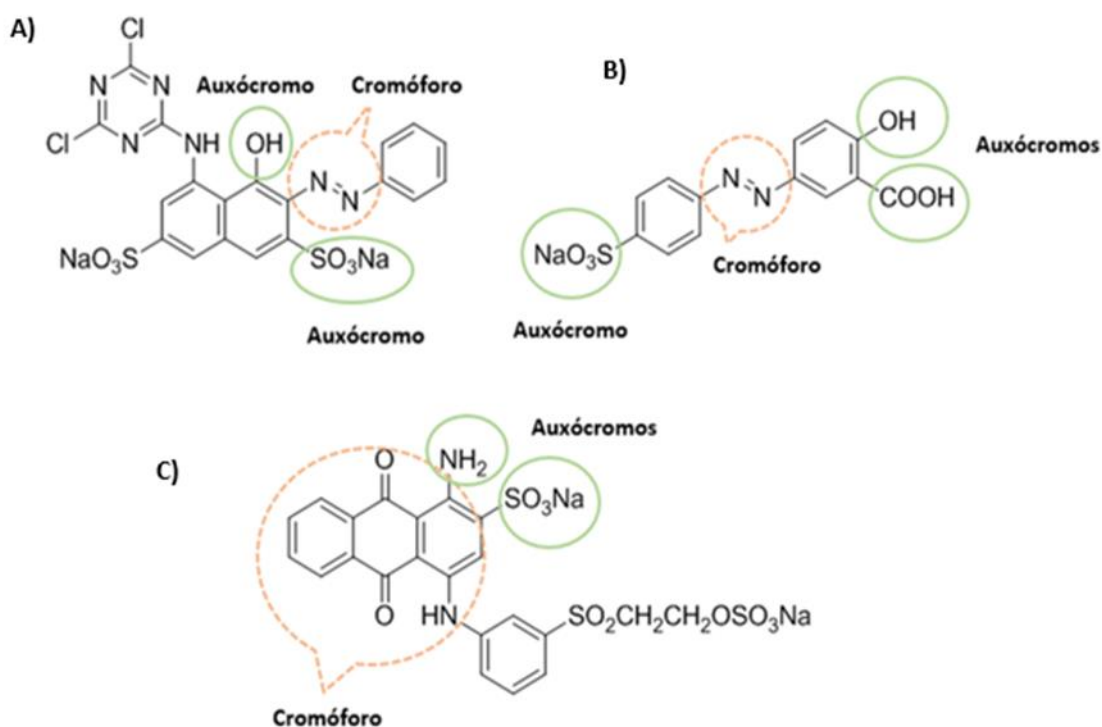


Figura 1.14- Representação de grupos cromóforos e auxócromos de corantes: **A)** Corante Azo *Reactive Red 2*; **B)** Corante Azo *Mordant Yellow 2*; **C)** Corante Antraquinónico *Reactive Blue 9*. ^{Adap.50}

Os corantes podem ser de origem natural ou produzidos por via sintética e devido à sua estrutura química são resistentes ao desaparecimento de cor por exposição à luz, água e outros compostos químicos.⁵¹

Os corantes naturais podem ser extraídos de diferentes partes das plantas, incluindo raízes, folhas, cascas, sementes, frutos e flores que contêm

materiais colorantes como taninos e flavonóides. Podem também ser extraídos de fungos, algas e bactérias.⁵² A sua utilização tem sido cada vez mais substituída pelo recurso a corantes sintéticos uma vez que a produção destes últimos é menos dispendiosa, mais rápida e apresentam uma maior resistência à degradação.^{46,52}

Os corantes sintéticos são amplamente utilizados em diferentes indústrias tais como a indústria têxtil e dos curtumes, farmacêutica, corantes capilares, tecnologia alimentar, entre outras, com a finalidade de conferir cor.^{45,51,53} Os corantes sintéticos exibem uma significativa diversidade estrutural. Tendo em conta a estrutura química do cromóforo, existem vários grupos de corantes sintéticos, sendo que os azo, antraquinonas, o trifenilmetano e os indigóides, como apresentado na Figura 1.15, são os que apresentam maior utilização a nível industrial.^{53,54}

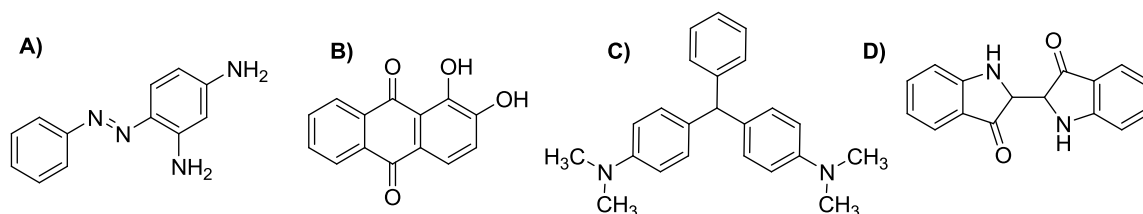


Figura 1.15- Estrutura de alguns tipos de corantes sintéticos; **A)** Corante Azo (Chrysoidine); **B)** Antraquinona (Alizarina); **C)** Trifenilmetano (Verde Malaquita); **D)** Indigóide.⁵⁵

1.4.1. Corantes Azo

1.4.1.1. Estrutura e propriedades

A maioria dos corantes sintéticos são produzidos a partir de fontes petroquímicas através de processos químicos que podem representar uma ameaça para o ambiente e saúde humana.⁵²

Os corantes do tipo azo constituem a maior classe de corantes sintéticos com uma utilização de, aproximadamente, 70 % a nível mundial.⁵⁶ Estima-se que existam mais de 2000 corantes azo diferentes, os quais são utilizados para fornecer cor aos mais diversos materiais como têxteis, couro, plásticos, cosméticos e alimentos.⁵⁷ Esta classe de corantes adere bem aos tecidos, não

desvanecem as suas cores facilmente, são simples de sintetizar, abrangem uma variada gama de cores e são bastante estáveis.⁵⁸

Os corantes azo caracterizam-se por apresentarem na sua estrutura o grupo azo (-N=N-), tipicamente conjugados com anéis aromáticos, permitindo assim a deslocalização de eletrões.⁵⁹ Podem ainda apresentar vários grupos substituintes nos anéis aromáticos como cloro (-Cl), metilo (-CH₃), amino (-NH₂), hidroxilo (-OH) carboxilo (-COOH), dando origem a diferentes corantes.^{56,60} Dentro desta classe, dependendo do número de ligações azo na molécula, existem os corantes monoazo, diazo e triazo (Figura 1.16).^{49,58}

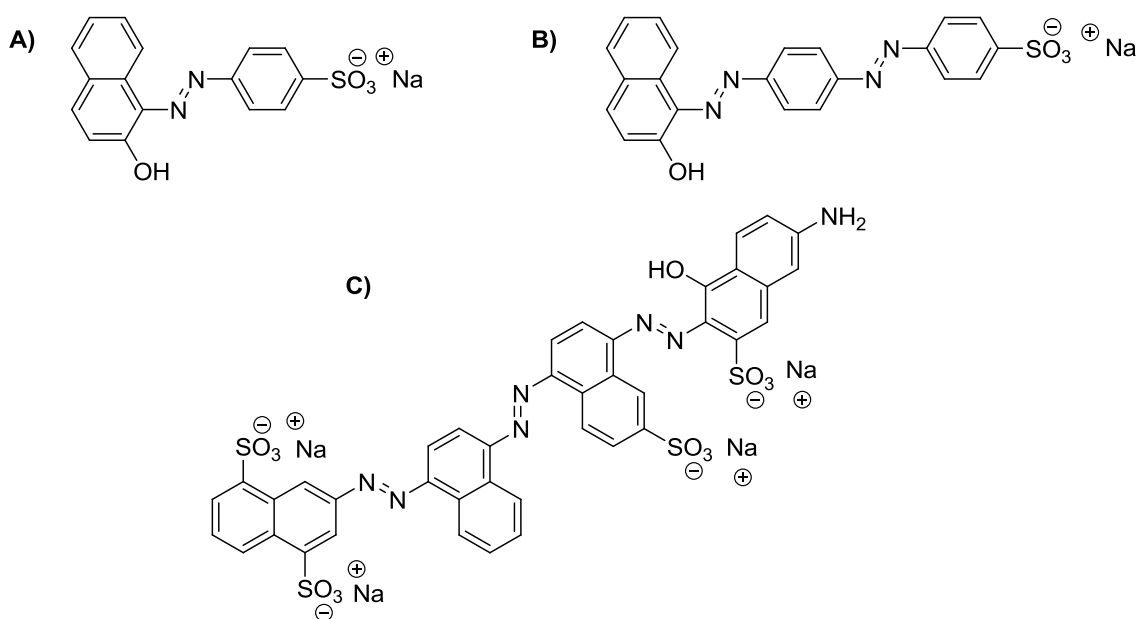


Figura 1.16 – Diferentes estruturas de corantes azo; **A)** Corante monoazo (Acid Orange 7); **B)** Corante diazo (Acid Red 151); **C)** Corante triazo (Direct Blue 71).⁶¹

1.4.1.2. Métodos de síntese

A síntese de corantes azo, a nível industrial, consiste numa reação de diazotação seguida de uma reação de acoplamento. Na primeira reação, a amina aromática reage com o nitrito de sódio, em meio ácido e com temperaturas abaixo dos 5 °C, formando o sal diazónio. Na segunda reação, o sal diazónio formado anteriormente poderá reagir com aminas aromáticas, como esquematizado na Figura 1.17, ou com fenóis, ocorrendo uma reação de substituição eletrófila para formar o corante azo.⁵⁹

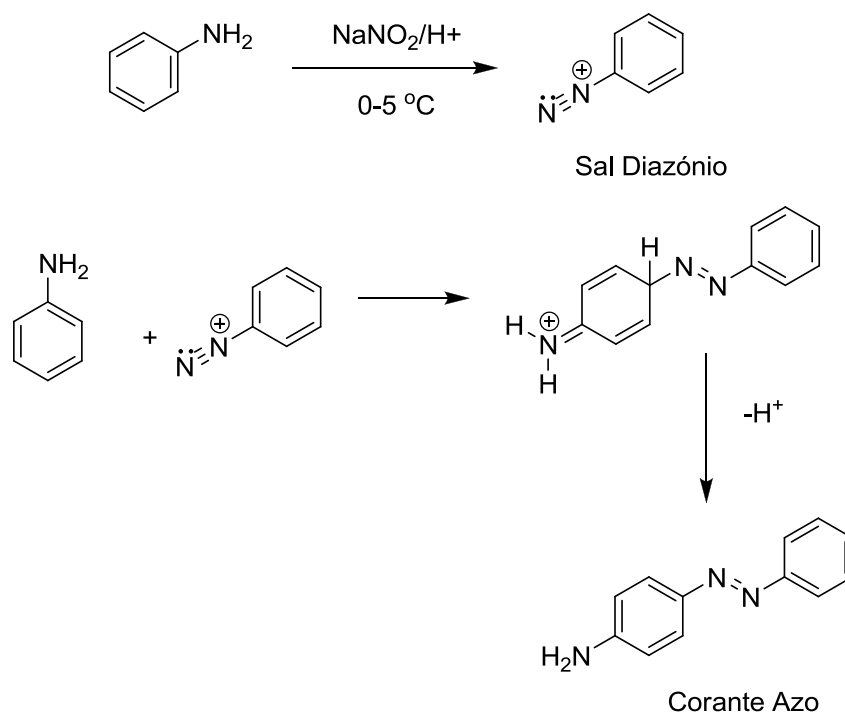


Figura 1.17- Método de síntese tradicional de corantes azo.

Neste método de síntese o sal diazônio atua como eletrófilo nas reações de acoplamento com os compostos aromáticos, como é o caso das anilinas ou dos fenóis. A substituição normalmente ocorre na posição *para*, exceto quando esta posição já se encontra ocupada, em que neste caso a posição *orto* é favorecida. O pH do meio é um fator bastante importante e este deve ser ligeiramente ácido ou neutro, uma vez que a reação não ocorre a valores de pH muito baixos.⁵⁹

A nível industrial os corantes azo são produzidos em condições de síntese agressivas, ou seja, em meios ácidos e em baixas temperaturas, pelo que, atualmente existe uma preocupação acrescida na inserção de princípios de Química Verde de modo a superar problemas de saúde e ambientais. Assim, têm vindo a ser desenvolvidos processos químicos mais limpos, inovadores e ambientalmente benignos.⁶²

O desenvolvimento de reações limpas, com processos suaves e elevados rendimentos, representam ainda um desafio para os processos de diazotação e de reações de acoplamento diazo. Encontram-se descritos na literatura a utilização de novos catalisados como zeólitos, leveduras de

panificação, zircónias sulfatadas, montmorilonita K10 modificado e silicatos. Estes novos métodos mais “verdes” demonstraram elevada eficiência na síntese de novos corantes azo evitando assim o uso de solventes e ácido no meio reacional.^{63,64}

Encontram-se também exemplos de oxidação de amins aromáticas primárias catalisadas com CuCl em condições aeróbias, esquematizado na Figura 1.18, o qual se mostra ser um processo altamente eficiente, com baixos custos e de fácil manuseamento.⁶⁵

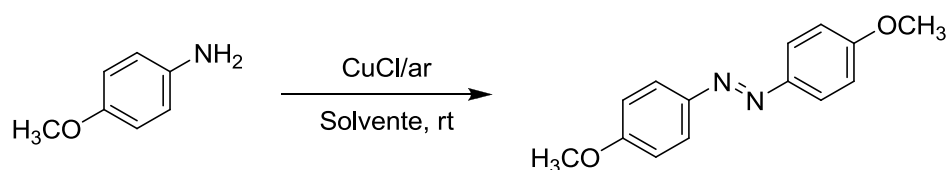


Figura 1.18- Oxidação da 4-metóxi-anilina catalisada com CuCl, em que se variou o solvente de forma a maximizar o rendimento da reação.⁶⁵

Embora os métodos catalíticos existentes possam atingir valores de rendimentos favoráveis de compostos azo, tem também vindo a ser desenvolvida a utilização de métodos por irradiação de ultra-sons e micro-ondas (Figura 1.19) tendo como vantagens reduzir ou dispensar a utilização de catalisadores, facilitar a separação dos produtos e reduzir o tempo reacional.⁶⁶

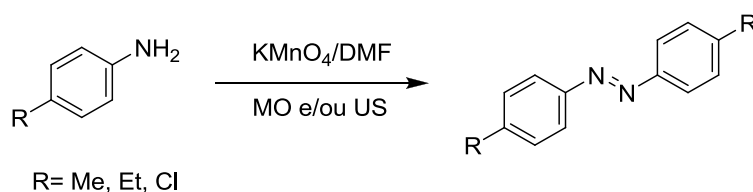


Figura 1.19- Oxidação de amins aromáticas primárias sob irradiação com ultra-sons e /ou micro-ondas.⁶⁶

Mais recentemente, tem também vindo a ser estudada a possibilidade da utilização de nanocatalisadores de ácidos fortes recicláveis com propriedades magnéticas para o desenvolvimento de uma nova estratégia para a síntese de corantes azo. Foram efetuadas reações de síntese utilizando como catalisador o Fe₃O₄@SiO₂-SO₃H que resultaram em rendimentos elevados de compostos

azo, ausente de solventes tóxicos e catalisadores ácidos e com baixos tempos de reação, de acordo com o que se encontra apresentado na Figura 1.20.⁶⁷

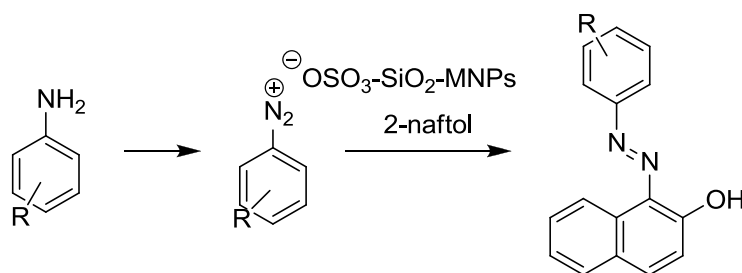


Figura 1.20 – Reação de diazotação e de acoplamento diazo utilizando como catalisador $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-SO}_3\text{H}$.⁶⁷

Revelou-se igualmente eficiente a obtenção de corantes azo a partir de reações de hidrogenação de nitrobenzeno catalisadas com nanofios de platina (Pt NWs), apresentando um exemplo na Figura 1.21.⁶⁸

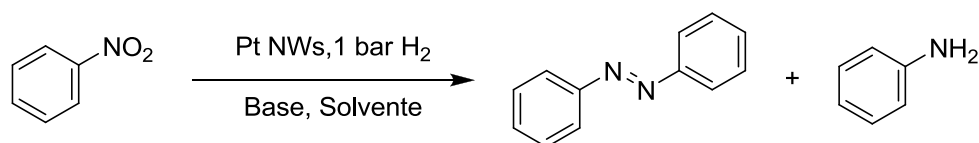


Figura 1.21-Reação de hidrogenação do nitrobenzeno.⁶⁸

Devido às suas capacidades oxidativas as lacases têm sido amplamente testadas em mecanismos de descoloração e degradação de corantes sintéticos^{69,70}, em processos de branqueamento e de tingimento têxtil.⁷¹ As lacases têm também a capacidade de intervir em reações de acoplamento oxidativo entre compostos aromáticos, pelo que o seu uso como biocatalisadores tem vindo a evidenciar-se como uma alternativa à síntese química de corantes já existentes ou de novos compostos. Com base nos resultados obtidos em trabalhos de investigação anteriormente desenvolvidos verificou-se que a oxidação de aminas aromáticas com lacases, nomeadamente a CotA-lacase e a TvL, originaram compostos azo como produtos secundários. Esta evidência levou à utilização da CotA-lacase neste trabalho com o objetivo de obtenção de corantes azo.^{11,20,72,73}

2. Resultados e Discussão

Este trabalho foi desenvolvido essencialmente em duas fases. Numa primeira fase procedeu-se à seleção e caracterização dos substratos e posteriormente a ensaios de rastreio, com o objetivo de definir as condições reacionais ótimas para o processo biocatalítico em estudo. Com as condições ótimas definidas avançou-se para uma segunda fase onde se efetuaram as reações de aumento de escala que permitiram isolar os produtos finais e a sua posterior caracterização.

A escolha dos substratos estudados foi efetuada com base em trabalhos anteriores^{11,17,20,74} desenvolvidos no nosso grupo de investigação, onde se demonstrou que determinadas aminas aromáticas são facilmente oxidáveis por lacases, particularmente pela CotA-lacase, uma lacase de origem bacteriana, desenvolvida no grupo Microbial and Enzyme Technology, coordenado pela Professora Doutora Lígia O. Martins do Instituto de Tecnologia Química e Biológica, promovendo reações de acoplamento homo e heteromolecular que conduzem à formação de diferentes produtos corados com estruturas variadas, entre as quais, compostos azo.

2.1. Substratos estudados

Com base nesse conhecimento este trabalho foi definido selecionando como substratos diferentes aminas aromáticas que, pela sua estrutura, permitissem aprofundar o estudo do processo biocatalítico que conduz à formação de compostos azo, através de um processo homomolecular. Foram também estudados alguns compostos aromáticos policíclicos e compostos heteroaromáticos.

Os substratos foram organizados em quatro diferentes conjuntos tendo em consideração a sua estrutura e, sempre que possível, dentro de cada família, a presença de grupos substituintes doadores ou aceitadores de eletrões.

Aminas aromáticas *para*-substituídas: Este conjunto é composto por nove aminas aromáticas *para*-substituídas com diferentes grupos funcionais que foram utilizadas em reações de acoplamento homomolecular. Três com grupos ativadores fortes: a *N,N*-dimetilfenilamina (*N,N*-DA), a *N,N*-dietil-*p*-fenilnodiamina (*N,N*-DEA) e o sulfato *N,N*-bis(2-hidroxi-etil)-1,4-fenilenodiamina (*N,N*-bOH-DA); duas com grupos ativadores moderados: 4-metoxifenilamina (4-MA) e a 4-fenoxianilina (4-PA); uma com um grupo ativador fraco: a 4-etilanilina (4-EA); uma com um grupo desativador fraco: a 4-cloroanilina (4-CIA) e duas com grupos desativadores moderados: o ácido 4-aminobenzenossulfônico (4-ABSA) e a sulfanilamida (4-SA), cujas estruturas se apresentam na Figura 2.1.

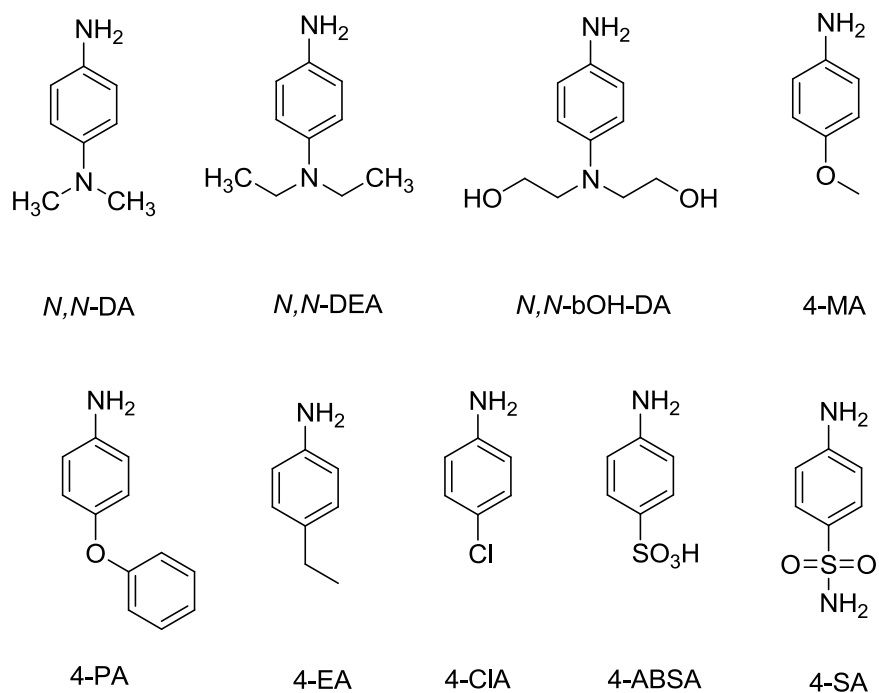


Figura 2.1 – Estruturas moleculares das aminas aromáticas *para*-substituídas.

Orto-diaminas aromáticas substituídas: Este conjunto é composto por duas *orto*-diaminas aromáticas substituídas na mesma posição com um grupo desactivador forte a 4-nitro-*o*-fenilendiamina (4-NPDA) e com um grupo desactivador moderado a 3,4-diaminobenzonitrilo (3,4-DABN), ambas utilizadas em reações de acoplamento homomolecular, cujas estruturas se apresentam na Figura 2.2.

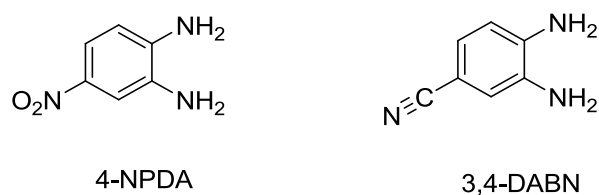


Figura 2.2 – Estruturas moleculares das *orto*-diaminas aromáticas substituídas.

Compostos aromáticos policíclicos: Este conjunto é composto por três compostos com estrutura naftalénica, que foram utilizados em reações de acoplamento homomolecular, nomeadamente a 1-naftilamina (1-NA) e o ácido 5-aminonaftalenosulfónico (5-ANSA) e um composto heteropolicíclico derivado da quinolina, o 8-aminoquinolina (8-AQA), cujas estruturas se apresentam na Figura 2.3.

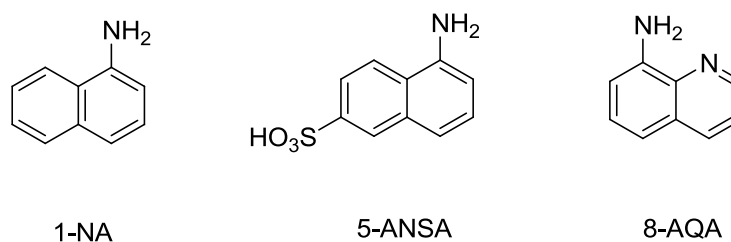


Figura 2.3- Estruturas moleculares dos compostos aromáticos policíclicos.

Compostos heteroaromáticos: Este conjunto é composto por três piridinas substituídas, designadamente a 2,3-diaminopiridina (2,3-DAPA), a 3-aminopiridina (3-APA) e a 2,6-diaminopiridina (2,6-DAPA) e o pirazol, utilizados em reações de acoplamento homomolecular, cujas estruturas se apresentam na Figura 2.4.

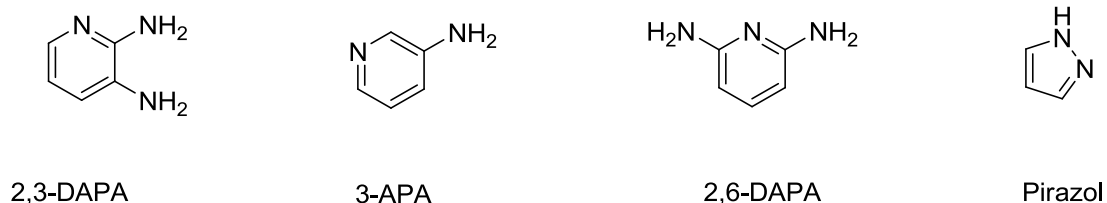


Figura 2.4 – Estruturas moleculares dos compostos heteroaromáticos.

2.1.1. Caracterização dos substratos

Depois de selecionados e agrupados, efetuaram-se estudos de solubilidade a todos os substratos. Este estudo teve como objetivo verificar a solubilidade dos diferentes substratos em água, solvente preferencial quando se trabalha com enzimas. No entanto, é sabido que muitos compostos orgânicos são insolúveis em água tendo-se escolhido o etanol como segundo solvente, por tratar-se de um solvente ambientalmente sustentável e que estudos anteriormente efetuados por Lígia O. Martins *et al.* (resultados não publicados) mostraram que a CotA-lacase não perde atividade significativa para percentagens de etanol até 30 % de volume de reação. Verificou-se que a maioria dos substratos, à exceção da *N,N*-bOH-DA e do 3-APA que se confirmaram solúveis, eram insolúveis em água. De formar a contornar este problema, as reações foram, sempre que possível, efetuadas num sistema etanol:tampão fosfato (1:9), utilizando apenas 10 % de solvente orgânico, mantendo assim a atividade da ação da enzima.

Procedeu-se também à caracterização dos substratos através da determinação dos potenciais de oxidação e espectroscopias de UV-Vis e RMN. Os espectros de ¹H-RMN dos substratos foram determinados na perspetiva de efetuar comparações estruturais com os produtos reacionais obtidos, ajudando na sua caracterização.

2.1.1.1. Determinação do potencial de oxidação

As lacases tipicamente têm um potencial redox no intervalo de 0,5-0,8 V vs ENH³⁶ sendo por este motivo dificultada a oxidação direta de substratos com valores de potenciais de oxidação mais elevados. Assim, é de todo o interesse determinar o potencial de oxidação dos substratos de forma a prever a eficiência das reações para o sistema enzima/substrato.

Para cada um dos compostos estudados (a uma concentração de 1×10^{-3} M) foram determinados os seus potenciais de oxidação por voltametria cíclica, numa célula eletroquímica convencional contendo fio de platina como contra-elétrodo, o eletrodo de Ag/AgCl como referência e um eletrodo de disco de platina, com 1 mm de diâmetro, como eletrodo de trabalho. Os valores foram determinados a pH 6 e os resultados corrigidos em +0,197 V⁷⁵, em relação ao eletrodo normal de hidrogénio (ENH).

Apresentam-se na Figura 2.5, os voltamogramas cíclicos dos substratos *N,N*-bOH-DA e 3,4-DABN como exemplo do comportamento típico observado para os diferentes substratos. No primeiro caso (Figura 2.5-A) observam-se dois processos redox quasi-reversíveis com $E_{1/2} = 0,38$ V e $E_{1/2} = 0,55(5)$ V, respetivamente. No segundo exemplo (Figura 2.5-B) o processo é irreversível caracterizado unicamente pela onda de oxidação a 0,83 V (onda I).

Na Tabela 2.1 apresentam-se os valores de potencial de oxidação obtidos para os diferentes substratos. A análise dos resultados obtidos mostra que os valores de E_{pa} variaram entre 0,42 e 1,27 V vs ENH.

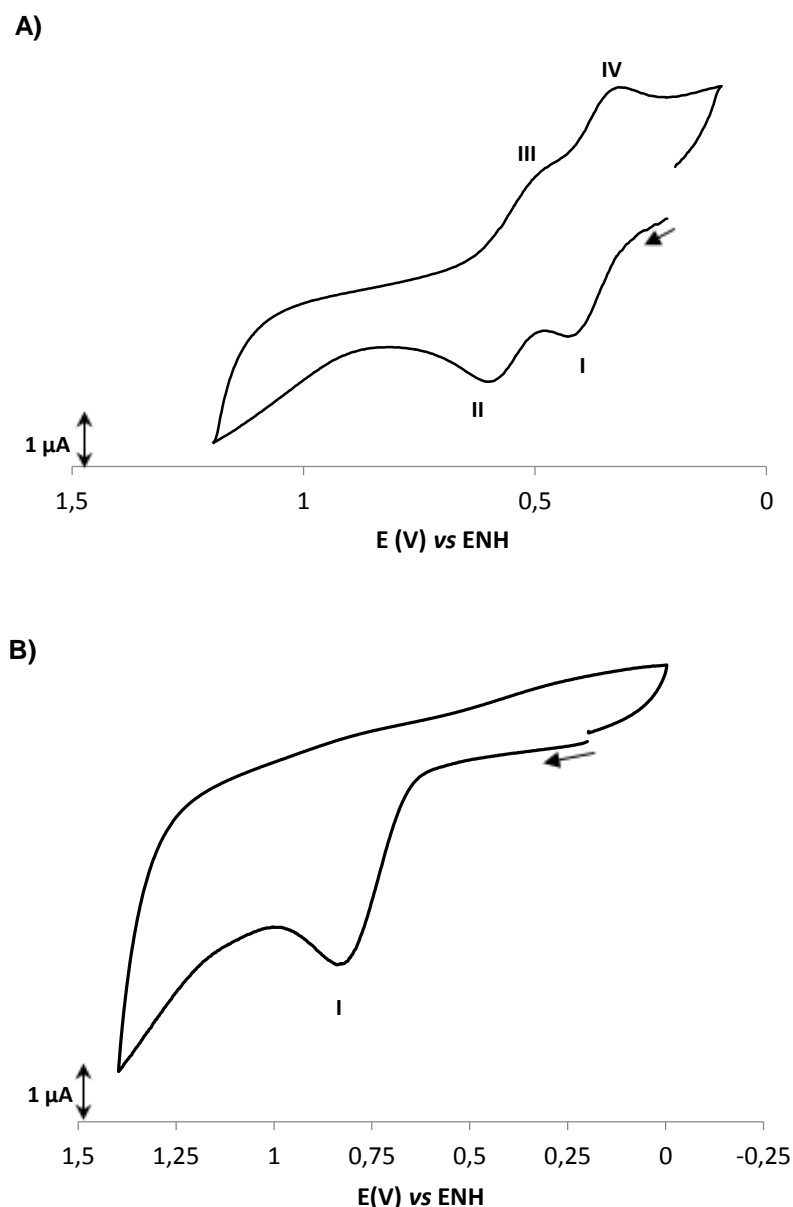


Figura 2.5 - Voltamogramas cíclicos, obtidos em solução 1:9 etanol:tampão fostatos 20 mM a pH 6,0, com velocidade de varrimento de 100 mV/s, com $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ de **A)** *N,N*-bOH-DA e **B)** 3,4-DABN

Através dos resultados obtidos verificou-se que aminas aromáticas *para*-substituídas com grupos doadores apresentam valores de potencial de oxidação mais baixos (0,42-0,77 V) que as aminas *para*-substituídas com grupos aceitadores (1,12-1,27 V). Esta tendência de resultados encontra-se de acordo com o trabalho anteriormente desenvolvido por Sousa *et al.*¹¹ A presença de grupos aceitadores em posição *para*, desloca a densidade eletrônica do átomo de azoto da amina, sendo que este par de elétrons fica indisponível para o processo de oxidação tornando-o desta forma mais difícil de

ocorrer. Quando existe a presença de grupos doadores ocorre o efeito contrário, pelo que o processo de oxidação é mais facilitado.

No caso das *orto*-diaminas aromáticas substituídas obteve-se valores de potencial de oxidação muito semelhantes (0,89 V e 0,83 V) devido à semelhança da estrutura dos compostos e possuem grupos aceitadores em posição *para*.

Tabela 2.1 - Dados eletroquímicos para os diferentes substratos (1×10^{-3} M) vs ENH, em solução etanol:tampão fosfatos pH 6 (1:9) para uma velocidade de varrimento de 100 mV/s.

Substratos		E_{pa} (V)	E_{pc} (V)
Aminas aromáticas <i>para</i>-substituídas	<i>N,N</i> -DA	0,57	0,35
	<i>N,N</i> -DEA	0,48	0,27
		0,69	----
	<i>N,N</i> -bOH-DA	0,42 ^{a)}	0,34
		0,60 ^{b)}	0,51
	4-MA	0,77	0,30
	4-EA	1,27	----
	4-CIA	1,12	----
	4-ABSA	1,18	----
4-SA	1,12	----	
<i>Orto</i>-diaminas aromáticas substituídas	4-NPDA	0,89	----
	3,4-DABN	0,83	----
Compostos aromáticos policíclicos	1-NA	0,77	----
	5-ANSA	0,89	----
	8-AQA	0,99	----
Compostos heteroaromáticos	2,3-DAPA	0,87	----
	3-APA	1,27	----
	2,6-DAPA	1,03	----

a) $E_{1/2} = 0,38$ V, $\Delta E = 80$ mV; b) $E_{1/2} = 0,55(5)$ V, $\Delta E = 90$ mV

Tendo em conta que o potencial redox da CotA-lacase, enzima utilizada neste trabalho, é de 0,55 V (vs ENH)³⁰, através dos resultados apresentados na Tabela 2.1 verifica-se que apenas para os substratos *N,N*-DA, *N,N*-DEA, *N,N*-bOH-DA e 4-MA é previsível que ocorra a reação de oxidação sem utilização de mediador químico, para os restantes substratos, devido aos seus valores elevados de potencial oxidação, a reação só deverá ocorrer com recurso a um mediador.

2.1.1.2. Espectroscopia de UV-Vis

De forma a caracterizar os substratos *N,N*-DEA, *N,N*-bOH-DA e 4-MA foram efetuados os espectros de absorção UV-Vis numa gama de comprimentos de onda compreendida entre os 200-900 nm, utilizando células de quartzo de duas faces com 1 cm de percurso ótico.

Verificou-se que os substratos estudados não absorvem na região do visível mas sim na região do ultravioleta. A título de exemplo apresenta-se na Figura 2.6 o espectro de absorção UV-Vis da *N,N*-DEA, onde se verifica a existência de duas bandas, uma a 240 nm e outra a 286 nm características das transições π - π^* do anel aromático.

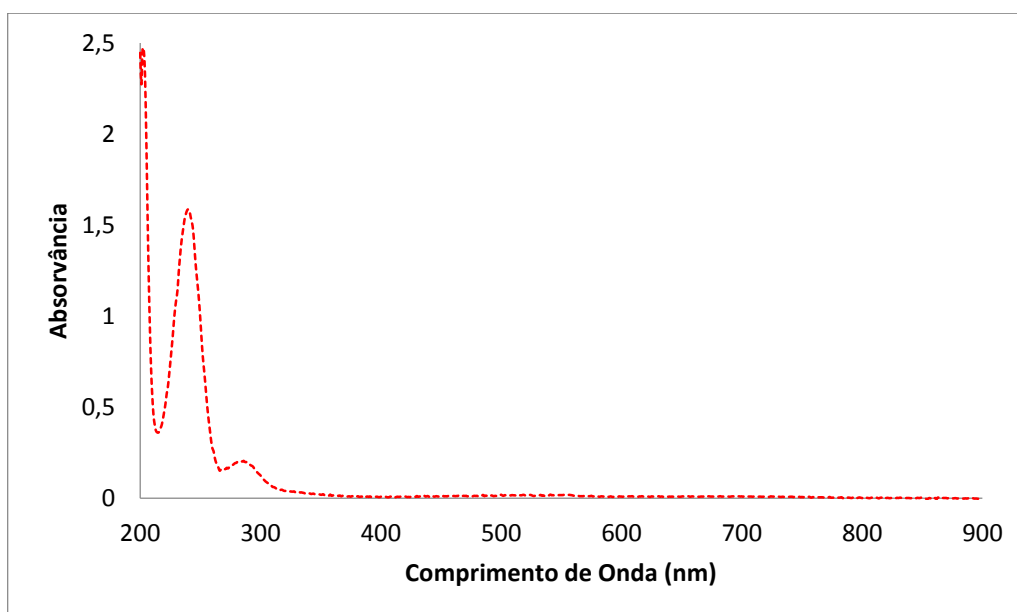


Figura 2.6 - Espectro de absorção UV-Vis de 1×10^{-4} M do substrato *N,N*-DEA.

A lei de Lambert-Beer estabelece uma relação entre a absorvância de uma solução e a sua concentração, quando atravessada por uma radiação luminosa monocromática (raios luminosos paralelos) através da expressão:

$$A = \epsilon cl$$

A = Absorvância

ϵ = Coeficiente de absorvidade molar ($\text{cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{L}$)

l = Percurso ótico (1 cm)

c = Concentração do composto em solução (mol L^{-1})

Os espectros de absorção UV-Vis da *N,N*-bOH-DA e 4-MA são semelhantes ao exemplo anteriormente referido, pelo que se apresentam na Tabela 2.2 os valores de comprimento de onda (λ) e do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) para os substratos.

Tabela 2.2 – Valores de comprimento de onda e do coeficiente de absorvidade molar dos substratos *N,N*-DEA e *N,N*-bOH-DA a 1×10^{-4} M e da 4-MA a 3×10^{-4} M.

Substrato	λ (nm)	ϵ ($\text{cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{L}$)
<i>N,N</i> -DEA	240	15860
	286	2050
<i>N,N</i> -bOH-DA	257	8630
	309	1270
4-MA	232	3326
	309	820

2.2. Reações enzimáticas de *screening*

Os ensaios de *screening* iniciais, efetuados para todos os substratos escolhidos, tiveram como objetivo verificar se a CotA-lacase, enzima escolhida neste trabalho, promovia a oxidação dos substratos selecionados gerando produtos corados neste processo. Com esse objetivo escolheram-se 3 valores de pH (6,0, 7,0 e 8,0) na gama onde a CotA-lacase apresenta atividade máxima para aminas aromáticas^{11,29} e desta forma estudou-se a influência do

valor de pH na oxidação dos mesmos. Os ensaios realizaram-se em placas de 96 poços, com um volume total de 200 μL , utilizando uma concentração de 5 mM de substrato, em 20 mM de solução tampão fosfatos aos três valores de pH, utilizando 1 U/mL de CotA-lacase, na presença de oxigénio. Observou-se visualmente se ocorria formação de cor, ao longo de 24 h, e todos os ensaios foram monitorizadas por cromatografia de camada fina (CCF). Na Figura 2.7 mostra-se, a título de exemplo, a variação de cores obtidas para os substratos *N,N*-DEA, *N,N*-bOH-DA e 4-MA no instante t_0 (aproximadamente um minuto após a adição de enzima) e após 24 h para a reação controlo e reação com CotA-lacase.

Substrato <i>N,N</i> -DEA				
pH	Reação Controlo $t=0$	Reação com CotA-lacase $t=0$	Reação Controlo $t=24\text{h}$	Reação com CotA-lacase $t=24\text{h}$
6				
7				
8				
Substrato <i>N,N</i> -bOH-DA				
pH	Reação Controlo $t=0$	Reação com CotA-lacase $t=0$	Reação Controlo $t=24\text{h}$	Reação com CotA-lacase $t=24\text{h}$
6				
7				
8				
Substrato 4-MA				
pH	Reação Controlo $t=0$	Reação com CotA-lacase $t=0$	Reação Controlo $t=24\text{h}$	Reação com CotA-lacase $t=24\text{h}$
6				
7				
8				

Figura 2.7 - Cores observadas nas reações de *screening* de 5 mM dos substratos *N,N*-DEA, *N,N*-bOH-DA e 4-MA no instante t_0 (aproximadamente um minuto após a adição da enzima) e após 24 h, nas reações controlo e com CotA-lacase.

Com este primeiro estudo e após a análise dos resultados globais foi possível verificar que a CotA-lacase promoveu a oxidação dos substratos *N,N*-DA, *N,N*-DEA, *N,N*-bOH-DA, 4-MA, 4-PA e 3,4-DABN aos 3 valores de pH testados. Assim que se adicionou a enzima a formação de cor foi evidente para os substratos referidos, com cores finais a variar na gama entre os violeta-

roxos/azul (*N,N*-DA, *N,N*-DEA, *N,N*-bOH-DA) e os laranja/acastanhado (4-MA, 4-PA e 3,4-DABN).

Verificou-se também que nos ensaios controlo existiu uma ligeira oxidação dos substratos decorridas 24 horas, revelando que a enzima é essencial ao processo de oxidação. Foi ainda possível verificar que nos casos dos substratos 4-MA e 3,4-DABN ocorreu formação de precipitado no final de 24 horas de reação.

Para os substratos 4-EA, 4-CIA, 4-NPDA, 1-NA, 8-AQA e 2,3-DAPA foi possível verificar que a enzima promoveu uma ligeira oxidação, pelo aparecimento ténue de cor, enquanto que para os substratos 4-ABSA, 4-SA, 5-ANSA, 3-APA, 2,6-DAPA e Pirazol não se verificou qualquer formação de cor. A análise das placas de CCF permitiu confirmar que não ocorreu qualquer alteração destes últimos substratos, nas condições em estudo, nos meios onde não se observou aparecimento de cor.

Na Tabela 2.3 encontra-se o resumo dos resultados visuais observados neste estudo inicial. Verificou-se que o valor de pH influenciou a intensidade da cor formada e da análise dos resultados da monitorização por CCF constatou-se que o valor de pH 6 foi aquele onde o consumo de substrato foi mais rápido, sugerindo que a atividade enzimática é superior a pH 6,0 facto, que está de acordo com outros estudos encontrados na literatura.^{11,29}

Tabela 2.3 – Resultados observados nas reações de 5 mM de substrato, a pH 6,0, 7,0 e 8,0 com 1 U/mL de CotA-lacase ao fim de 24h

Substratos	Cores observadas aos diferentes valores de pH			Outras observações da análise da placa CCF no final de 24h
	pH 6	pH 7	pH 8	
N,N-DA	Roxo/acastanhado	Roxo/acastanhado	Castanho	Formação de um só produto
N,N-DEA	Roxo	Roxo	Violeta	Formação de mais do que um produto
N,N-bOH-DA	Azul-escuro	Roxo	Roxo	Formação de mais do que um produto
4-MA	Formação de um precipitado acastanhado	Formação de um precipitado acastanhado	Formação de um precipitado acastanhado	Formação de dois produtos
4-PA	Precipitado Branco	Precipitado Branco	Precipitado Branco	Verificou-se que o precipitado correspondia ao substrato
4-EA	Ligeiramente Laranja	Ligeiramente Laranja	Ligeiramente Laranja	Ligeira oxidação do substrato
4-CIA	Ligeiramente Avermelhado	Ligeiramente Avermelhado	Ligeiramente Avermelhado	Ligeira oxidação do substrato
4-ABSA	Incolor	Incolor	Incolor	Não há reação
4-SA	Incolor	Incolor	Incolor	Não há reação
4-NPDA	Ligeiramente Amarelado	Ligeiramente Amarelado	Ligeiramente Amarelado	Ligeira oxidação do substrato
3,4-DABN	Formação de um precipitado Laranja	Formação de um precipitado Laranja	Formação de um precipitado Laranja	Formação de mais do que um produto
1-NA	Ligeiramente arroxeadada	Ligeiramente arroxeadada	Ligeiramente arroxeadada	Ligeira oxidação do substrato
5-ANSA	Incolor	Incolor	Incolor	Não há reação
8-AQA	Ligeiramente Alaranjado	Ligeiramente Alaranjado	Ligeiramente Alaranjado	Ligeira oxidação do substrato
2,3-DAPA	Ligeiramente Laranja	Ligeiramente Laranja	Ligeiramente Laranja	Ligeira oxidação do substrato
3-APA	Incolor	Incolor	Incolor	Não há reação
2,6-DAPA	Incolor	Incolor	Incolor	Não há reação
Pirazol	Incolor	Incolor	Incolor	Não há reação

Conforme referido, a gama de substratos passíveis de oxidação poderá ser alargada utilizando mediadores. Com base nesta observação avançou-se para uma segunda fase onde se seleccionou um mediador, pelo que se recorreu à utilização do ABTS, testando-se desta forma o sistema catalítico CotA-lacase/ABTS nos substratos não oxidáveis pelo sistema enzimático isolado.

A oxidação do ABTS ocorre em duas etapas, numa primeira etapa ocorre a oxidação do ABTS formando o ABTS^{•+} com potencial redox de $E^0=0,69$ V/ENH seguido da oxidação desse radical a ABTS²⁺ com potencial de $E^0=1,1$ V/ENH, de acordo com a Figura 2.8.⁷⁶

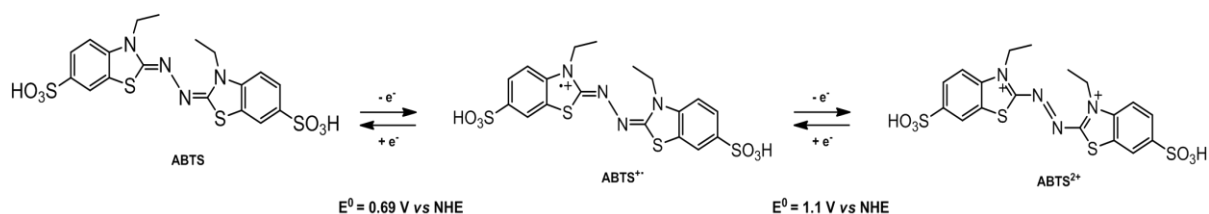


Figura 2.8- As duas etapas de oxidação do ABTS.⁷⁶

De forma a definir a concentração necessária de mediador a utilizar, efetuou-se um estudo semelhante fazendo variar a concentração de mediador (5 mM e 1 mM), mantendo os restantes parâmetros inalteráveis. Os ensaios foram realizados para os substratos 4-EA e 8-AQA, a pH 6,0 apresentando-se a título de exemplo na Figura 2.9 as cores observadas após 24 h para a oxidação do substrato 4-EA com o sistema catalítico CotA-lacase onde só se observou uma ligeira oxidação do substrato (Figura 2.9-A) e para o sistema catalítico CotA-lacase/ABTS (5 mM e 1 mM) onde se observou a formação de uma coloração acastanhada (Figura 2.9-B).

Através da análise das placas de CCF e pela observação visual da cor verificou-se que não existiam diferenças significativas no tempo de oxidação do substrato para as duas concentrações de ABTS em estudo, pelo que se optou pela utilização da concentração mais baixa (1 mM) de mediador para os restantes substratos.

Substrato 4-EA

A)		Reação Controlo t=24 h	Reação com CotA-lacase t=24 h
	pH6		

B)		Reação Controlo t=24 h	Reação com CotA-lacase/ABTS t=24 h
	5 mM de ABTS		
	1 mM de ABTS		

Figura 2.9 - Cores observadas nas reações de *screening* de 5mM do substrato 4-EA após 24 h com a presença de dois sistemas catalíticos (CotA-lacase e CotA-lacase/ABTS)

Com a utilização do sistema catalítico CotA-lacase/ABTS (1 U.mL⁻¹/ 1 mM) foi possível oxidar os substratos 4-EA, 4-CIA, 4-NPDA, 1-NA, 5-ANSA, 8-AQA e 2,3-DAPA com cores finais a variar na gama do vermelho/laranja (4-CIA e 2,3-DAPA), entre os rosa-roxos/azulado (1-NA, 5-ANSA, 8-AQA) e os laranja/acastanhado (4-EA e 4-NPDA).

Através destas reações de *screening* verificou-se que não ocorreu oxidação, com nenhum dos sistemas catalíticos, dos substratos 4-ABSA, 4-SA, 3-APA, 2,6-DAPA e pirazol. De acordo com a Figura 2.10, visualmente as reações de controlo e com CotA-lacase apresentavam-se incolores (Figura 2.10-A) e as reações com sistema catalítico CotA-lacase/ABTS apresentavam-se verdes escuras (Figura 2.10-B), cor característica do ABTS após ser oxidado pela CotA-lacase.⁷⁷

Estes resultados encontram-se resumidos na Tabela 2.4.

A)		Reação Controlo t=24 h	Reação com CotA-lacase t=24 h
	pH6		

B)		Reação Controlo t=24 h	Reação com CotA-lacase/ABTS t=24 h
	1 mM de ABT		

Figura 2.10 – Cores observadas nas reações de *screening* para 5 mM de substratos 4-ABSA, 4-SA, 3-APA, 2,6-DAPA e pirazol com a presença de dois sistemas catalíticos (CotA-lacase a 1 U/mL e CotA-lacase/ABTS a 1 U.mL⁻¹/1 mM) a pH 6,0 no final de 24h.

Da análise dos ensaios de *screening* definiram-se as condições ótimas reacionais de pH 6,0 e 1 U/mL de CotA-lacase para os substratos oxidados pela lacase e de pH 6,0 e 1 UmL⁻¹/1 mM de CotA-lacase/ABTS para os substratos oxidados na presença de um mediador.

Tabela 2.4 – Resumo das condições catalíticas das reações dos ensaios de *screening* (pH 6,0, [CotA-lacase] = 1 U/mL, [ABTS] = 1 mM).

Substratos	CotA-lacase 1 U/mL	CotA-lacase/ABTS 1 UmL ⁻¹ /1 mM
<i>N,N</i> -DA	✓	----
<i>N,N</i> -DEA	✓	----
<i>N,N</i> -bOH-DA	✓	----
4-MA	✓	----
4-PA	✓	----
4-EA	----	✓
4-CIA	----	✓
4-ABSA	----	----
4-SA	----	----
4-NPDA	----	✓
3,4-DABN	✓	----
1-NA	----	✓
5-ANSA	----	✓
8-AQA	----	✓
2,3-DAPA	----	✓
3-APA	----	----
2,6-DAPA	----	----
Pirazol	----	----

Após a realização dos ensaios de *screening*, avançou-se para as reações de aumento de escala nas condições catalíticas definidas anteriormente.

2.3. Reações de oxidação de aumento de escala

Com o objetivo de identificar e caracterizar o tipo de produtos obtidos procedeu-se à realização das reações de aumento de escala, realizadas nas condições ótimas definidas no *screening* inicial. As reações foram realizadas num volume total de 10 mL a 37 °C, com uma concentração de 5 mM de substrato, numa mistura (1:9) etanol:solução tampão fosfato (20 mM) a pH 6,0 e 1 U/mL de CotA-lacase na presença de oxigénio e com agitação. Sempre que o processo necessitava da utilização de um mediador, adicionou-se 1 mM de ABTS. Todas as reações foram monitorizadas por CCF e com tempos de reação que não ultrapassaram as 24 h. Em paralelo foram realizadas reações de controlo na ausência dos respetivos sistemas catalíticos (CotA-lacase ou CotA-lacase/ABTS), sendo que a formação de produtos foi residual, mostrando que a presença do sistema catalítico é essencial para que ocorra o processo de oxidação.

Para as reações de oxidação das aminas aromáticas *N,N*-DEA, *N,N*-bOH-DA e 4-MA estudou-se ainda o curso da reação por espectroscopia de UV-Vis. No caso das reações de oxidação dos substratos 4-EA, 4-CIA, 4-NPDA, 1-NA, 5-ANSA, 8-AQA e 2,3-DAPA não se efetuou o mesmo tipo de estudo, uma vez que a presença do ABTS, cuja oxidação resulta na formação de um radical corado, condiciona a análise dos resultados pois existe a sobreposição de bandas na região do visível.

Sempre que necessário e possível os produtos foram purificados por cromatografia em coluna ou por cromatografia preparativa e caracterizados por espectroscopia de RMN e espetrometria de massa.

2.3.1. Oxidação de aminas aromáticas *para*-substituídas

2.3.1.1. Grupos substituintes -N(CH₃)₂, -N(CH₂CH₃)₂ e -N(CH₂CH₃OH)₂

As reações de oxidação das aminas aromáticas *N,N*-DA, *N,N*-DEA e *N,N*-bOH-DA foram efetuadas utilizando a CotA-lacase como biocatalisador, de acordo com o procedimento descrito na parte experimental.

Para os três casos verificou-se que o meio reacional adquiriu cor imediatamente após a adição da enzima. Para o substrato *N,N*-DA a cor adquirida foi roxo/acastanhado e para os substratos *N,N*-DEA e *N,N*-bOH-DA a cor obtida foi rosa. Em todas as reações referidas as cores foram-se intensificando ao longo do tempo. Após 24 h as misturas reacionais encontravam-se, roxo/acastanhado, roxa e azul-escuro, respetivamente e não apresentavam precipitado em solução.

Para o substrato *N,N*-DA procedeu-se à evaporação do solvente e obteve-se um sólido puro, porém para os substratos *N,N*-DEA e *N,N*-bOH-DA verificou-se a formação de mais do que um produto, pelo foi necessário proceder à sua purificação. Após o processo de purificação verificou-se que se obtiveram quantidades residuais dos produtos secundários, pelo que não foi possível a sua caracterização.

Obtiveram-se das reações de oxidação das aminas aromáticas *N,N*-DA, *N,N*-DEA e *N,N*-bOH-DA os compostos azo (**1**, **2** e **3**) isolados com rendimentos de 98, 81 e 84 %, respetivamente, de acordo com as estruturas apresentadas na Figura 2.11.

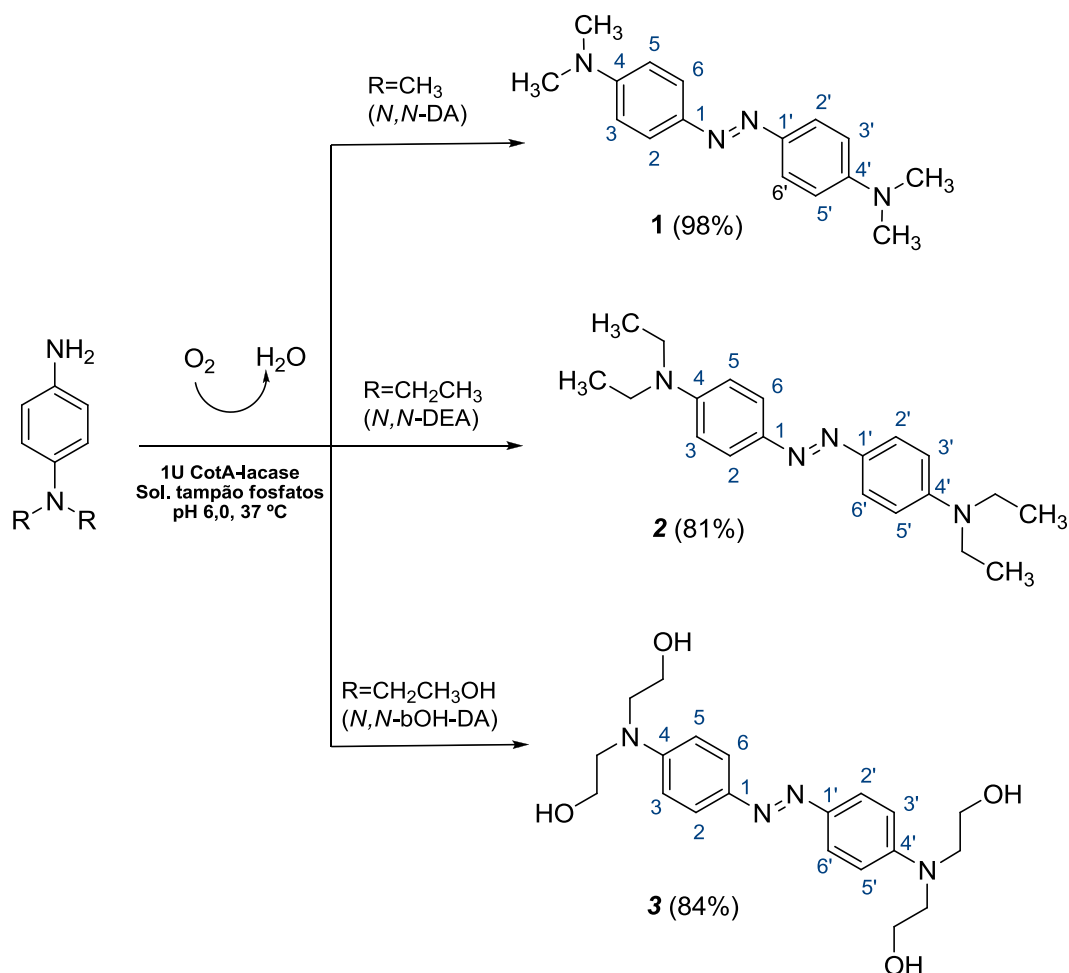


Figura 2.11- Estruturas moleculares dos produtos obtidos nas reações de oxidação do *N,N*-DA, *N,N*-DEA e *N,N*-bOH-DA catalisadas por CotA-lacase.

2.3.1.1.1. Caracterização estrutural dos compostos azo **1**, **2** e **3**

Os espectros de 1H -RMN dos compostos azo **1**, **2** e **3** mostram um perfil semelhante aos dos seus precursores caracterizados por dois dupletos, na região dos prótons aromáticos no intervalo entre $\delta = 8,00$ e $6,50$ ppm, de acordo com o apresentado na Figura 2.12. O facto dos espectros de 1H -RMN dos produtos finais possuírem um perfil semelhante ao espectro dos substratos indica que não terá ocorrido nenhum tipo de ligação no anel aromático. Os sinais dos prótons alifáticos surgem às frequências e formas expectáveis de acordo com os dados apresentados na Tabela 2.5.

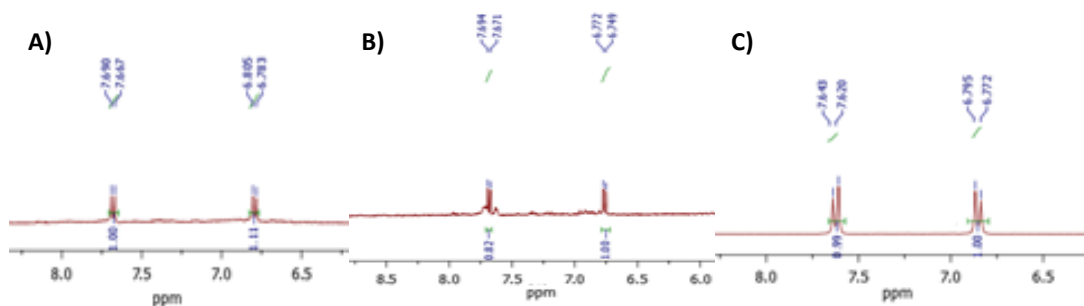


Figura 2.12 - Detalhe, na região dos prótons aromáticos, dos espectros de ^1H -RMN (400 MHz); **A)** do composto **1** em $\text{DMSO-}d_6$ (400 MHz); **B)** do composto **2** em $\text{MeOD-}d_4$ (400 MHz); **C)** do composto **3** em $\text{DMSO-}d_6$ (400 MHz).

Ao efetuar-se a comparação dos espectros de ^1H -RMN obtidos para o substrato *N,N*-DA e respectivo produto azo **1** (Figura 2.13), observa-se uma desblindagem dos prótons da estrutura do produto final, o que leva a sugerir a presença da ligação dupla entre os átomos de azoto ($-\text{N}=\text{N}-$). Este efeito é mais acentuado nos prótons *orto* relativos à ligação dupla ($\text{H}_{2,6}$ e $\text{H}_{2',6'}$) observado pelo deslocamento para frequências mais elevadas do duplete que os caracteriza. Verificou-se de uma forma idêntica um efeito de desblindagem dos prótons das estruturas dos produtos **2** e **3**, de acordo com os dados apresentados na Tabela 2.5, o que leva a sugerir que também estes produtos apresentem na sua estrutura a ligação dupla $-\text{N}=\text{N}-$.

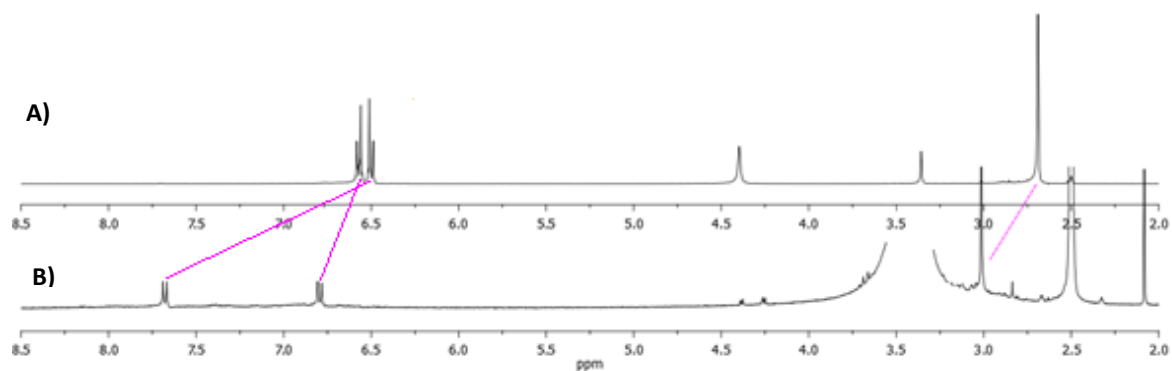


Figura 2.13 - Espectros de ^1H -RMN em $\text{DMSO-}d_6$ (400 MHz): **A)** do precursor *N,N*-DA; **B)** do composto **1**.

Os dados espectroscópicos dos substratos *N,N*-DA, *N,N*-DEA e *N,N*-bOH-DA e dos respectivos compostos azo **1**, **2** e **3** apresentam-se na Tabela 2.5. Verificou-se que para os compostos **1** e **2**, os valores observados para as ressonâncias de carbono encontram-se dentro dos intervalos expectáveis, destacando-se, no composto **1**, o sinal de frequência mais elevada ($\delta = 151,4$ ppm) atribuído à ressonância de C_{1,1'}, carbonos mais desblindados pelo efeito de proximidade à ligação dupla -N=N-. Para o composto **3**, apesar das diferentes tentativas não foi possível obter o espectro de ¹³C-RMN.

Tabela 2.5 - Dados de espectroscopia de ¹H e ¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) para os pares substrato/composto azo: *N,N*-DA /composto **1**, e *N,N*-DEA /composto **2** e *N,N*-bOH-DA /composto **3**.

Posição	<i>N,N</i> -DA		Composto azo 1	
	¹ H (δ , m, J)	¹ H (δ , m, J)	¹ H (δ , m, J)	¹³ C (δ)
1	-	-	-	151,4
2,6	6,49 (d, 2H, 8,9Hz)	7,68 (d, 4H, 9,1Hz)		123,6
3,5	6,57 (d, 2H, 8,9Hz)	6,79 (d, 4H, 9,2Hz)		111,7
4	-	-		Não detetado
CH ₃	2,69 (s, 6H)	3,01 (s, 12H)		Sob o sinal do solvente
NH ₂	4,40 (sl, 2H)	---		---
Posição	<i>N,N</i> -DEA		Composto azo 2	
	¹ H (δ , m, J)	¹ H (δ , m, J)	¹ H (δ , m, J)	¹³ C (δ)
1	-	-	-	Não detetado
2,6	6,73 (d, 4H, 8,9Hz)	7,69 (d, 4H, 9,2Hz)		125,1
3,5		6,76 (d, 4H, 9,2Hz)		112,3
4	-	-		Não detetado
CH ₂	3,10 (sl, 4H)	3,47 (q, 8H, 7,2Hz)		45,6
CH ₃	1,00 (t, 6H, 6,9Hz)	1,27 (s, 12H)		12,9
NH ₂	Não detetado	---		---
Posição	<i>N,N</i> -bOH-DA		Composto azo 3	
	¹ H (δ , m, J)	¹ H (δ , m, J)	¹ H (δ , m, J)	¹³ C (δ) *
1	-	-	-	
2,6	6,75 (d, 2H, 7,4Hz)	7,63 (d, 4H, 9,2Hz)		
3,5	7,06 (d, 2H, 7,4Hz)	6,78 (d, 4H, 9,2Hz)		
4	-	-		
CH ₂	3,51 (t, 8H, 5,4Hz)	4,33 (t, 4H, 13,2Hz)		
CH ₂	Sob o sinal da água do solvente	4,12 (t, 4H, 13,2Hz)		
OH	9,44 (sl, 2H)	-		
NH ₂	4,77 (sl, 2H)	-		

N,N-DA/ **1** e *N,N*-bOH-DA/ **3** em DMSO-*d*₆; *N,N*-DEA/ **2** em (CD₃OD-*d*₄).

(*) – Não foi possível obter espectro de ¹³C-RMN.

As estruturas dos compostos **1**, **2** e **3** foram corroboradas por espectrometria de massa. Na Figura 2.14 apresentam-se detalhes dos espectros *full scan* de ESI-MS, em modo positivo, onde é possível identificar as moléculas protonadas $[M+H]^+$ para os três compostos a m/z 269, 325 e 389, respectivamente.

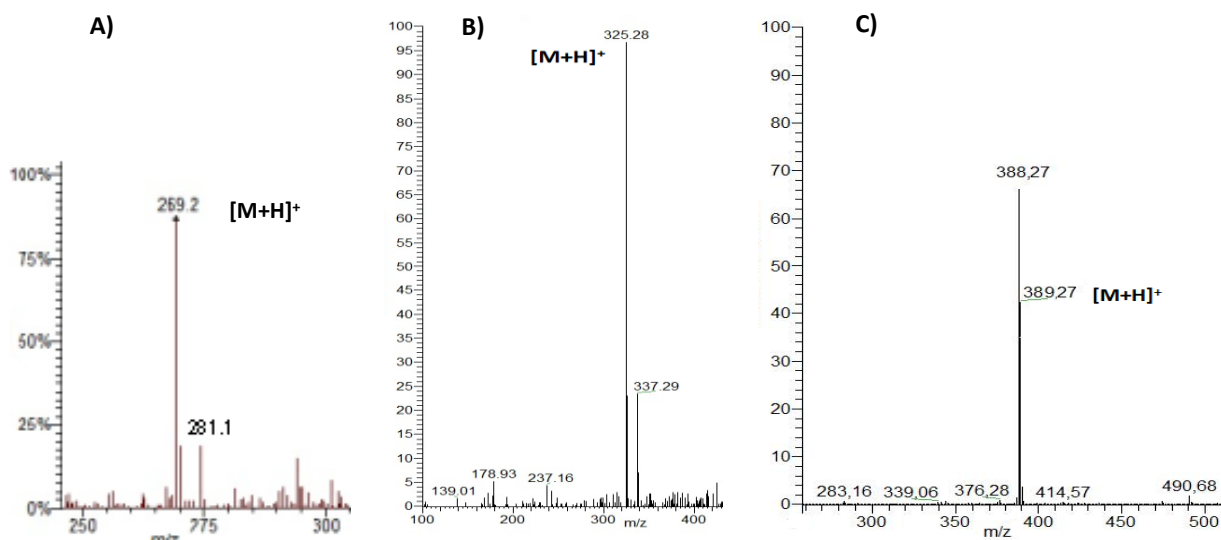


Figura 2.14 - Detalhes dos espectros de ESI-MS em modo positivo. **A)** do composto **1**; **B)** do composto **2**; **C)** do composto **3**.

A fragmentação das espécies protonadas deu origem aos respectivos espectros de MS^2 , com iões fragmento coerentes com as estruturas propostas.

A fragmentação do ião precursor m/z 269 gerado a partir do composto **1** originou três iões a m/z 148, 120 e 105 atribuídos à perda de $C_8H_{11}N$, $C_8H_{11}N_3$ e $C_2H_5N+C_8H_{11}N$, respectivamente. Na Figura 2.15 encontra-se apresentado o espectro MS^2 e a proposta de para a estruturas geradas.

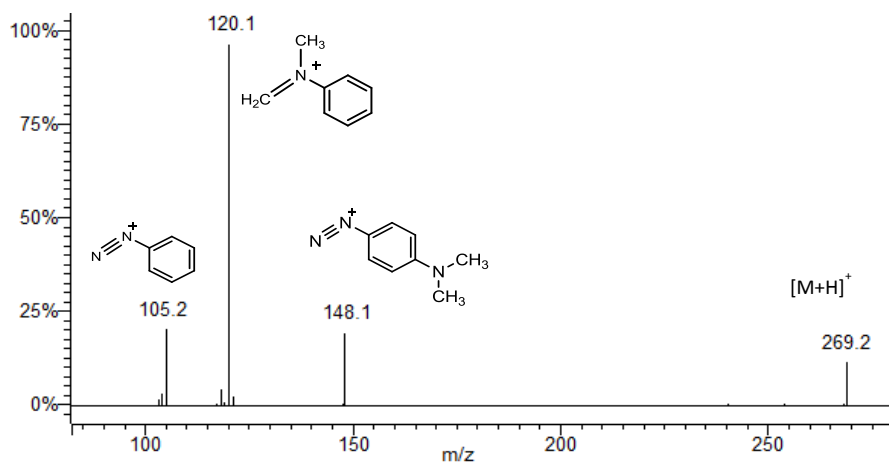


Figura 2.15 – Espectro ESI(+)-MS² da molécula protonada m/z 269 do composto **1** com as respectivas propostas de fragmentação.

A fragmentação do íon precursor com m/z 325 gerado a partir do composto **2** originou dois íões produto radicalares a m/z 310 e 296 formados por perda do radical metil ($\cdot\text{CH}_3$) e etil ($\cdot\text{CH}_2\text{CH}_3$), respectivamente (Figura 2.16). É ainda possível identificar no espectro MS² o íon a m/z 148 gerado por perda de $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_3$, de acordo com a proposta de fragmentação apresentado na Figura 2.17.

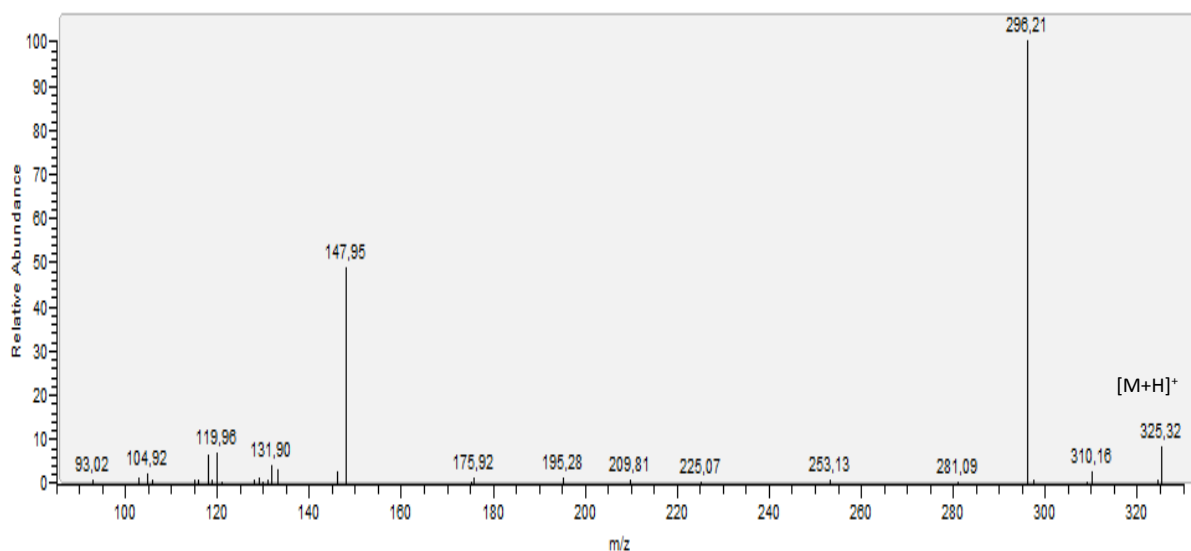


Figura 2.16 – Espectro ESI(+)-MS² da molécula protonada com m/z 325 do composto **2**.

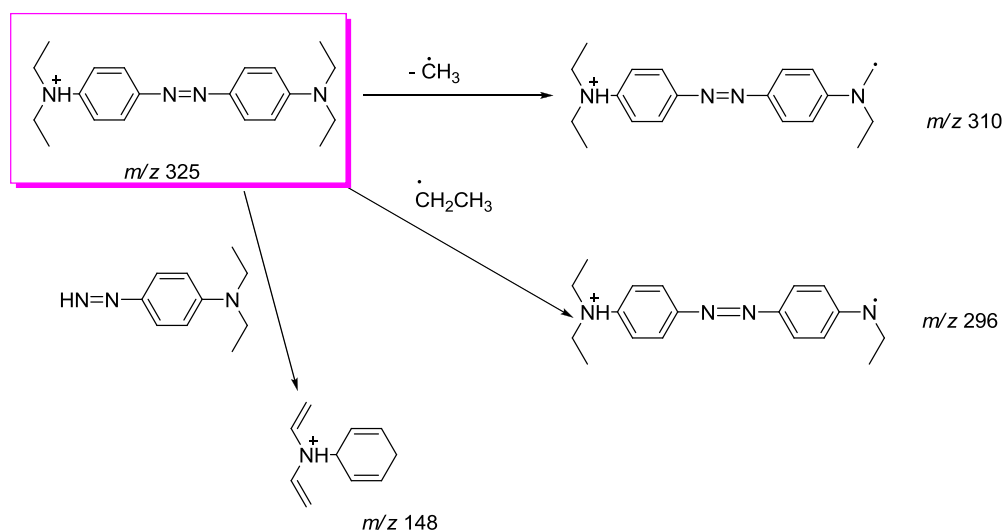


Figura 2.17 – Proposta de fragmentação para a espécie protonada a m/z 325 do composto **2**.

A espécie protonada a m/z 389 do composto **3** foi dissociada (espectro MS^2 na Figura 2.18) e originou três iões a m/z 344, 313 e 285 correspondentes à perda dos radicais $\cdot\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, $\cdot\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \cdot\text{CH}_2\text{OH}$ e $\cdot\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$, respetivamente. A análise dos dados permitiu efetuar a proposta de fragmentação apresentada no esquema da Figura 2.19.

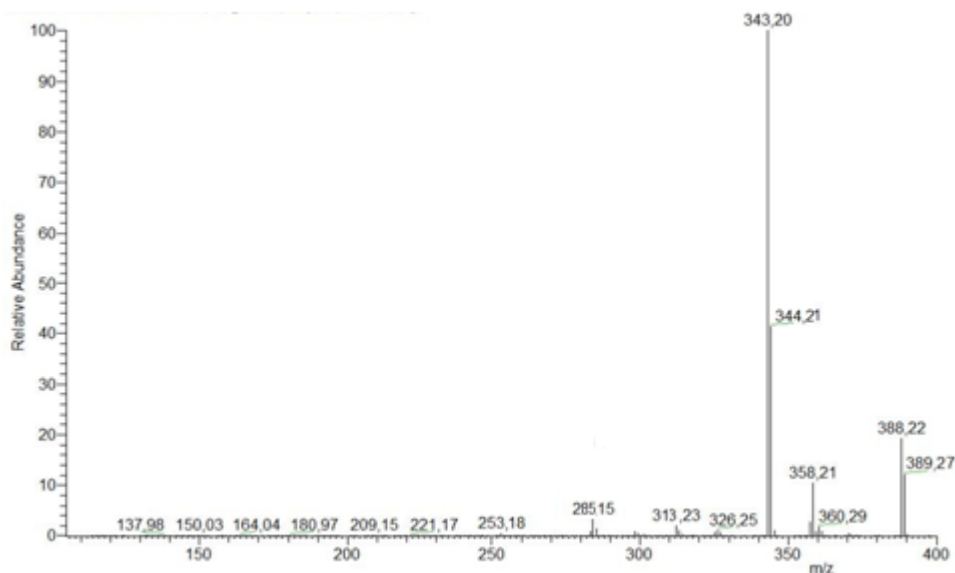


Figura 2.18 – Espectro ESI(+)- MS^2 da molécula protonada com m/z 389 do composto **3**.

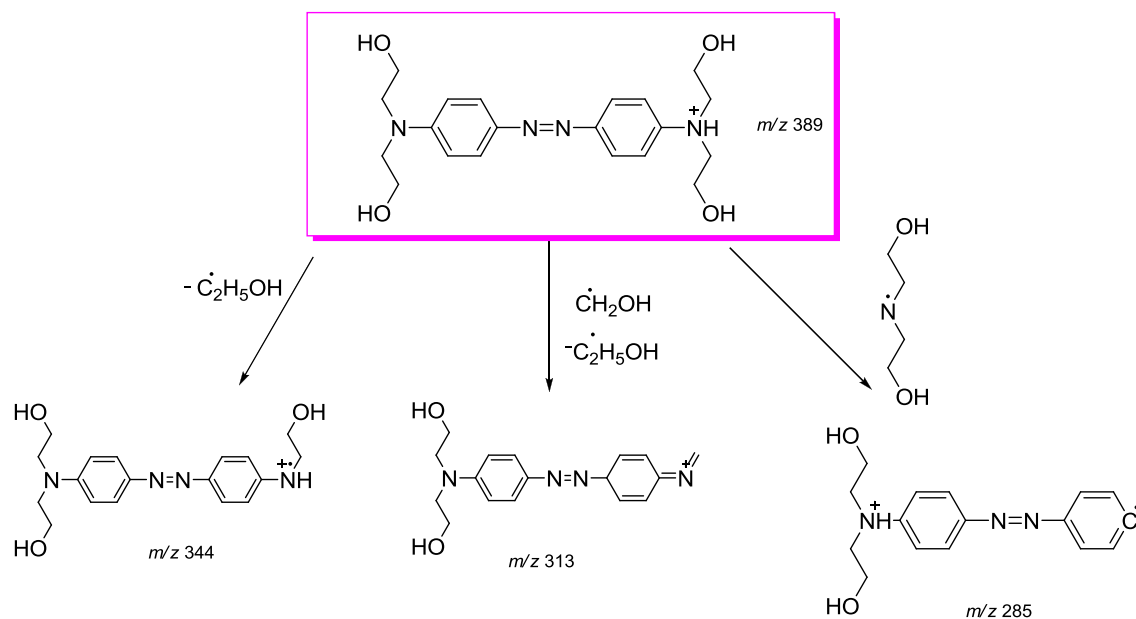


Figura 2.19 – Proposta de fragmentação para a espécie protonada m/z 389 do composto 3.

2.3.1.1.2. Monitorização das reações de oxidação por UV-Vis

As reações de oxidação enzimática das aminas aromáticas *N,N*-DEA e *N,N*-bOH-DA foram monitorizadas por espectroscopia de UV-Vis (200-900 nm), no decorrer de 24 horas, apresentando-se os espectros de absorção na Figura 2.20.

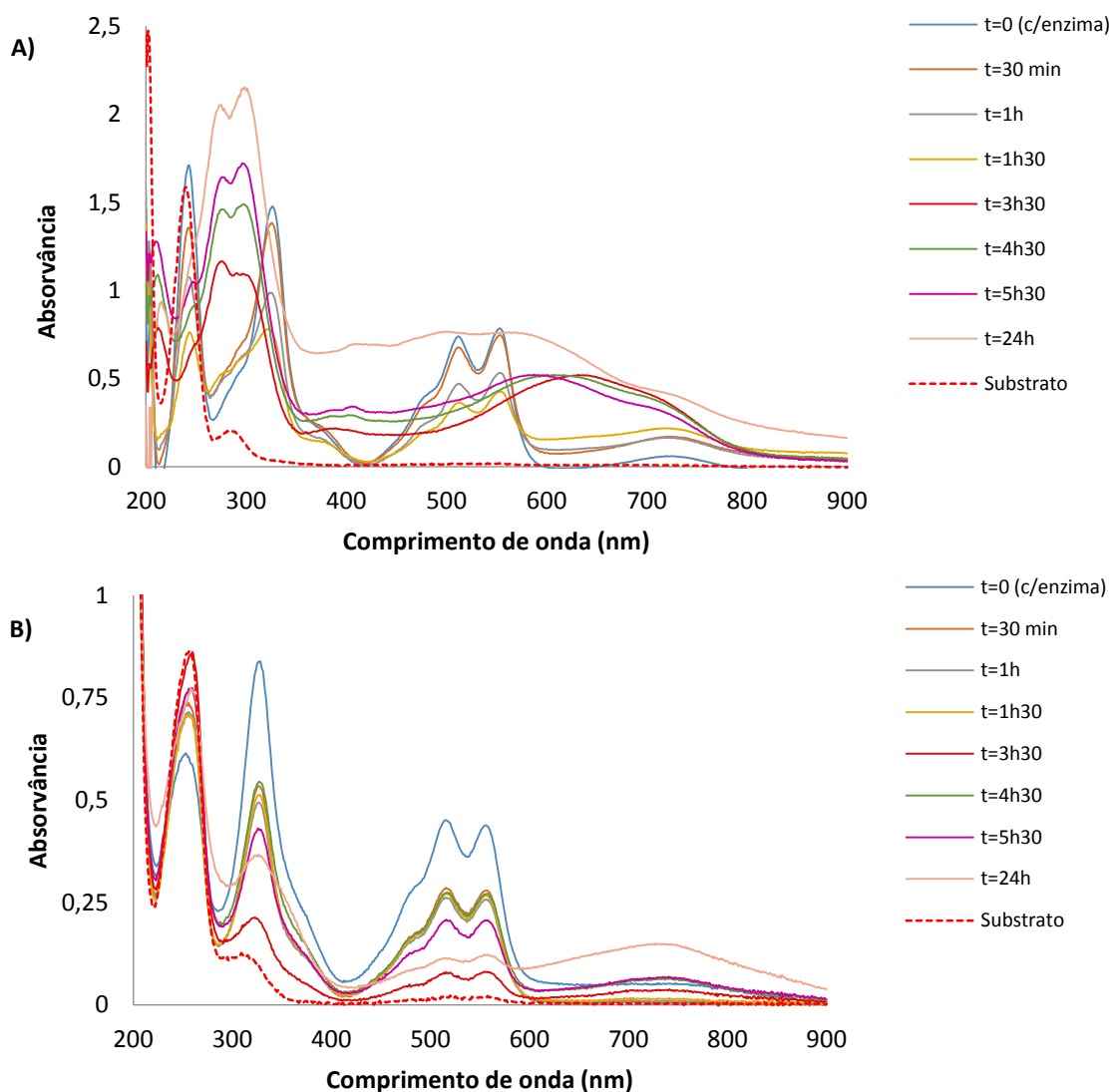


Figura 2.20 - Espectros de absorção UV-Vis das reações de oxidação de 1×10^{-4} M dos substratos **A)** *N,N*-DEA e **B)** *N,N*-bOH-DA, catalisadas por CotA-lacase no decorrer de 24h de reação.

A análise dos espectros mostra que no instante em que se procede à adição da enzima (instante $t=0$ com enzima) surgem três novas bandas para a reação com o substrato *N,N*-DEA (Figura 2.20-A), uma na região do UV (326 nm) e duas na região do visível caracterizadas pelos máximos a 512 nm e 554 nm, o que confirma que a enzima oxida o substrato. Para a reação de oxidação do substrato *N,N*-bOH-DA (Figura 2.20-B) também surgem três novas bandas no instante em que se procede à adição da enzima (instante $t=0$ com enzima), uma na região do UV (330 nm) e duas na região do visível caracterizadas pelos máximos a 521 nm e 560 nm, o que confirma que a enzima oxida o substrato.

Ao longo do tempo observou-se o decréscimo da absorvância destas bandas e o aparecimento de novas bandas na região do visível. Estas alterações estão de acordo com o observado na reação, uma vez que ao adicionar-se a CotA-lacase no meio reacional verificou-se que as reações adquiriram uma coloração rosa.

A reação com o substrato *N,N*-DEA (Figura 2.20-A) decorridas 24h apresenta uma cor roxa, resultante de um conjunto de bandas de absorção em toda a zona do visível.

Por sua vez a reação com o substrato *N,N*-bOH-DA (Figura 2.20-B) decorridas 24h apresenta uma cor azul-escura, resultante de uma banda de absorção a 734 nm.

2.3.1.2. Grupos substituintes -OCH₃, -OPh

As reações de oxidação enzimática das aminas aromáticas 4-MA e 4-PA, *para* substituídas com os grupos -OCH₃ e -OPh, respetivamente deram origem aos compostos **4**, **5**, **6** e **7** apresentados na Figura 2.21.

Na reação de oxidação da 4-MA verificou-se que o meio reacional adquiriu uma cor rosa clara imediatamente após a adição da enzima, e que esta se foi intensificando ao longo do tempo. Decorridas 24 h a mistura reacional apresentava-se com uma cor grená, com um ligeiro precipitado floculento em solução. Com base nos resultados obtidos pela monitorização por CCF conclui-se que se obteve mais do que um produto em reação, pelo que foi necessário proceder à sua separação de forma a se efetuar a sua caracterização estrutural. Assim, a mistura foi evaporada sob vácuo e o resíduo lavado com metanol e purificado por cromatografia preparativa. Obteve-se da reação de oxidação da amina aromática 4-MA a formação de um composto azo (**4**) e de um trímero (**5**) isolados com rendimentos de 53 e 46 %, respetivamente, de acordo com as estruturas apresentadas na Figura 2.21.

Na reação de oxidação da 4-PA verificou-se que ocorreram problemas de solubilidade do composto utilizando apenas 10 % de solvente orgânico, ou seja, utilizando o sistema etanol:tampão fosfato (1:9) e sempre que se iniciava a reação ocorria a precipitação do mesmo. De modo a contornar esta dificuldade, aumentou-se em pequenas quantidades o volume de solvente

continuando a manter assim a atividade da ação da enzima. Verificou-se que o composto 4-PA apenas solubilizou num volume de 3 mL de etanol e de 7 mL solução tampão. Procedeu-se desta forma à reação de oxidação e verificou-se que imediatamente após a inserção da enzima não houve qualquer alteração da cor. Após 24 h a mistura reacional encontrava-se acastanhada, com precipitado floculento em solução. Efetuou-se uma extração com acetato de etilo e verificou-se que o composto passa para a fase orgânica e procedeu-se à evaporação do solvente sob vácuo. Com base nos resultados obtidos pela monitorização por CCF conclui-se que se obteve mais do que um produto, porém devido ao problema de insolubilidade do substrato 4-PA a reação não foi completa pelo qual não foi possível purificar e conseqüentemente caracterizar por RMN. Na reação de oxidação do substrato 4-PA verificou-se a formação de mais de que um produto, sugerindo a formação do composto azo (**6**) e de um trímero (**7**), de forma idêntica ao que se verificou na oxidação do substrato 4-MA, tendo sido confirmados os resultados pelos espectros de massa, de acordo com as estruturas apresentadas na Figura 2.21.

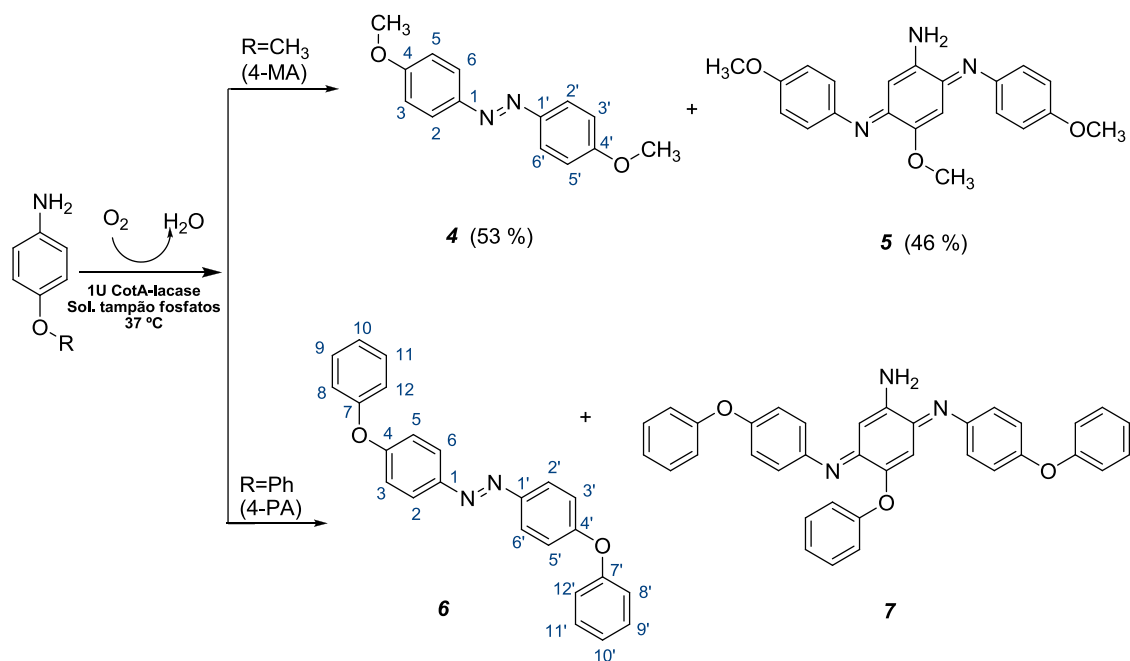


Figura 2.21 - Estruturas moleculares dos compostos obtidos nas reações de oxidação da 4-MA e da 4-PA catalisadas por CotA-lacase.

2.3.1.2.1. Caracterização estrutural dos compostos 4, 5, 6 e 7

No espectro de ^1H -RMN do composto **4** foi possível identificar dois dupletos na região dos prótons aromáticos ($\delta = 7,88$ e $7,08$ ppm) atribuídos a $\text{H}_{2,6,2',6'}$ e $\text{H}_{3,5,3',5'}$, respetivamente, e um singuleto a $\delta = 3,89$ ppm atribuído aos prótons metílicos. À semelhança do que foi anteriormente exposto para o caso dos compostos formados pela oxidação das aminas *N,N*-DA, *N,N*-DEA e *N,N*-bOH-DA, também no caso do composto **4** verificou-se um efeito de desblindagem dos prótons da estrutura do produto final, sendo que este efeito é mais acentuado nos prótons mais próximos da ligação dupla ($\text{H}_{2,6}$ e $\text{H}_{2',6'}$), de acordo com os dados apresentados na Tabela 2.6. No espectro de ^{13}C -RMN destaca-se o sinal de frequência mais elevada ($\delta = 162,8$ ppm) atribuído às ressonâncias $\text{C}_{1,1'}$, os mais desblindados pelo efeito de proximidade à ligação dupla $-\text{N}=\text{N}-$ e o sinal de frequência mais baixa ($\delta = 55,7$ ppm) característica do grupo metilo. Os dados de espectroscopia de RMN do substrato 4-MA e do respetivo composto azo **4** apresentam-se na Tabela 2.6.

Tabela 2.6 - Dados de espectroscopia de ^1H e ^{13}C -RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) para o par substrato/composto azo: 4-MA/composto **4**.

Posição	4-MA	Composto azo 4	
	^1H (δ , m, J)	^1H (δ , m, J)	^{13}C (δ)
1	-	-	147,8
2,6	6,60 (d, 2H, 8,9Hz)	7,88 (d, 4H, 8,8Hz)	125,3
3,5	6,67 (d, 2H, 8,9Hz)	7,09 (d, 4H, 8,8Hz)	115,1
4	-	-	162,8
NH_2	4,41 (sl, 2H)	-	-
CH_3	3,71 (s, 3H)	3,90 (s, 6H)	55,7

A estrutura do composto **4** foi corroborada por espectrometria de massa com ESI no modo positivo. Foi possível identificar no espectro de *full scan* a molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 243 que corresponde a um composto com $\text{MM}=242$ g/mol. A espécie protonada foi dissociada, espectro MS^2 , e originou dois iões radicalares a m/z 228 e 136 formados pela perda dos radicais $\cdot\text{CH}_3$ e $\cdot\text{C}_7\text{H}_7\text{O}$. Foi ainda possível detetar a presença do ião a m/z 215 gerado a partir

da perda de N_2 característica da presença da ligação azo. Na Figura 2.22 apresenta-se o espectro MS^2 e o esquema de fragmentação proposto.

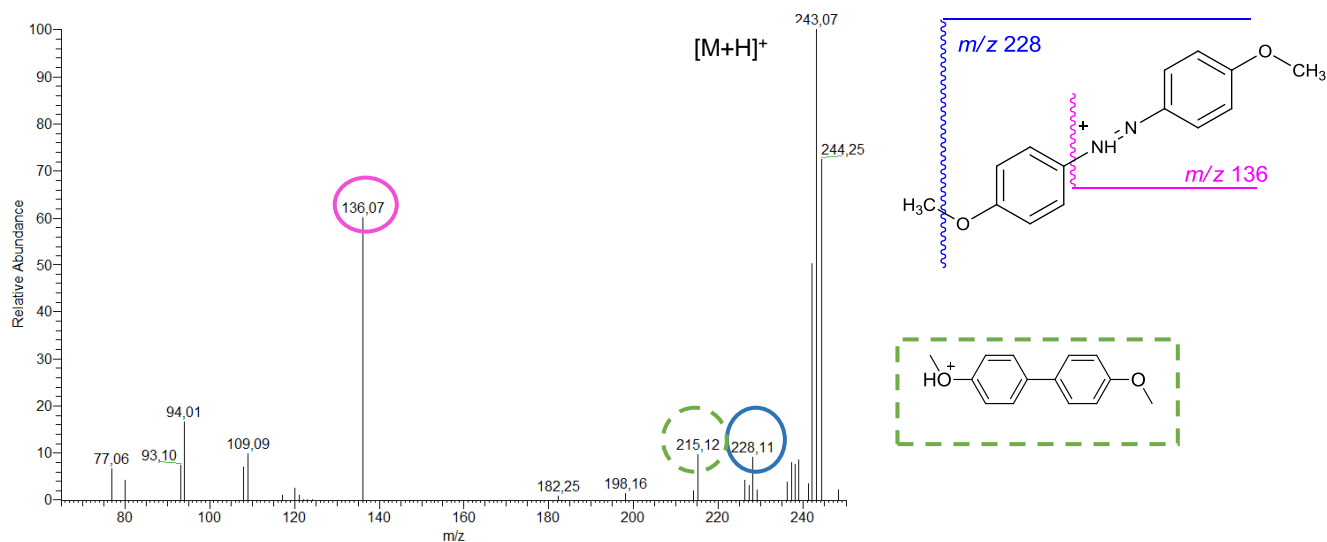


Figura 2.22- Espectro ESI(+)-MS² da molécula protonada m/z 243 do composto **4** e respetiva proposta de fragmentação.

A estrutura do composto **5** foi proposta por espetrometria de massa com ESI no modo positivo. Foi possível identificar no espectro de *full scan* (Figura 2.23-A) a molécula protonada $[M+H]^+$ a m/z 364 que corresponde a um composto com MM = 363 g/mol. A espécie protonada foi dissociada, espectro MS² (Figura 2.23-B), e originou dois iões radiculares a m/z 349 e 333 formados pela perda dos radicais $\cdot CH_3$ e $\cdot OCH_3$, respetivamente, e um terceiro fragmento a m/z 318 gerado pela perda de $\cdot CH_3 + \cdot OCH_3$. A proposta de fragmentação apresenta-se na Figura 2.23-C). No caso do composto **5** o seu espectro de ¹H-RMN não se mostrou preceptível pelo que a sua estrutura foi proposta com base nos resultados obtidos por Sousa *et al.*^{11,78} em reações semelhantes e suportada pelos dados obtidos por espetrometria de massa com ESI em modo positivo.

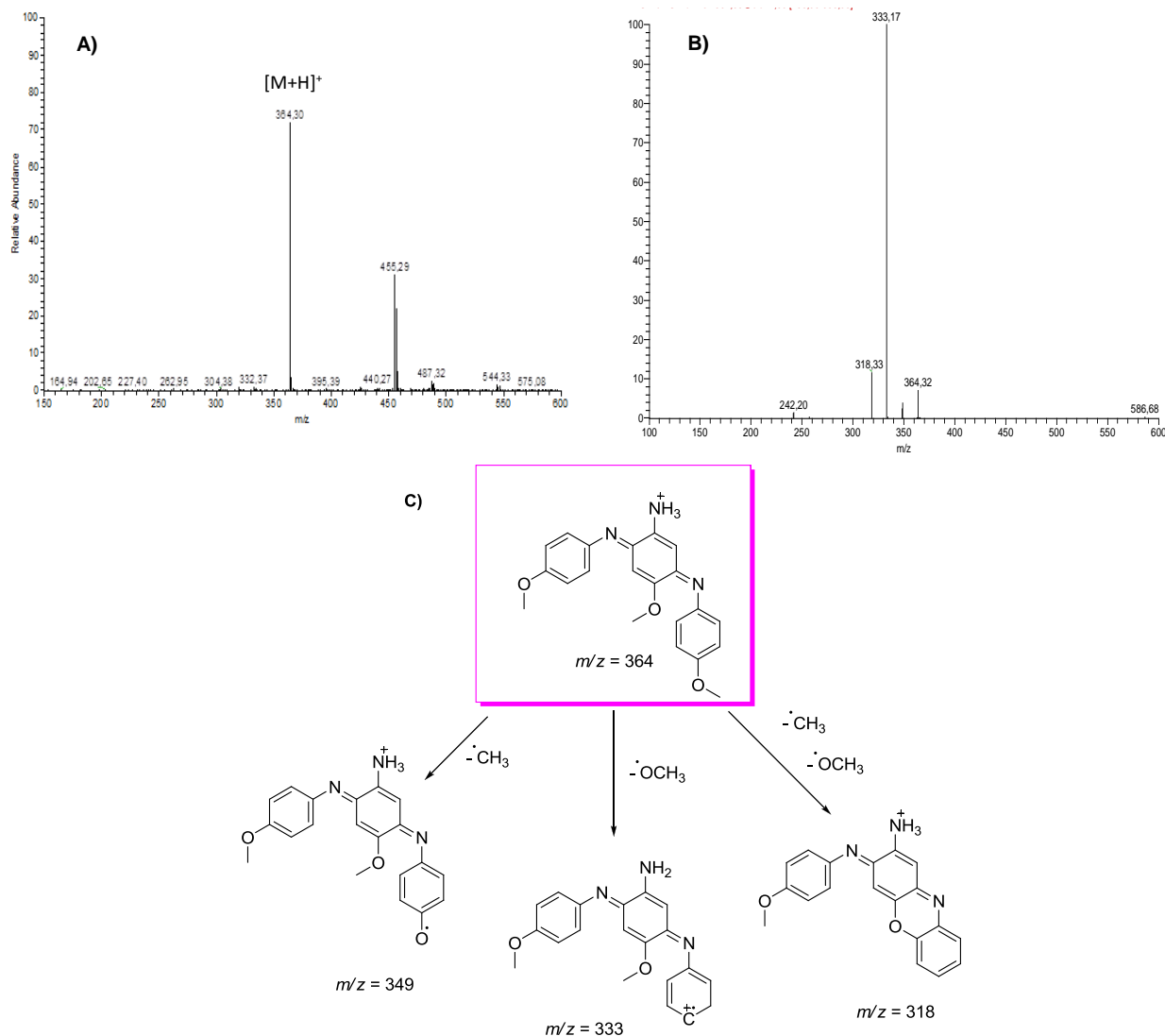


Figura 2.23- A) Espectro ESI(+)-MS do composto **5**, **B)** Espectro ESI(+)-MS² da molécula protonada m/z 364 do composto **5**, **C)** Proposta de fragmentação.

A estrutura do composto **6** é proposta com recurso aos dados obtidos por espectrometria de massa. O respetivo espectro de ESI-MS em modo positivo apresenta o sinal a m/z 367 correspondente à molécula protonada [M+H]⁺, coerente com a presença de um composto com MM = 366 g/mol. De acordo com a estrutura do substrato 4-PA e com base nos resultados já apresentados para o substrato 4-MA admite-se que, também neste caso, se forme o respetivo composto azo **6**, pela reação de oxidação enzimática com CotA-lacase. No espectro MS², Figura 2.24-B) observa-se um ião a m/z 339 gerado a partir da perda de N₂ característica da ligação azo. Ocorre a formação de um ião radicalar a m/z 290 que corresponde à perda do radical [•]C₆H₆ e três

iões a m/z 273, 197 e 169 gerados pela perda de C_6H_5OH , $C_{12}H_{10}O$ e $N_2C_{12}H_{10}O$, respectivamente, coerentes com a proposta de fragmentação apresentada na Figura 2.25.

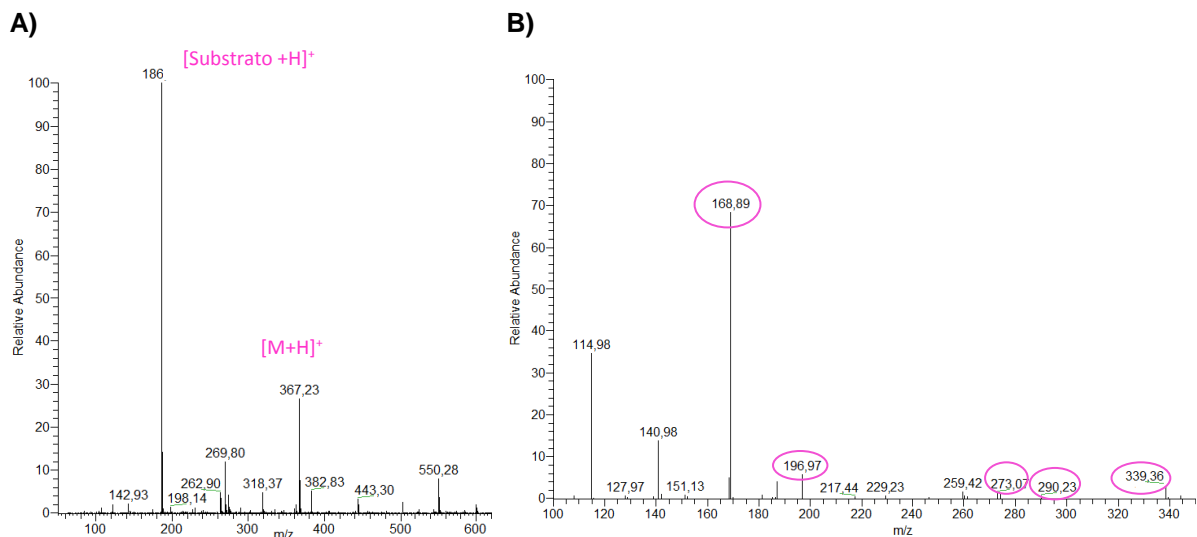


Figura 2.24 - Detalhes dos espectros de ESI-MS em modo positivo **A)** MS do composto **6** e **B)** MS² do ião m/z 367.

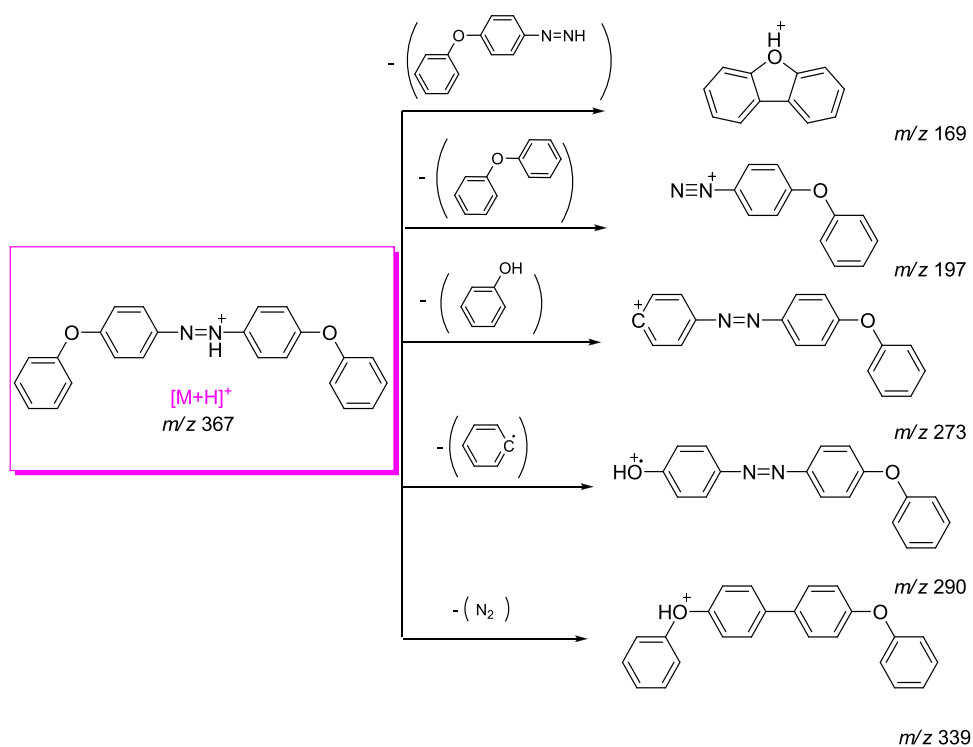


Figura 2.25 - Proposta de fragmentação para o ião m/z 367 do composto **6**.

A estrutura do composto **7** foi proposta com base nos dados obtidos por espectrometria de massa e também baseada no conhecimento anterior das estruturas triméricas. A análise do espectro de ESI-MS em modo positivo apresenta o sinal a m/z 550, coerente com a presença de um composto com $MM = 549$ g/mol. A espécie protonada a m/z 550 do composto **7** foi dissociada (espectro MS^2 na Figura 2.26) e originou dois íons fragmento a m/z 457 e 381, gerados por perda de C_6H_5O e $C_{12}H_9O$, respectivamente.

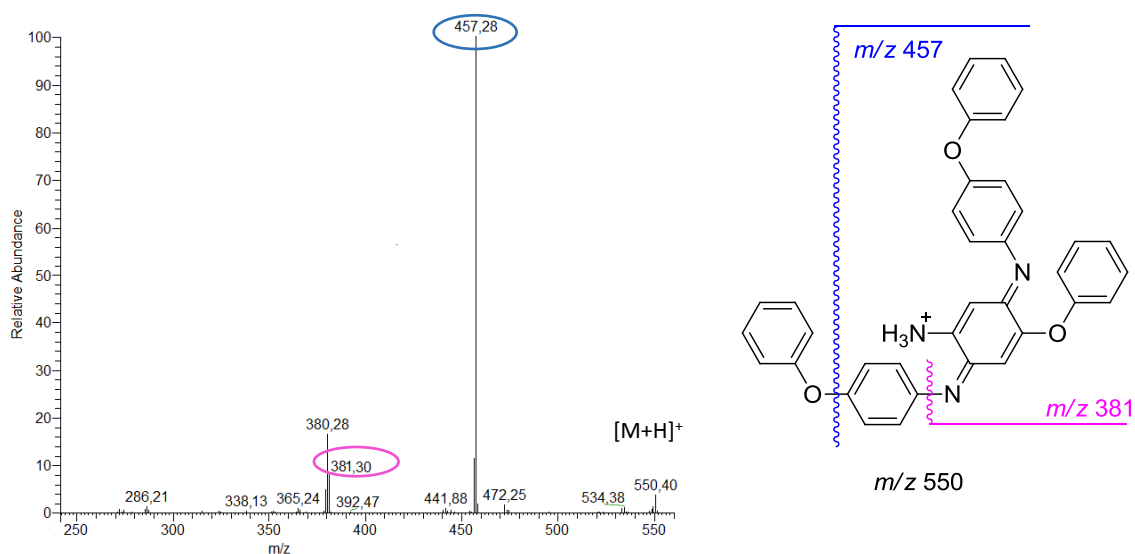


Figura 2.26 - Espectro MS^2 do íon m/z 550 e respetiva proposta de fragmentação para o íon m/z 550 do composto **7**.

2.3.1.2.2. Monitorização da reação de oxidação por UV-Vis

A reação de oxidação enzimática da amina aromática 4-MA foi monitorizada por espectroscopia de UV-Vis (200-900 nm), no decorrer de 24 horas, apresentando-se os espectros de absorção na Figura 2.27.

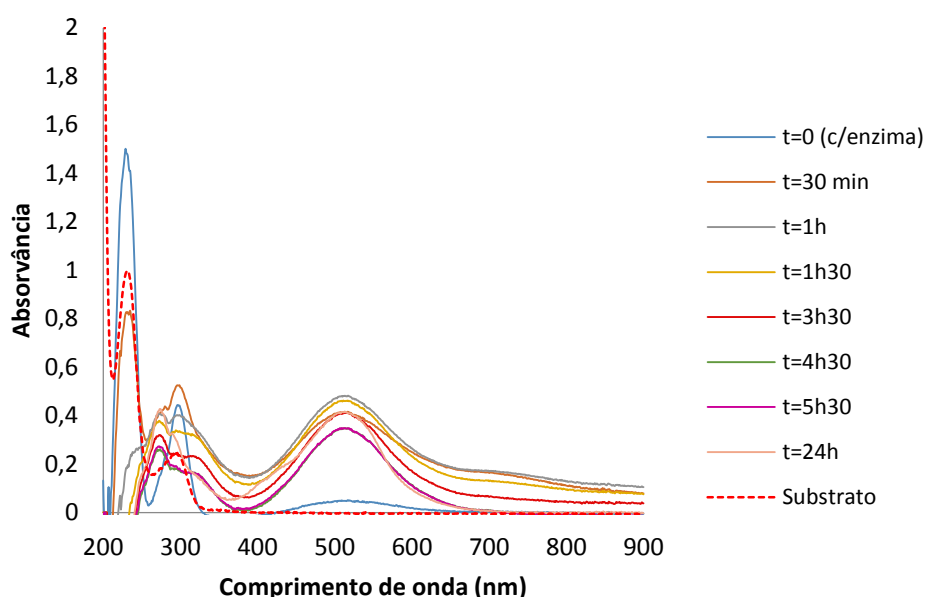


Figura 2.27 - Espectros de absorção UV-Vis da reação de oxidação com CotA-lacase 3×10^{-4} M do substrato 4-MA.

O substrato apresenta duas bandas a 232 nm e 296 nm características das transições $\pi-\pi^*$ do anel aromático. Após adição da enzima observa-se o aparecimento de uma banda de absorção larga com um máximo a 520 nm. Esta cor foi-se intensificando ao longo do tempo reacional, pelo que se verifica um aumento da absorvância nesta zona do visível. Após 24h de reação, o composto apresentava uma cor grená.

2.3.1.3. Grupos substituintes $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{Cl}$, $-\text{SO}_3\text{H}$ e $-\text{SO}_2\text{NH}_2$

As reações de oxidação das aminas aromáticas 4-EA e 4-CIA foram realizadas utilizando o sistema catalítico CotA-lacase/ABTS, devido aos elevados valores de potencial de oxidação dos substratos (1,27 V e 1,12 V, respetivamente) e deram origem aos compostos **8** e **9**, respetivamente, de acordo com a Figura 2.28.

Em ambas as reações de oxidação verificou-se que o meio reacional adquiriu uma cor verde, devido à oxidação enzimática do ABTS, imediatamente após a adição da enzima. Com o decorrer do tempo a cor verde foi

desaparecendo em ambas as reações, sendo mais rápido no caso da oxidação da 4-EA (após 30 minutos). Decorridas 24 h ambas as reações encontravam-se castanhas sem precipitado em solução. Efetuou-se uma extração com acetato de etilo e os compostos **8** e **9** foram isolados como sólidos laranja-escuro e vermelho, com rendimentos de 76 e 78 %, respetivamente (Figura 2.28).

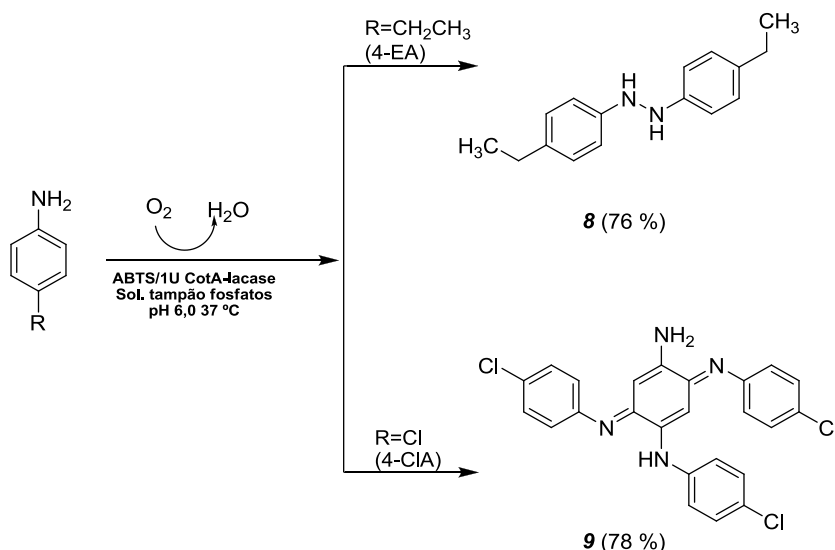
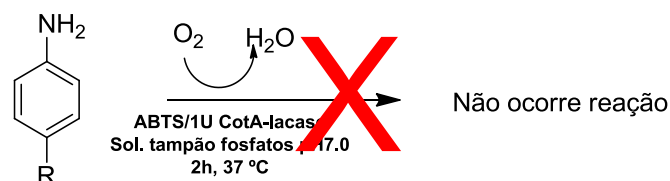


Figura 2.28 - Estruturas moleculares propostas para os compostos obtidos nas reações de oxidação do 4-EA E 4-CIA catalisada por CotA-lacase/ABTS.

Para a oxidação das aminas aromáticas 4-ABSA e 4-SA verificou-se que, de acordo com o ocorrido nas reações de *screening*, não ocorreu oxidação com nenhum dos sistemas catalíticos nas reações de aumento de escala (Figura 2.29). Os substratos 4-ABSA e 4-SA possuem grupos desactivadores do anel aromático, motivo pelo qual apresentam elevados valores de potenciais de oxidação, 1,18 V e 1,12 V, respetivamente. Esta situação origina um deslocamento da densidade eletrónica do átomo de azoto, indisponibilizando o par eletrónico para a oxidação enzimática.



R = SO₃H

R = SO₂NH₂

Figura 2.29 – Esquema reacional dos substratos 4-ABSA e 4-SA nos sistemas catalíticos (CotA-lacase e CotA-lacase/ABTS).

2.3.1.3.1. Caracterização estrutural dos compostos 8 e 9

Também nesta situação, as estruturas propostas para os produtos **8** e **9** obtidos na oxidação através do sistema catalítico CotA-lacase/ABTS, das aminas aromáticas 4-EA e 4-CIA respectivamente, assenta na análise conjunta das propostas apresentadas na literatura e nos dados obtidos por espectrometria de massa.⁷⁸

Efetivamente, e apesar das várias tentativas efetuadas, não foi possível obter espectros de ¹H-RMN, dos produtos finais, bem definidos e claros que permitissem a atribuição das estruturas sem qualquer dúvida. Ainda assim é possível verificar por comparação com os espectros dos respetivos materiais de partida, que os sinais dos produtos formados surgem a frequências diferentes daquelas que caracterizam os substratos.

A análise do espectro de massa (*full scan*), obtido por ESI em modo positivo apresenta para o composto **8** um pico a *m/z* 241 correspondente à molécula protonada [M+H]⁺ de um composto com MM de 240 g/mol. A espécie protonada foi dissociada (espectro MS² - Figura 2.30.B) e originou iões a *m/z* 212, 196, 135 e 121 correspondentes à fragmentação proposta na Figura 2.31.

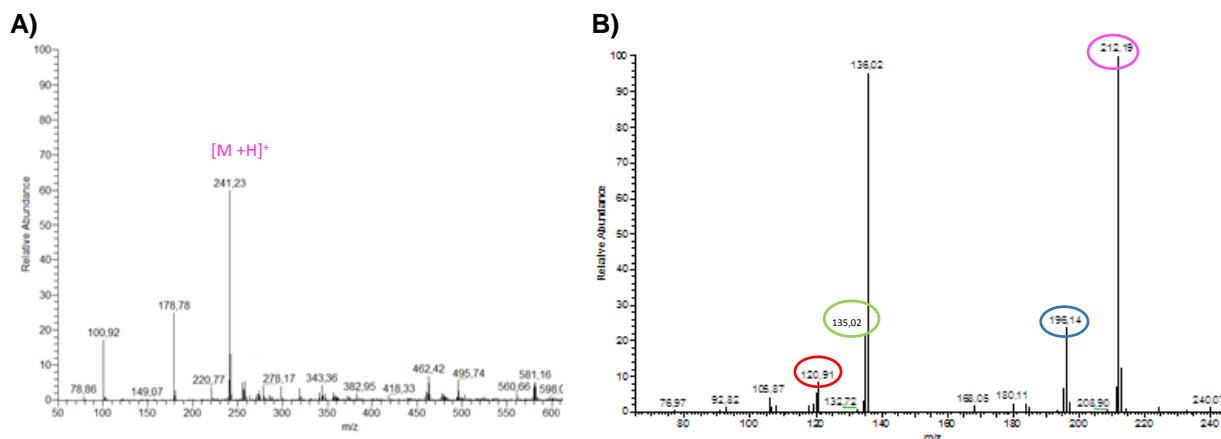


Figura 2.30 - Detalhes dos espectros de ESI-MS em modo positivo A) MS do composto **8** e B) MS² do ião m/z 241.

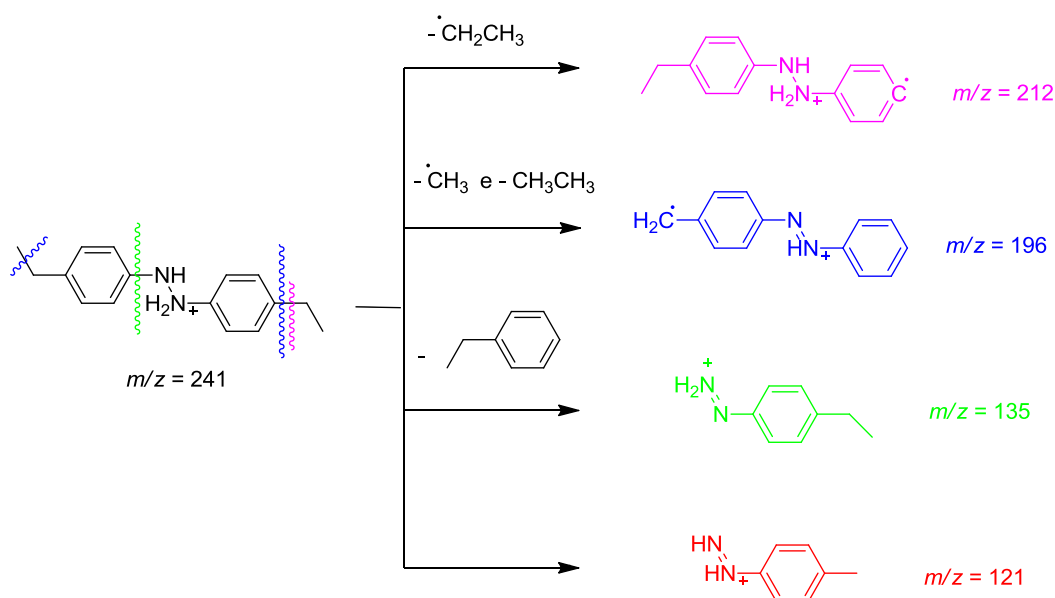


Figura 2.31 - Proposta de fragmentação para o ião m/z 241 do composto **8**.

Para o composto **9**, o espectro de massa (*full scan*) cujo detalhe se apresenta na Figura 2.32, apresenta dois sinais importantes a m/z 467 e 489, ambos com um padrão de 27:27:9:1, com intervalos de duas unidades de massa entre eles, indicando a presença de 3 átomos de cloro na molécula. Com base na análise destes resultados e de acordo com os trabalhos anteriormente publicados por Sousa *et al.*¹¹ é proposta a formação de um trímico com estrutura do composto **9**, apresentada na Figura 2.28.

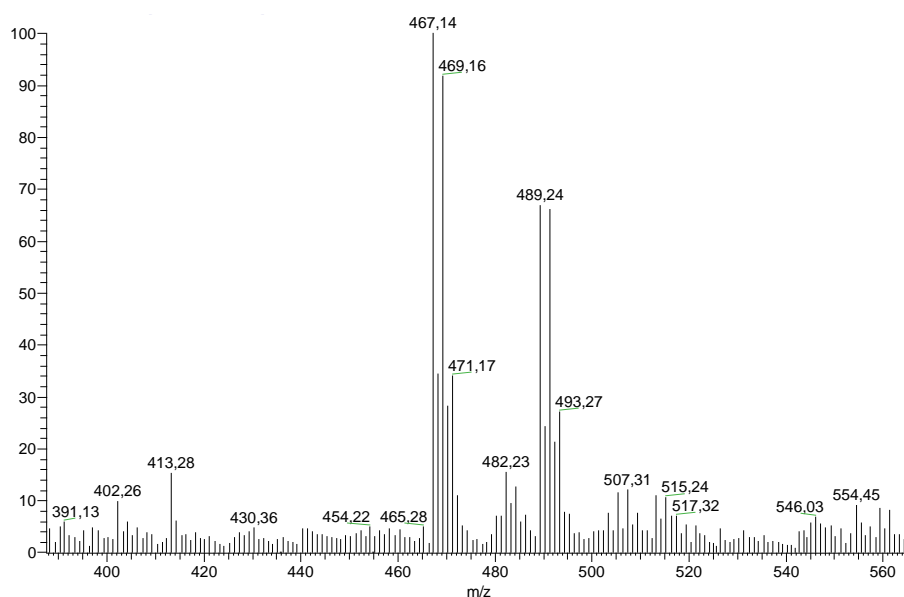


Figura 2.32- Detalhes dos espectros de ESI-MS em modo positivo do composto **9**

2.3.2. Oxidação de aminas *orto*, *para*-disubstituídas

A oxidação das aminas aromáticas 4-NPDA e 3,4-DABN ocorreu com os sistemas catalíticos CotA-lacase/ABTS e CotA-lacase, respetivamente. Apesar dos substratos apresentarem valores muito semelhantes de potenciais de oxidação, 0,89 V (4-NPDA) e 0,83 V (3,4-DABN), verifica-se que a amina aromática 4-NPDA é constituída por um grupo desactivador forte (-NO₂) enquanto que a amina 3,4-DABN possui na sua estrutura um grupo desactivador moderado (-CN). Este facto pode justificar a diferença no sistema catalítico a utilizar.

Na oxidação da 4-NPDA, a análise dos resultados obtidos na monitorização por CCF permitiu verificar que mesmo com o sistema catalítico combinado CotA-lacase/ABTS não é possível promover a oxidação completa do substrato (período de estudo de 72 h). A monitorização permitiu observar que após 2 h já se tinha formado um produto amarelo que depois de isolado (68 %) verificou tratar-se do composto azo **10**, apresentado na Figura 2.33.

Na oxidação da 3,4-DABN, verificou-se que todo o substrato se transformou após 2 h de reação. Isolou-se um precipitado vermelho que depois de purificado deu origem a um produto amarelo-escuro com um rendimento de 49 % que corresponde ao composto azo **11**, apresentado na Figura 2.33. Para

o segundo produto, isolado como um sólido vermelho na purificação em coluna, os dados obtidos através das técnicas de caracterização utilizadas não permitiram propor uma estrutura.

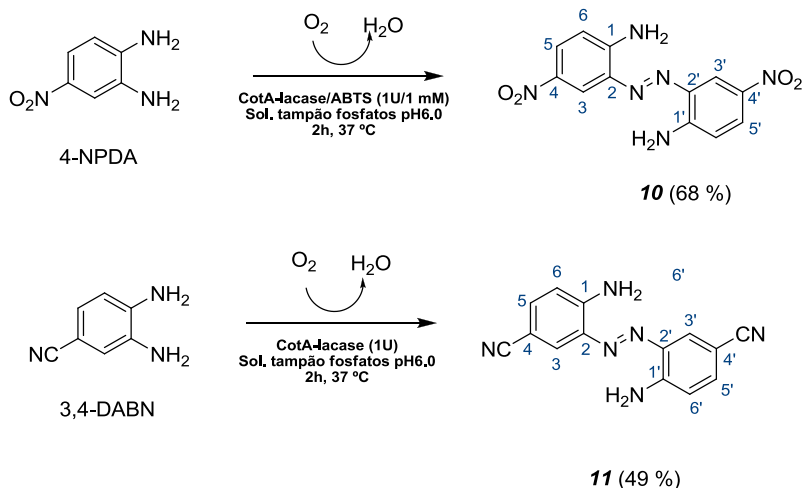


Figura 2.33 - Estruturas moleculares dos compostos obtidos nas reações de oxidação do 4-NPDA e 3,4-DABN catalisada por CotA-lacase/ABTS e CotA-lacase, respectivamente.

2.3.2.1. Caracterização estrutural dos compostos **10** e **11**

Ao efetuar-se a comparação dos espectros de ^1H -RMN obtidos para o substrato 3,4-DABN e respectivo produto azo **11** (Figura 2.34), observa-se um efeito de desblindagem dos prótons da estrutura do produto final, o que leva a sugerir a presença da ligação dupla entre os átomos de azoto (-N=N-). Verifica-se que este efeito é mais acentuado nos prótons H_3 e $\text{H}_{3'}$ observado pelo deslocamento para frequências mais elevadas do singuleto que os caracteriza. Confirmou-se de uma forma idêntica um efeito de desblindagem dos prótons da estrutura do produto **10**, de acordo com os dados apresentados na Tabela 2.7, o que leva a sugerir também a formação da ligação dupla neste composto.

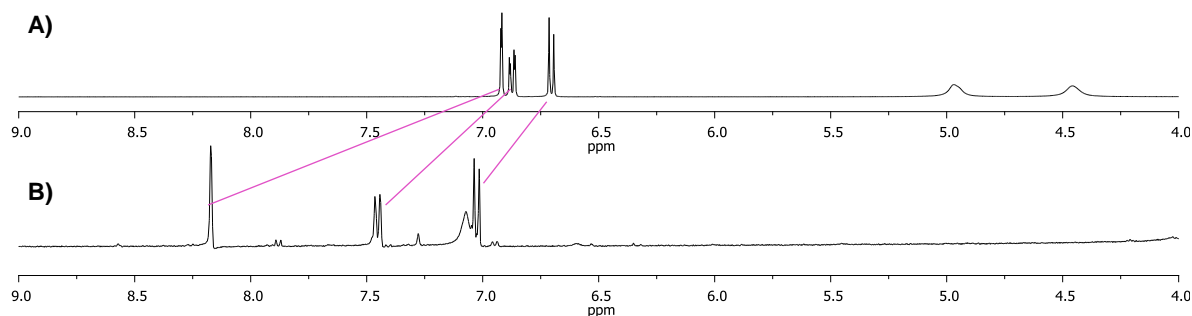


Figura 2.34 - Espectros de ^1H -RMN em Acetona- d_6 (400MHz); **A)** do precursor 3,4-DABN; **B)** do composto **11**.

Tabela 2.7 - Dados de espectroscopia de ^1H RMN (Acetona- d_6) para os pares substrato/composto azo: 3,4-DABN /composto **11** e 4-NPDA /composto **10**

Posição	4-NPDA	Composto azo 10
	^1H (δ , m, J)	^1H (δ , m, J)
1	-	-
2	-	-
3	7,57 (s, 1H)	8,65 (s, 2H)
4	-	-
5	7,51 (d, 1H, 8,0Hz)	8,07 (d, 2H, 9,2Hz)
6	6,69 (d, 1H, 8,0Hz)	7,06 (d, 2H, 9,2Hz)
NH ₂	4,59 (sl, 2H)	---
NH ₂	5,50 (sl, 2H)	---
Posição	3,4-DABN	Composto azo 11
	^1H (δ , m, J)	^1H (δ , m, J)
1	-	-
2	-	-
3	6,91 (s, 1H)	8,12 (s,2H)
4	-	-
5	6,87 (d, 1H, 8,0Hz)	7,45 (d, 2H, 8,8Hz)
6	6,70 (d, 1H, 8,0Hz)	7,02 (d, 2H, 8,8Hz)
NH ₂	4,97 (sl, 2H)	---
NH ₂	4,46 (sl, 2H)	---

Os dados obtidos por espectrometria de massa comprovam ambas as estruturas propostas. Ambos os espectros de *full scan* em modo negativo apresentam o pico base a m/z 301 e 261 correspondentes às moléculas desprotonadas $[\text{M}-\text{H}]^-$ dos compostos **10** e **11**, respetivamente. A fragmentação de ambas as espécies revelou o mesmo padrão e observou-se que os iões gerados resultaram da perda de 28 unidades de massa (m/z 273 e m/z 233) característica de compostos azo.

2.3.3. Oxidação de compostos aromáticos policíclicos

2.3.3.1. Oxidação dos derivados de naftaleno

As reações de aumento de escala de oxidação dos derivados de naftaleno 1-NA e 5-ANSA foram realizadas com o sistema catalítico CotA-lacase/ABTS.

Para o 1-NA verificou-se que o meio reacional adquiriu uma cor arroxeada imediatamente após a adição da enzima, e que esta se foi intensificando ao longo do tempo. Decorridas 24 h a mistura reacional apresentava-se com uma cor roxa, sem precipitado em solução. Com base nos resultados obtidos pela monitorização por CCF conclui-se que se obteve mais do que um produto, pelo que foi necessário proceder à sua separação. A mistura foi evaporada sob vácuo e o resíduo lavado com metanol e purificado por cromatografia em coluna. Isolaram-se duas frações, uma que apresentava uma cor grená e outra cor rosa clara.

Para os produtos isolados da oxidação da 1-NA, os espectros de ^1H -RMN obtidos revelaram-se muito complexos, com múltiplos sinais na região dos prótons aromáticos, sugerindo que a purificação não foi eficaz. Pelo que, as estruturas propostas na Figura 2.35 tem como base os dados obtidos pela análise dos dados obtidos por espectrometria de massa.

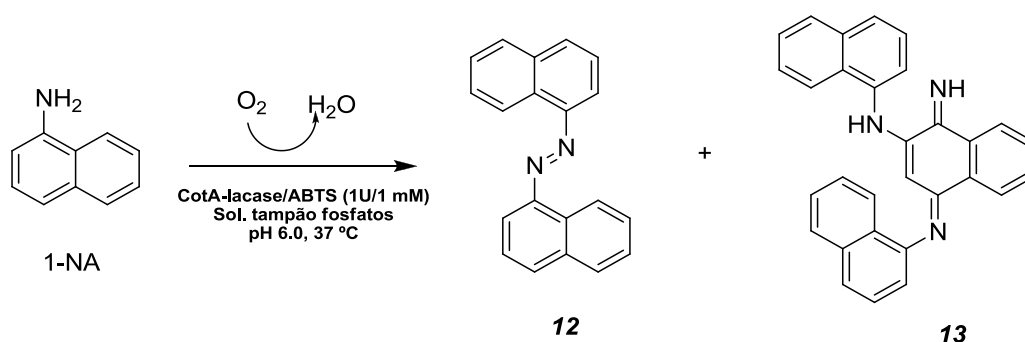


Figura 2.35 - Estruturas propostas para os produtos **12** e **13** obtidos pela oxidação do 1-NA catalisada por CotA-lacase/ABTS.

O espectro de *full scan* (Figura 2.36) em modo positivo apresenta os pico a m/z 283 e 424 correspondentes às moléculas protonadas $[M+H]^+$ dos compostos **12** e **13**, respetivamente. A fragmentação da espécie a m/z 283 deu origem ao ião fragmento a m/z 255 devido à perda de N_2 que resulta na perda da ligação $-N=N-$ característica dos compostos azo, confirmando assim a sua presença na estrutura.

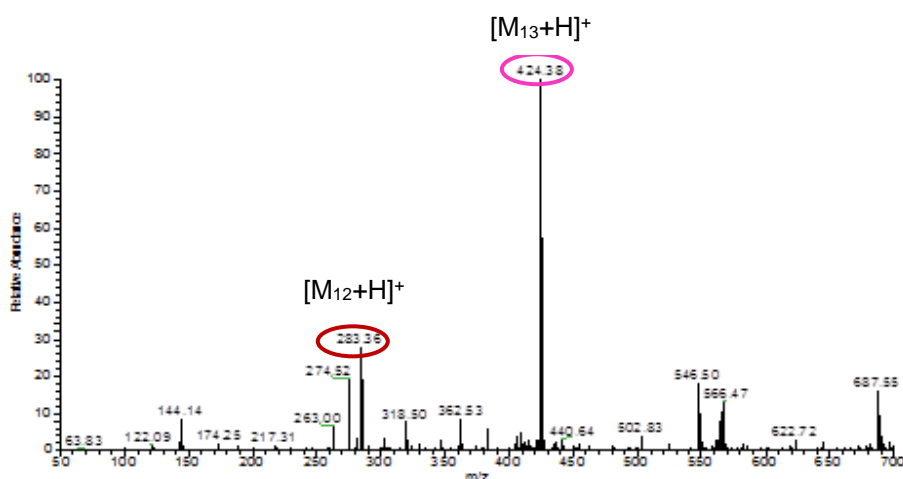


Figura 2.36- Espectro ESI-MS em modo do meio reacional da oxidação do 1-NA.

Para o 5-ANSA verificou-se que o meio reacional adquiriu uma cor roxa azulada imediatamente após a adição da enzima. Ao longo do tempo a mistura foi adquirindo uma cor cada vez mais roxa, perdendo a sua tonalidade azulada. Decorridas 24 h a mistura reacional apresentava-se com uma cor roxa, sem precipitado em solução. A mistura foi evaporada sob vácuo e o resíduo lavado com metanol e purificado por cromatografia preparativa. Isolaram-se duas frações, uma cor que apresentava uma cor violeta e outra cor rosa avermelhado. Relativamente aos produtos obtidos na reação de oxidação do 5-ANSA, a análise dos dados foram inconclusivos o que não permitiu propor qualquer tipo de estrutura dos compostos obtidos.

2.3.3.2. Oxidação do derivado de quinolina (8-amino-quinolina)

A reação de aumento de escala de oxidação do derivado de quinolina 8-AQA foi realizada com o sistema catalítico CotA-lacase/ABTS.

Verificou-se que nos primeiros minutos de reação após a adição da enzima, o meio reacional adquiriu uma cor rosa avermelhada que se foi intensificando ao longo do tempo. Depois de 30 minutos, a mistura apresentava uma cor vermelha acastanha e decorridas 24 h apresentava-se transparente com um precipitado roxo em solução. A monitorização por CCF permitiu verificar que a oxidação não foi completa e o produto foi isolado por filtração como um sólido roxo. O sólido mostrou-se pouco solúvel em metanol e insolúvel em acetona, acetato de etilo e H₂O, o que impossibilitou a sua caracterização por RMN.

Neste caso a estrutura proposta (Figura 2.37) tem como base os dados obtidos por espectrometria de massa.

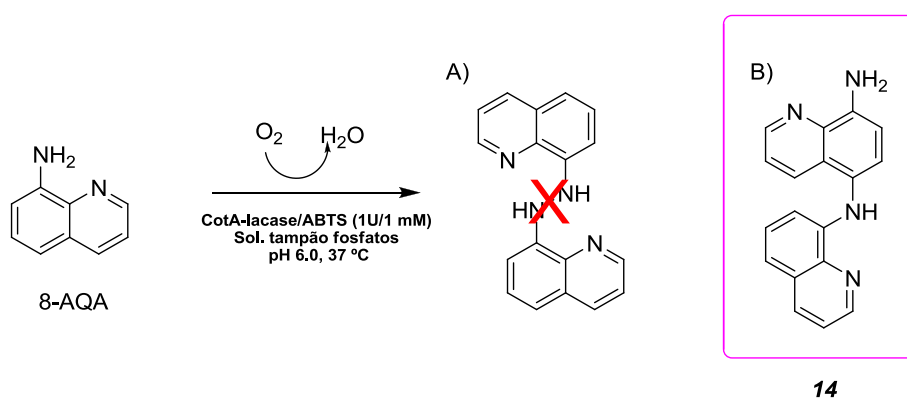


Figura 2.37- Estrutura proposta para os produtos **14** obtido pela oxidação do 8-AQA catalisada por CotA-lacase/ABTS.

A análise do espectro de *full scan* em modo positivo, apresentado na Figura 2.38-A) apresenta como pico base o sinal a m/z 145 correspondente à molécula protonada $[M+H]^+$ do 8-AQA e o pico a m/z 287 que se propõem corresponder à espécie protonada $[M+H]^+$ da estrutura do composto **14** da Figura 2.37. Esta hipótese colocou-se pois a fragmentação desta espécie

resulta na perda de 17 unidades de massa, correspondente à perda da molécula NH_3 , dando origem à espécie com m/z 270, conforme espectro MS^2 (Figura 2.38-B).

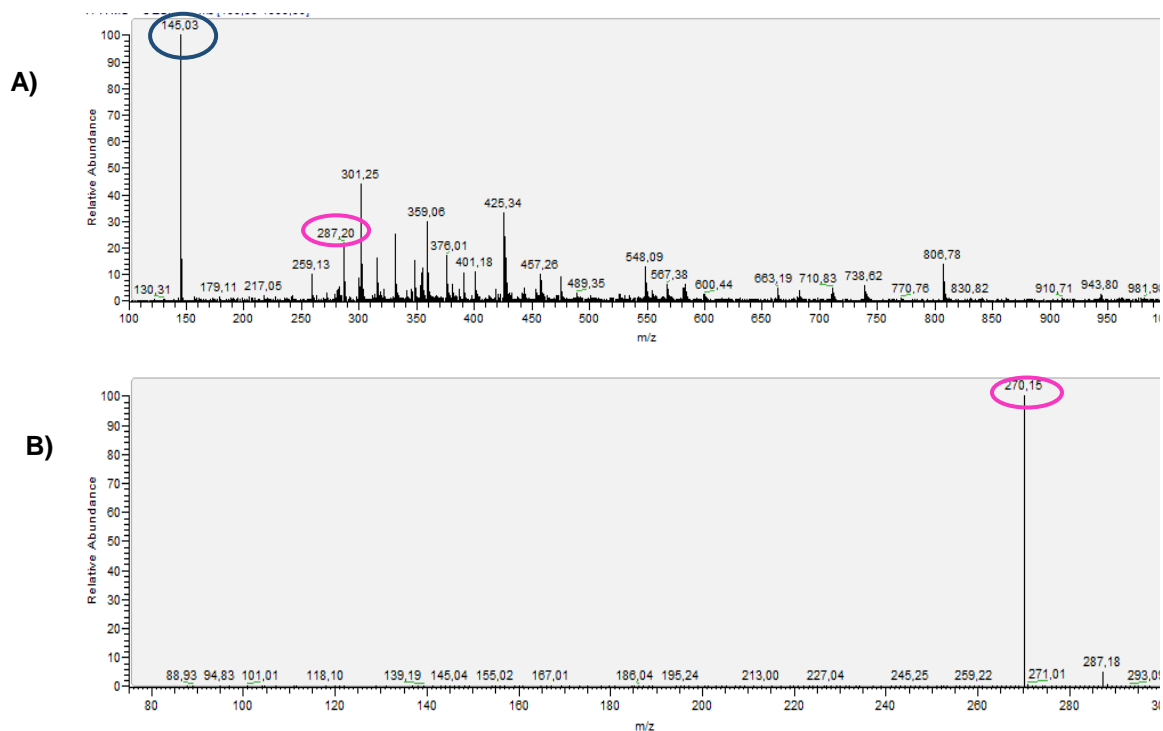


Figura 2.38 - Espectro ESI-MS em modo positivo; **A)** do composto **14**; **B)** MS^2 da espécie m/z 287.

2.3.4. Oxidação de compostos heteroaromáticos

As reações de aumento de escala dos compostos heteroaromáticos estudados só foram realizadas para as piridinas 2,3-DAPA e 3-APA, de acordo com os resultados obtidos no rastreio inicial e ambas as reações foram realizadas com o sistema catalítico CotA-lacase/ABTS.

Na oxidação da 2,3-DAPA verificou-se que o meio reacional adquiriu uma cor laranja, imediatamente após a adição da enzima, que se foi intensificando ao longo do tempo. Decorridas 24 h a mistura reacional apresentava-se com uma cor laranja escura, sem precipitado em solução. Efetuou-se uma extração com acetato de etilo e verificou-se que o composto passa para a fase orgânica, separando-se assim do ABTS. De seguida, evaporou-se sob vácuo.

Na oxidação da 3-APA verificou-se que o meio reacional adquiriu uma cor roxa imediatamente após a adição da enzima. Decorridas 24 h a mistura reacional continuava a apresentar uma cor roxa, sem precipitado em solução. Evaporou-se sob vácuo.

Através da monitorização por CCF verificou-se que as reações foram bastante incompletas, pelo que não foi possível obter quantidade suficiente de produto que permitisse a sua caracterização estrutural por RMN.

2.3.5. Reação de acoplamento heteromolecular

Com o objetivo de testar a CotA-lacase como catalisador de reações de acoplamento heteromolecular dando origem a corantes comerciais, efetuou-se a reação partindo das aminas aromáticas 4-amino-acetanilida (4-AA) e 2-amino-*p*-cresol (2-A-*p*-cresol). Realizou-se a reação de acoplamento heteromolecular esquematizada na Figura 2.39, utilizando a CotA-lacase como catalisador.

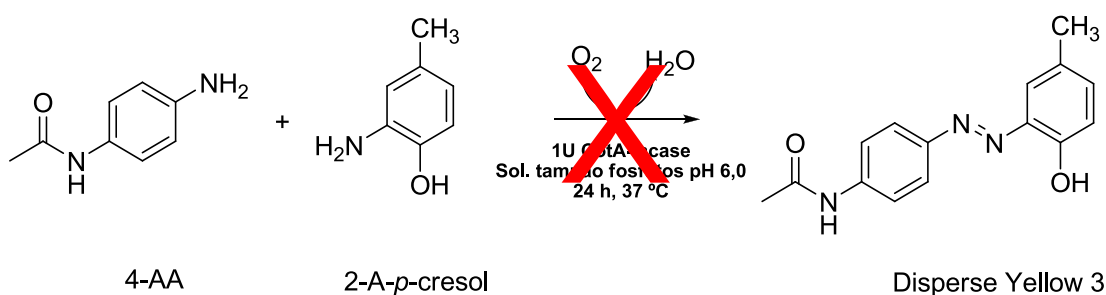


Figura 2.39 – Esquema reacional proposto para a formação do Disperse Yellow 3 catalisado por CotA-lacase

A mistura reacional apresentava uma cor amarela, porém decorridas 24h a cor mantinha-se a mesma e pela análise das placas de CCF verificou-se que existia presença de 4-aminoacetanilida por reagir. A mistura foi evaporada sob vácuo e o resíduo lavado com metanol e purificado por cromatografia preparativa que permitiu separar duas frações, um amarela e outra castanha. Verificou-se que, apesar da formação de um composto intensamente amarelo,

este não correspondia ao corante Disperse Yellow 3 esperado uma vez que a distância percorrida na placa de CCF não era semelhante.

A presença de 4-AA por reagir sugere que o produto formado corresponde ao produto da oxidação enzimática homomolecular da 2-A-*p*-cresol. Esta conclusão foi retirada com base na análise dos resultados obtidos quer na monitorização da reação por CCF, quer na análise do espectro de massa, onde se identificou o pico base correspondente à molécula desprotonada $[M-H]^-$ com m/z 242 confirmando a presença de um produto com $MM = 243$ g/mol, identificado como o produto da oxidação enzimática homomolecular da 2-amino-*p*-cresol (**15**), de acordo com o apresentado na Figura 2.40.⁷⁹

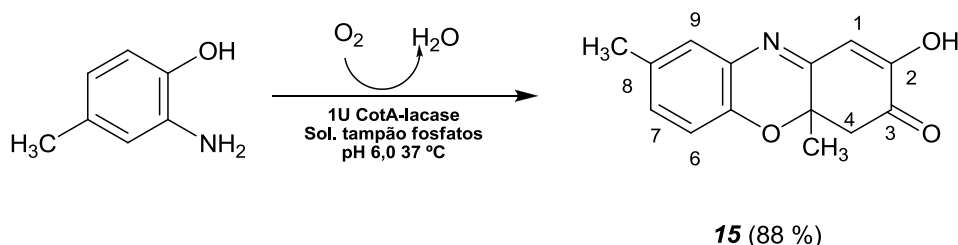


Figura 2.40- Estrutura proposta para o produto **15** obtido pela oxidação da 2-A-*p*-cresol catalisada por CotA-lacase.

Acresce ainda que se observou a presença do pico a m/z 151 atribuído à presença da molécula protonada $[M+H]^+$ da 4-AA que possui $MM = 150$ g/mol.

O 2-A-*p*-cresol apresenta um potencial de oxidação de 0,39 V a pH 6,0, enquanto que o da 4-AA é de 0,82 V. Estes resultados sugerem que o 2-A-*p*-cresol é um melhor substrato para a CotA-lacase do que a 4-AA, tendo em conta que o potencial redox da CotA-lacase é de 0,55 V (vs ENH)³⁰ oxidando com uma maior facilidade substratos de potenciais mais baixos.

2.4. Proposta de mecanismo de oxidação enzimática

A evidência da formação da ligação dupla na oxidação dos substratos *N,N*-DA, *N,N*-DEA, *N,N*-bOH-DA, 4-MA, 4-PA, 4-NPDA e 3,4-DABN permitiu reforçar a proposta de mecanismo (Figura 2.41) sugerido para a formação de compostos azo, através da reação de oxidação catalisada por lacases,

apresentada na tese “*Biotransformação de aminas aromáticas catalisadas por lacases*”.⁷⁸

Conforme descrito⁷⁸ a ação da enzima sob o substrato (**A**) promove a formação dos intermediários radical catiónico amina (**A⁺**) e radical neutro aminilo (**A[•]**). Este último reage com outro semelhante, através de um mecanismo radicalar formando a ligação HN-NH. Nas condições reacionais os prótons ácidos são removidos, dando origem ao respectivo composto azo.

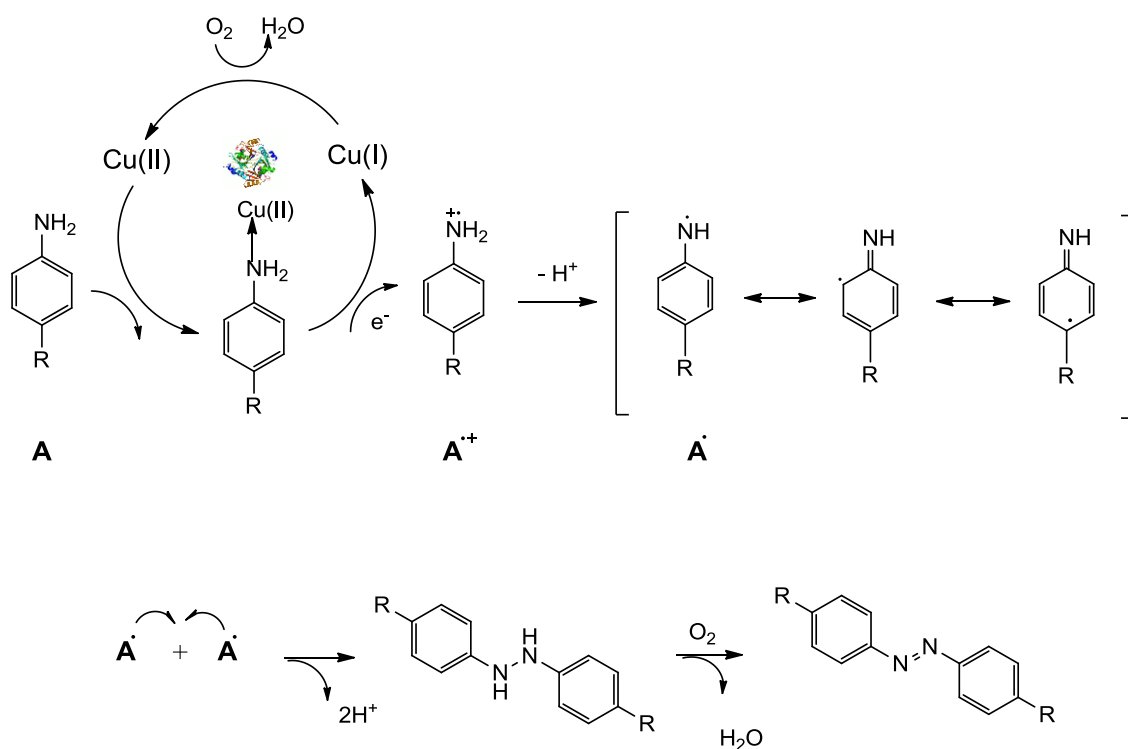


Figura 2.41- Mecanismo proposto para a formação de compostos azo por ação da CotA-lacase.

No caso específico das aminas *N,N*-DA, *N,N*-DEA e *N,N*-bOH-DA por conterem uma amina terciária em posição *para* relativamente ao grupo amina, não há formação do intermediário neutro benzoquinona-diimina mas sim do catião benzoquinona-diimina (**A⁺**), conforme ilustrado na Figura 2.42. Este último é um intermediário mais instável⁸⁰ que o seu semelhante neutro e como tal, admite-se que o mecanismo radicalar prevaleça sob outro tipo de mecanismo.

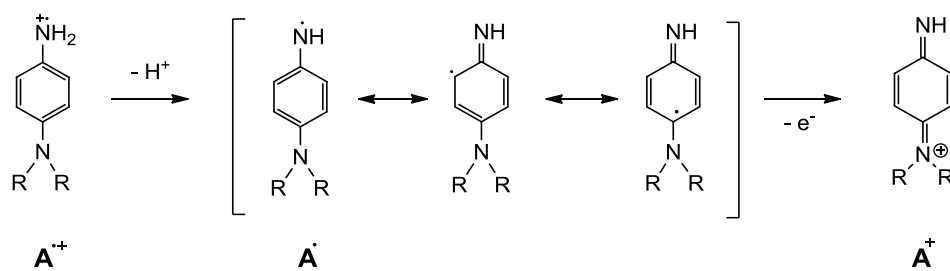


Figura 2.42- Formação do intermediário catião benzoquinona-diimina na oxidação de aminas aromáticas com aminas terciárias em posição para relativa ao grupo amina.

3. Conclusões e Perspetivas Futuras

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade da lacase de origem bacteriana de *Bacillus subtilis* designada CotA-lacase em promover a formação de corantes azo, através do processo de oxidação de diferentes aminas aromáticas, selecionadas com base na sua estrutura química.

De forma a prever a eficiência das reações para o par enzima/substrato determinou-se os potenciais de oxidação dos substratos por voltametria cíclica, tendo os seus valores variado entre 0,42 V e 1,27 V. De uma maneira geral, verificou-se que substratos com potenciais inferiores ou ligeiramente superiores ao da enzima (0,55 V) poderiam ser oxidados com o sistema catalítico CotA-lacase, enquanto que os substratos com potencial superior ao da enzima teriam que ser oxidados utilizando o sistema catalítico CotA-lacase/ABTS. Assim, com base nos potenciais de oxidação dos substratos e com a análise dos ensaios de *screening* definiram-se as condições ótimas reacionais em termos de pH 6,0, [CotA-lacase] = 1 U/mL e [ABTS] = 1 mM. Utilizou-se o sistema catalítico CotA-lacase para os substratos *N,N*-DA, *N,N*-DEA, *N,N*-bOH-DA, 4-MA, 4-PA e 3,4-DABN, o sistema catalítico CotA-lacase/ABTS para os substratos 4-EA, 4-CIA, 4-NPDA, 1-NA, 5-ANSA, 8-AQA e 2,3-DAPA e verificou-se que para os substratos 4-ABSA, 4-SA, 3-APA, 2,3-DAPA e Pirazol não ocorreu qualquer reação.

As reações de oxidação de aminas aromáticas *para*-substituídas são condicionadas pelo carácter eletrónico do grupo substituinte. Verificou-se que a oxidação de aminas aromáticas *para*-substituídas com aminas terciárias (*N,N*-DA, *N,N*-DEA e *N,N*-bOH-DA) origina a formação de compostos azo **1**, **2** e **3** isolados com rendimentos de 98 %, 81 % e 84 %, respectivamente.

Relativamente à oxidação de aminas aromáticas *para*-substituídas com grupos ativadores moderados (4-MA e 4-PA) verificou-se que ocorreu a formação de dois tipos de compostos, nomeadamente, azo (**4** e **6**) e trímeros (**5** e **7**). O composto azo **4** foi isolado com um rendimento de 53 % e o trímero **5** foi isolado com um rendimento de 46 %. O fato de se verificar a formação de dois compostos com estruturas diferentes revela que a presença dos grupos metóxi e fenóxi não favorece unicamente a formação do composto azo.

Verificou-se que na oxidação de aminas aromáticas *para*-substituídas com um grupo ativador fraco (4-EA) se obteve a formação do respetivo hidrazo (**8**), enquanto que quando a amina possui um grupo desativador fraco (4-CIA) ocorreu a formação de um trímero (**9**), isolados com rendimentos de 76 % e 78 %, respetivamente.

Para os substratos que possuem grupos desativadores do anel aromático (4-ABSA e 4-SA) não ocorreu reações de oxidação devido a um deslocamento da densidade eletrónica do átomo de azoto, indisponibilizando o par eletrónico para a oxidação enzimática.

Na oxidação das aminas *orto,para*-disubstituídas com um grupo desativador forte (4-NPDA) e com um grupo desativador moderado (3,4-DABN), observou-se a formação dos compostos azo **10** e **11** isolados com rendimentos de 68 % e 41 %, respetivamente. Também nesta situação os valores de rendimento obtidos para os compostos azo isolados sugerem que não ocorre unicamente a formação do composto azo.

Relativamente à oxidação de compostos derivados de naftaleno, obteve-se para a 1-NA a formação de dois produtos, um composto azo (**12**) e um trímero (**13**). Na oxidação do composto heteropolicíclico derivado da quinolina (8-AQA) ocorreu a formação do composto **14**, que não apresenta a presença de uma ligação dupla –N=N–, característica dos compostos azo.

Na oxidação das piridinas 2,3-DAPA e 3-APA, verificou-se através da monitorização por CCF que as reações foram bastante incompletas, pelo que não foi possível propor estruturas para os produtos formados.

É de destacar que os compostos foram obtidos em condições oxidativas suaves, utilizando água como principal solvente, o que torna os protocolos estudados neste trabalho, processos de síntese mais sustentáveis quando comparados com processos oxidativos químicos e de acoplamento tradicionais, geralmente utilizados na síntese deste tipo de compostos.

Como se verificou que a gama de substratos passíveis de sofrerem oxidação pela CotA-lacase pode ser alargada com a utilização de um mediador, em termos de trabalho futuro poderá ser testada experimentalmente a influência da utilização de diferentes mediadores, como o TEMPO ou o HBT, e efetuar um estudo comparativo com o ABTS.

Para os substratos selecionados importa estudar e testar experimentalmente a oxidação enzimática com recurso a uma outra enzima da mesma família das lacases, como por exemplo a TvL, e efetuar um estudo comparativo com os resultados obtidos no presente trabalho. Seria igualmente interessante testar a oxidação enzimática com CotA-lacase em reações de acoplamento cruzado para a produção de corantes com estrutura assimétrica.

Num processo catalítico ocorre normalmente a regeneração do catalisador, ficando este apto para reiniciar o ciclo catalítico. Assim, poderá ser testada a reutilização da CotA-lacase para verificar se a sua atividade diminuiu ou se ocorre a sua desativação.

Também poderá ser estudada a imobilização da enzima através da ligação a um suporte insolúvel para que não ocorra a perda do catalisador e de modo a verificar se existe um aumento da sua atividade e/ou seletividade.

Divulgação de resultados em congressos científicos:

- Maria Paula Robalo, Ana Catarina Sousa, Sara Baptista e Lígia O. Martins, *Eco-friendly synthesis of azobenzene dyes mediated by CotA-lacase*, International Symposium of Green Chemistry – ISGC2017, La Rochelle, França, 16-19 de Maio de **2017**
- Este trabalho foi também apresentado no iFEQB- Fórum de Engenharia Química e Biológica do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Portugal, 16-18 de Maio de **2017**

4. Parte Experimental

4.1. Considerações gerais

Os reagentes e solventes utilizados foram adquiridos com pureza elevada e utilizados tal como adquiridos à Sigma Aldrich ou Acrös Organics. A solução de enzima CotA-lacase foi utilizada conforme fornecida pelo grupo Microbial and Enzyme Technology, coordenado pela Professora Doutora Lígia O. Martins do Instituto de Tecnologia Instituto de Tecnologia Química e Biológica. A evolução das reações foi seguida por cromatografia de camada fina (CCF) utilizando folhas de alumínio revestidas de sílica gel 60 GF₂₅₄ da Merck, com uma espessura de 0,25 mm e/ou por cromatografia de líquida de alta resolução (HPLC). Sempre que necessário as placas foram analisadas sob luz ultravioleta a 254 e/ou 366 nm. Reações controle, na ausência de enzima, foram sempre colocadas em paralelo.

Nas purificações por cromatografia em coluna utilizou-se silicagel 60 Å de elevada pureza, com diferentes condições de eluição especificadas para cada caso. Nas purificações por cromatografia preparativa utilizaram-se placas de vidro (20 x 20 cm) revestidas de uma camada de sílica gel 60 CF da Merck. As soluções foram concentradas num evaporador rotativo Büchi, modelo R210, e a remoção total de água garantida com a secagem em linha de vácuo.

4.2. Determinação dos potenciais de oxidação por voltametria cíclica

Os potenciais de oxidação dos substratos foram determinados por voltametria cíclica num potencióstato/galvanóstato *EG&G Princeton Applied Research* (PAR), modelo 273A, utilizado para manter e controlar em cada instante o potencial do eléctrodo, utilizando como *software Electrochemistry Powersuite*, versão 2.51 para a aquisição e tratamento dos respetivos dados. Utilizou-se uma célula eletroquímica convencional para três eléctrodos, que continha incorporado o fio de platina como contra-eléctrodo, um eléctrodo de trabalho de disco de platina de 1 mm de diâmetro e como referência o eléctrodo de Ag/AgCl da Radiometer analytical. Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente, num intervalo entre -0,7 e 1,4 V para uma velocidade de

varrimento de 100 mV/s, em soluções de 1 mM de composto em 1:9 etanol:solução tampão fosfato 20 mM a pH 6, previamente desarejadas com azoto. Posteriormente os resultados de potenciais obtidos foram corrigidos de +0,197 V, referenciados ao elétrodo normal de hidrogénio (NHE).

4.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espetros de ressonância magnética nuclear de protão (^1H -RMN) foram obtidos nos espectrómetros Bruker 300 MHz e 400 MHz, com o *software* Topsin 2.1. Os desvios químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm), as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz) e as multiplicidades estão expressas segundo a nomenclatura: s (singuleto), d (duplete), t (tripleto) e m (multiplete). As amostras de RMN foram preparadas ao ar e à temperatura ambiente, utilizando solventes deuterados (DMSO- d_6 , MeOD- d_4 , Acetona- d_6 e CD_2Cl_2) tal como adquiridos à *Euriso top* e utilizados em função da solubilidade das amostras.

4.4. Espectrometria de massa

As análises de massa foram efetuadas através da técnica de *electrospray ionization* (ESI) em modo positivo e/ou negativo. Os espetros foram obtidos num espectrómetro Varian 500-MS LC Ion Trap (Rede Portuguesa de Espectrometria de Massa) a operar com voltagem do spray de ionização $\pm 5,0$ kV, voltagem capilar 20 V e RF 80 %.

4.5. Espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-vis)

Os espetros de UV-VIS foram efetuados através do espectrofotómetro Thermo Electron Corporation, modelo Nicolet Evolution-300 com o *software* *Vision Pro 4.01*, numa gama de comprimentos de onda compreendida entre os 200-900 nm, utilizando células de quartzo de duas faces com 1 cm de percurso ótico.

4.6. Ensaios enzimáticos em placas de 96 poços

Começou-se os ensaios de *screening* por verificar a solubilidade de cada substrato na solução tampão de fosfatos e verificou-se que apenas os substratos *N,N*-bOH-DA e do 3-APA eram solúveis na solução tampão. Assim, as reações de rastreio de substratos, realizadas em placas de 96 poços, foram realizadas a partir de soluções padrão, preparadas em etanol, de forma a garantir a total solubilidade dos substratos. Em cada poço foi apenas colocada 10% do volume total de reação (200 µL) de quantidade de solvente, ou seja, 20 µL de forma a garantir condições adequadas para o funcionamento da enzima.

O estudo do efeito do pH na atividade enzimática foi efetuado com uma concentração de 5 mM de substrato, em 20 mM de uma solução tampão de fosfatos, numa gama de pH de 6 a 8 e contendo 1 U/mL de enzima. Todas as reações foram monitorizadas por CCF (cromatografia de camada fina) e um ensaio de controlo, ausência de enzima, foi sempre colocado em paralelo.

4.7. Reações Enzimáticas

4.7.1. Oxidação da *N,N*-dimetilfenilamina (*N,N*-DA)

A oxidação da *N,N*-DA (7,0 mg, 0,050 mmol) foi realizada a pH 6 e deu origem a uma solução castanha escura sem qualquer sólido em solução. A mistura foi evaporada sob vácuo e o resíduo lavado com metanol e isolado como um composto puro castanho-escuro **1**.

1: Sólido castanho; rendimento: 6,7 mg (0,025 mmol, 98 %); ¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ(ppm) = 7,68 (d, 4H, *J* = 9,1 Hz, H_{2,2'}, H_{6,6'}), 6,79 (d, 4H, *J* = 9,2 Hz, H_{3,3'}, H_{5,5'}) e 3,01 (s, 12H, CH₃); ¹³C{H} NMR (DMSO-*d*₆) δ(ppm) = 151,4 (C_{1,1'}), 123,6 (C_{2,2'}, C_{6,6'}), 111,7 (C_{3,3'}, C_{5,5'}), CH₃ sob o sinal do solvente. **ESI-MS** modo positivo: 269 [M+H]⁺ e *m/z* 281 [M+Na]⁺; MS² (*m/z*): 254, 241, 148, 120 e 105.

4.7.2. Oxidação *N,N*-dietil-*p*-fenilenodiamina (*N,N*-DEA)

A oxidação da *N,N*-dietil-*p*-fenilenodiamina (*N,N*-DEA) (8,3 μ L, 0,050 mmol) foi realizada a pH 6 e deu origem a uma solução roxa sem qualquer sólido em solução. A mistura foi evaporada sob vácuo e o resíduo purificado por cromatografia com MeOH:CHCl₃ (1:4) como sistema eluente. Foi isolada uma fração que depois de evaporada deu origem ao sólido roxo/violeta identificado como composto **2**.

2: sólido roxo/violeta; rendimento: 6,5 mg (0,020 mmol, 81 %); **¹H-RMN** (MeOD-*d*₄) δ (ppm) = 7,69 (d, 4H, *J* = 9,2 Hz, H_{2,2'}, H_{6,6'}), 6,76 (d, 4H, *J* = 9,2 Hz, H_{3,3'}, H_{5,5'}), 3,47 (q, 8H, *J* = 9,2 Hz, CH₂) e 1,27 (s, 12H, CH₃); **¹³C{H} NMR** (MeOD-*d*₄) δ (ppm) = 125,1 (C_{2,2'}, C_{6,6'}), 112,3 (C_{3,3'}, C_{5,5'}), 45,6 (CH₂) e 12,9 (CH₃). **ESI-MS** modo positivo: 325 [M+H]⁺; MS² (*m/z*): 310, 296 e 148.

4.7.3. Oxidação do sulfato *N,N*-bis(2-hidroxi-etil)-1,4-fenilenodiamina (*N,N*-bOH-DA)

A oxidação da *N,N*-bis(2-hidroxi-etil)-1,4-fenilenodiamina sulfato (*N,N*-bOH-DA); (14,7 mg, 0,050 mmol) foi realizada a pH 6 e deu origem a uma solução azul-escura sem qualquer sólido em solução. A mistura foi evaporada sob vácuo e o resíduo purificado por cromatografia com MeOH:CHCl₃ (1:4) como sistema eluente. Foi isolada uma fração que depois de evaporada deu origem ao sólido azul-escuro identificado como composto **3**.

3: sólido azul-escuro; rendimento: 8,1 mg (0,021 mmol, 84 %); **¹H-RMN** (MeOD-*d*₄) δ (ppm) = 7,63 (d, 4H, *J* = 9,2 Hz, H_{2,2'}, H_{6,6'}), 6,78 (d, 4H, *J* = 9,2 Hz, H_{3,3'}, H_{5,5'}), 4,33 (t, 4H, *J* = 13,2 Hz, CH₂) e 4,12 (t, 4H, *J* = 13,2 Hz, CH₂); **ESI-MS** modo positivo: 389 [M+H]⁺; MS² (*m/z*): 344; MS³ (*m/z*): 313.

4.7.4. Oxidação da 4-metoxifenilamina (4-MA)

A oxidação da 4-MA (6,2 mg, 0,050 mmol) foi realizada a pH 6 e deu origem a uma mistura reacional vermelha, com um ligeiro precipitado em solução. A mistura foi evaporada sob vácuo e o resíduo lavado com metanol e purificado por cromatografia preparativa, com C₄H₈O₂:C₆H₁₄ (3:1) como sistema eluente. Foram isoladas duas frações, uma cor de bronze (primeira a eluir) e uma alaranjada (segunda a eluir) evaporadas sob vácuo, que correspondem aos compostos **4** e **5**, respetivamente.

4: sólido cor de cobre; rendimento: 3,2 mg (0,013 mmol, 53 %); ¹H-RMN (Acetona-*d*₆) δ(ppm) = 7,88 (d, 4H, *J* = 8,8 Hz, H_{3,5}, H_{3',5'}), 7,09 (d, 4H, *J*=8,8 Hz, H_{2,6}, H_{2',6'}), 3,90 (s, 6H, CH₃); ¹³C{H} RMN (Acetona-*d*₆) δ(ppm) = 162,8 (C_{4,4'}), 147,8 (C_{1,1'}), 125,3 (C_{2,2'}, C_{6,6'}), 115,1 (C_{3,3'}, C_{5,5'}) e 55,7 (CH₃). **ESI-MS** modo positivo: 243 [M+H]⁺; MS² (*m/z*): 228, 215 e 136.

5: sólido laranja; **ESI-MS** modo positivo: 364 [M+H]⁺; MS² (*m/z*): 249, 333 e 318.

4.7.5. Oxidação da 4-fenoxianilina (4-PA)

A oxidação da 4-fenoxianilina (9,3 mg, 0,050 mmol) foi realizada a pH 6 num sistema etanol:solução tampão fosfatos (3:7) e deu origem a uma mistura reacional acastanhada, com um ligeiro precipitado em solução. A mistura foi extraída com acetato de etilo e evaporada sob vácuo. Foi isolada uma fração que depois de evaporada deu origem ao sólido castanho identificado como composto **6** e **7**.

6: sólido castanho; **ESI-MS** modo positivo: 364 [M+H]⁺; MS² (*m/z*): 349, 333 e 318.

7: sólido castanho; **ESI-MS** modo positivo: 550 [M+H]⁺; MS² (*m/z*): 457 e 381.

4.7.6. Oxidação da 4-etilanilina (4-EA)

A oxidação da 4-etilanilina (6 μ L, 0,049 mmol) foi realizada a pH 6 e deu origem a uma mistura reacional acastanhada, sem precipitado em solução. A mistura foi extraída com acetato de etilo e evaporada sob vácuo. Foi isolada uma fração que depois de evaporada deu origem ao sólido laranja identificado como composto **8**.

8: sólido laranja; rendimento: 4,5 mg (0,019 mmol, 76 %); **ESI-MS** modo positivo: 241 [M+H]⁺; MS² (*m/z*): 212 e 196.

4.7.7. Oxidação da 4-cloroanilina (4-CIA)

A oxidação da 4-cloroanilina (6,4 mg, 0,050 mmol) foi realizada a pH 6 e deu origem a uma mistura reacional acastanhada, sem precipitado em solução. A mistura foi extraída com acetato de etilo e evaporada sob vácuo. Foi isolada uma fração que depois de evaporada deu origem ao sólido vermelho identificado como composto **9**.

9: sólido vermelho; **ESI-MS** modo positivo: 467 [M+H]⁺ e *m/z* 489 [M+Na]⁺; MS² (*m/z*): 432.

4.7.8. Oxidação do ácido 4-aminobenzenossulfónico (4-ABSA)

A oxidação do ácido 4-aminobenzenossulfónico (8,6 mg, 0,050 mmol) foi realizada a pH 6 e deu origem a uma mistura reacional verde. Evaporou-se sob vácuo. Através da análise da monotorização por CCF e por análise espectroscópica do sólido isolado revelou-se tratar-se da amina aromática de partida, 4-ABSA.

4.7.9. Oxidação da sulfanilamida (4-SA)

A oxidação da sulfanilamida (8,6 mg, 0,050 mmol) foi realizada a pH 6 e deu origem a uma mistura reacional verde. Evaporou-se sob vácuo. Através da análise da monotorização por CCF e por análise espectroscópica do sólido isolado revelou-se tratar-se da amina aromática de partida, 4-SA.

4.7.10. Oxidação da 4-nitro-*o*-fenilenodiamina (4-NPDA)

A oxidação da 4-nitro-*o*-fenilenodiamina (7,7 mg, 0,050 mmol) foi realizada a pH 6 e deu origem a uma mistura reacional acastanhada, sem precipitado em solução. A mistura foi extraída com acetato de etilo, evaporada sob vácuo e o resíduo purificado por cromatografia com MeOH:CHCl₃ (1:4) como sistema eluente. Foi isolada uma fração que depois de evaporada deu origem ao sólido amarelo-escuro identificado como composto **10**.

10: sólido amarelo-escuro; rendimento: 5,1 mg (0,0169 mmol, 68 %); **¹H-RMN** (Acetona-*d*₆) δ(ppm) = 8,65 (s, 2H, H_{3,3'}), 8,07 (d, 2H, *J*=9,2 Hz, H_{6,6'}) e 7,06 (d, 2H, *J*=9,2 Hz, H_{5,5'}); **ESI-MS** modo negativo: 301 [M-H]⁻; MS² (*m/z*): 273.

4.7.11. Oxidação da 3,4-diaminobenzonitrilo (3,4-DABN)

A oxidação da 3,4-diaminobenzonitrilo (6,7 mg, 0,050 mmol) foi realizada a pH 6 e deu origem a uma mistura reacional laranja com precipitado em solução. O precipitado foi isolado e purificado por cromatografia em coluna com acetato de etilo: hexano (2:1) como sistema eluente. Foram isoladas duas frações, uma amarela escura (primeira a eluir) e uma vermelha (segunda a eluir) evaporadas sob vácuo. Obteve-se uma fração amarela escura que corresponde ao composto **11** e uma fração vermelha, porém os dados obtidos através das técnicas de caracterização utilizadas não permitiu propor uma estrutura.

11: Sólido amarelo escuro; rendimento: 3,2 mg (0,012 mmol, 49 %); **¹H-RMN** (Acetone-*d*₆) δ(ppm) = 8,17 (s, 2H, H_{3,3'}), 7,45 (d, 2H, *J*=8,8 Hz, H_{5,5'}) e 7,02 (d, 2H, *J*=8,8 Hz, H_{6,6'}). **ESI-MS** modo negativo: 261 [M-H]⁻; MS² (*m/z*): 233.

4.7.12. Oxidação da 1-naftilamina (1-NA)

A oxidação da 1-naftilamina (7,1 mg, 0,050 mmol) foi realizada a pH 6 e deu origem a uma mistura reacional roxa, sem precipitado em solução. A mistura foi evaporada sob vácuo e o resíduo lavado com metanol e purificado por cromatografia em coluna com MeOH:CHCl₃ (1:4) como sistema eluente. Foram isoladas duas frações, uma grená (primeira a eluir) e uma rosa (segunda a eluir) evaporadas sob vácuo. No entanto, não foi possível isolar componentes puros e o sólido correspondia a uma mistura dos compostos **12** e **13**.

12: ESI-MS modo positivo: 283 [M+H]⁺; MS² (*m/z*): 255.

13: ESI-MS modo positivo: 424 [M+H]⁺; MS² (*m/z*): 408 e 281.

4.7.13. Oxidação do ácido 5-aminonaftalenosulfônico (5-ANSA)

A oxidação do ácido 5-aminonaftalenosulfônico (11,2 mg, 0,050 mmol) foi realizada a pH 6 e deu origem a uma mistura reacional roxa, sem precipitado em solução. A mistura foi evaporada sob vácuo e o resíduo lavado com metanol e purificado por cromatografia preparativa com MeOH:CHCl₃ (2:3) como sistema eluente. Isolaram-se duas frações, uma cor violeta e outra cor rosa avermelhado. A análise dos dados espectroscópicos foi inconclusiva o que não permitiu propor qualquer tipo de estrutura dos compostos obtidos.

4.7.14. Oxidação da 8-aminoquinolina (8-AQA)

A oxidação da 8-aminoquinolina (7,2 mg, 0,050 mmol) foi realizada a pH 6 e deu origem a uma mistura reacional transparente com precipitado roxo em solução. O precipitado foi isolado por filtração e purificado por cromatografia em coluna com MeOH:CHCl₃ (1:4) como sistema eluente. No entanto, após purificação ainda se encontra algum material de partida no sólido roxo que corresponde ao composto **14**.

14: ESI-MS modo positivo: 287 [M+H]⁺; MS² (*m/z*): 270.

4.7.15. Oxidação da 2,3-diaminopiridina (2,3-DAPA)

A oxidação da 2,3-diaminopiridina (5,4 mg, 0,050 mmol) foi realizada a pH 6 e deu origem a uma mistura reacional laranja escura. Efetuou-se uma extração do composto com acetato de etilo e evaporou-se sob vácuo. O precipitado foi isolado e purificado por cromatografia em coluna com MeOH:CHCl₃ (1:4) como sistema eluente. Apesar de isolado um sólido laranja escuro não foi possível propor a sua estrutura com base nos dados obtidos.

4.7.16. Oxidação da 3-aminopiridina (3-APA)

A oxidação da 3-aminopiridina (4,7 mg, 0,050 mmol) foi realizada a pH 6 e deu origem a uma mistura reacional roxa. O precipitado foi isolado e purificado por cromatografia em coluna com MeOH:CHCl₃ (2:3) como sistema eluente. Apesar de isolado um sólido vermelho não foi possível propor a sua estrutura com base nos dados obtidos.

4.7.17. Oxidação da 2,6-diaminopiridina (2,6-DAPA)

A oxidação da 2,6-diamino piridina (5,5 mg, 0,050 mmol) foi realizada a pH 6 e verificou-se que não ocorreu qualquer alteração de cor em relação ao controlo. Através da análise da monitorização por CCF conclui-se que não ocorreu reação de oxidação.

4.7.18. Oxidação do pirazol

A oxidação do pirazol (3,4 mg, 0,050 mmol) foi realizada a pH 6 e verificou-se que não ocorreu qualquer alteração de cor em relação ao controlo. Através da análise da monitorização por CCF conclui-se que não ocorreu reação de oxidação.

4.7.19. Reação de acoplamento heteromolecular

A reação de oxidação de 4-amino-acetanilida (7,6 mg, 0,050 mmol) e 2-amino-*p*-cresol (6,2 mg, 0,050 mmol) foi realizada a pH 6 e deu origem a uma mistura reacional amarela. A mistura foi evaporada sob vácuo e o resíduo lavado com metanol e purificado por cromatografia preparativa MeOH:CHCl₃ (1:4) como sistema eluente. Separaram-se duas frações, uma amarela (**15**) e outra castanha.

15: Sólido amarelo; rendimento: 5,1 mg (0,021 mmol, 88 %); **¹H-RMN** (CD₂Cl₂) δ(ppm) = 6,78 (s, 1H, H₉), 6,66 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, H₆), 6,61 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, H₇), 5,32 (s, 1H, H₁), 3,60 (d, 1H, *J* = 15,6 Hz, H_{4a}), 3,40 (d, 1H, *J* = 15,6 Hz, H_{4b}), 1,26 (s, 3H, CH₃) e 1,05 (s, 3H, CH₃). **¹³C{H} RMN** (CD₂Cl₂) δ(ppm) = 181,4 (C₃), 163,7 (C₂), 141,1 (C₁₃), 132,8 (C₆), 126,4 (C₇), 117,2 (C₈, C₉), 106,6 (C₁), 72,1 (C₁₂), 51,7 (C₄), 23,7 (CH₃) e 20,9 (CH₃). **ESI-MS** modo positivo: *m/z* 244 [M+H]⁺; MS² *m/z* 226 [M+H-H₂O]⁺, 216 [M+H-CO]⁺.⁷⁹

5. Referências Bibliográficas

- 1 Wenda, S.; Illner, S.; Mell, A.; Kragl, U. *Green Chem.* **2011**, *13* (11), 3007–3047.
- 2 Wohlgemuth, R. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21* (6), 713–724.
- 3 Hudlicky, T.; Reed, J. W. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (11), 3117–3132.
- 4 Ribeiro, B. D.; Coelho, M. A. Z.; Castro, A. M. De. *Princ. Green Chem. White Biotechnol.* **2015**, No. 45, 1–8.
- 5 Quintas A, Freire AP, H. M. *Bioquímica - Caraterização molecular da vida*; LIDEL - Edições Técnicas, Ed.; Lisboa, 2008.
- 6 Cabral, J.M.S, Aires-Barros, M.R, Gama, M. *Engenharia Enzimática*; LIDEL - Edições Técnicas, Ed.; Lisboa, 2003.
- 7 Clouthier, C. M.; Pelletier, J. N. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (4), 1585–1605.
- 8 Hollmann, F.; Arends, I. W. C. E.; Buehler, K.; Schallmeyer, A.; Bühler, B. *Green Chem.* **2011**, *13* (2), 226–265.
- 9 Enzymes and the active site
<https://www.khanacademy.org/science/biology/energy-and-enzymes/introduction-to-enzymes/a/enzymes-and-the-active-site>.
- 10 Burton, S. G. *Trends Biotechnol.* **2003**, *21* (12), 543–549.
- 11 Sousa, A. C.; Martins, L. O.; Robalo, M. P. *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355* (14), 2908–2917.
- 12 Kunamneni, A.; Camarero, S.; Garcia-Burgos, C.; Plou, F. J.; Ballesteros, A.; Alcalde, M. *Microb Cell Fact* **2008**, *7*, 32–49.
- 13 Mogharabi, M.; Faramarzi, M. A. *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356* (5), 897–927.
- 14 Morozova, O. V; Shumakovich, G. P.; Gorbacheva, M. a; Shleev, S. V; Yaropolov, A. I. *Biochemistry. (Mosc)*. **2007**, *72* (10), 1136–1150.
- 15 Polak, J.; Jarosz-Wilkolazka, A. *Process Biochem.* **2012**, *47* (9), 1295–1307.
- 16 Dwivedi, U. N.; Singh, P.; Pandey, V. P.; Kumar, A. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2011**, *68* (2), 117–128.
- 17 Sousa, A. C.; Oliveira, M. C.; Martins, L. O.; Robalo, M. P. *Green Chem.* **2014**, *16* (9), 4127–4136.
- 18 Camarero, S.; Ibarra, D.; Martínez, Á. T.; Romero, J.; Gutiérrez, A.; del Río, J. C. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40* (5), 1264–1271.
- 19 Couto, S. R.; Toca-herrera, J. L. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *1* (December), 115–120.

- 20 Sousa, A. C.; Piedade, M. F. M. M.; Martins, L. O.; Robalo, M. P. *Green Chem.* **2016**, *18* (22), 6063–6070.
- 21 Brijwani, K.; Rigdon, A.; Vadlani, P. V. *Enzyme Res.* **2010**, *2010*, 1–10.
- 22 Kunamneni, A.; Plou, F. J.; Ballesteros, A.; Alcalde, M. *Recent Pat. Biotechnol.* **2008**, *2* (1), 10–24.
- 23 Viswanath, B.; Rajesh, B.; Janardhan, A.; Kumar, A. P.; Narasimha, G. *Enzyme Res.* **2014**, *2014*, 1–21.
- 24 Witayakran, S.; Ragauskas, A. J. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351* (9), 1187–1209.
- 25 Hakulinen, N.; Rouvinen, J. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72* (5), 857–868.
- 26 Silva, C. S.; Damas, J. M.; Chen, Z.; Brissos, V.; Martins, L. O.; Soares, C. M.; Lindley, P. F.; Bento, I. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2012**, *68* (2), 186–193.
- 27 Silva, C. S.; Durão, P.; Fillat, A.; Lindley, P. F.; Martins, L. O.; Bento, I. *Metallomics* **2012**, *4* (1), 37–47.
- 28 Zhukhlistova, N. E.; Zhukova, Y. N.; Lyashenko, A. V.; Zaitsev, V. N.; Mikhaïlov, A. M. *Crystallogr. Reports* **2008**, *53* (1), 92–109.
- 29 Martins, L. O.; Soares, C. M.; Pereira, M. M.; Teixeira, M.; Costa, T.; Jones, G. H.; Henriques, A. O. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (21), 18849–18859.
- 30 Enguita, F. J.; Martins, L. O.; Henriques, A. O.; Carrondo, M. A. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (21), 19416–19425.
- 31 Claus, H. *Micron* **2004**, *35* (1–2), 93–96.
- 32 Solomon, E. I.; Sundaram, U. M.; Machonkin, T. E. *Chem. Rev.* **1996**, *96* (7), 2563–2606.
- 33 Yoon, J.; Liboiron, B. D.; Sarangi, R.; Hodgson, K. O.; Hedman, B.; Solomon, E. I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (34), 13609–13614.
- 34 Rodríguez-Delgado, M. M.; Alemán-Nava, G. S.; Rodríguez-Delgado, J. M.; Dieck-Assad, G.; Martínez-Chapa, S. O.; Barceló, D.; Parra, R. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2015**, *74*, 21–45.
- 35 Rulíšek, L.; Ryde, U. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257* (2), 445–458.
- 36 Wellington, K. W. *Green Chem.* **2014**, 167–211.
- 37 Monti, D.; Ottolina, G.; Carrea, G.; Riva, S. *Chem. Rev.* **2011**, 4111–4140.
- 38 Riva, S. *Trends Biotechnol.* **2006**, *24* (5), 219–226.
- 39 Cañas, A. I.; Camarero, S. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28* (6), 694–705.
- 40 Mikolasch, A.; Schauer, F. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *82* (4), 605–624.

- 41 Vanhulle, S.; Van Hove, F.; Jolival, C.; Bazes, A.; Enaud, E.; Trovaslet, M. *Chem. Eng. Trans.* **2008**, *14*, 315–322.
- 42 Pereira, L.; Coelho, A. V.; Viegas, C. A.; Ganachaud, C.; Iacazio, G.; Tron, T.; Robalo, M. P.; Martins, L. O. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351* (11–12), 1857–1865.
- 43 Galletti, P.; Funiciello, F.; Soldati, R.; Giacomini, D. *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357* (8), 1840–1848.
- 44 Hunger, K. *Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Applications*; Wiley-VCH, Ed.; Germany, 2003.
- 45 Sudha, M.; Saranya, A. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* **2014**, *3* (2), 670–690.
- 46 Bafana, A.; Devi, S. S.; Chakrabarti, T. *Environ. Rev.* **2011**, *19*, 350–371.
- 47 Sarayu, K.; Sandhya, S. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *167* (3), 645–661.
- 48 Gürses, A.; Açıkıldız, M.; Güneş, K.; Gürses, M. S. *Dyes and Pigments*; SpringerBriefs in Molecular Science; Springer International Publishing: Cham, 2016.
- 49 Chacko, J. T.; Subramaniam, K. *Int. J. Environmetal Sci.* **2011**, *1* (6), 1250–1260.
- 50 dos Santos, A. B.; Cervantes, F. J.; van Lier, J. B. *Bioresour. Technol.* **2007**, *98* (12), 2369–2385.
- 51 Husain, Q. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2006**, *26* (4), 201–221.
- 52 Kasiri, M. B.; Safapour, S. *Environ. Chem. Lett.* **2014**, *12* (1), 1–13.
- 53 Forgacs, E.; Cserhádi, T.; Oros, G. *Environ. Int.* **2004**, *30* (7), 953–971.
- 54 Khan, R.; Bhawana, P.; Fulekar, M. H. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2013**, *12* (1), 75–97.
- 55 Legerská, B.; Chmelová, D.; Ondrejovic, M. *Nov. Biotechnol. Chim.* **2016**, *15* (1), 90–106.
- 56 Saratale, R. G.; Saratale, G. D.; Chang, J. S.; Govindwar, S. P. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2011**, *42* (1), 138–157.
- 57 Stolz, A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *56* (1–2), 69–80.
- 58 Chengalroyen, M. D.; Dabbs, E. R. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *29* (3), 389–399.
- 59 Aljamali, N. *Biochem. Anal. Biochem.* **2015**, *4* (2), 2–5.
- 60 Leelakriangsak, M. *Songklanakarín J. Sci. Technol.* **2013**, *35* (6), 647–657.
- 61 Garcia-Segura, S.; Centellas, F.; Arias, C.; Garrido, J. A.; Rodriguez, R. M.; Cabot, P. L.; Brillas, E. *Electrochim. Acta* **2011**, *58* (1), 303–311.

- 62 Velasco, M. I.; Kinen, C. O.; Hoyos De Rossi, R.; Rossi, L. I. *Dye. Pigment.* **2011**, *90* (3), 259–264.
- 63 Dabbagh, H. A.; Teimouri, A.; Chermahini, A. N. *Dye. Pigment.* **2007**, *73* (2), 239–244.
- 64 Teimouri, A.; Chermahini, A. N.; Ghorbani, M. H. *Chemija* **2013**, *24* (1), 59–66.
- 65 Lu, W.; Xi, C. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49* (25), 4011–4015.
- 66 Wu, Z.; Ondruschka, B.; Cravotto, Giancarlo; Garella, Davide; Asgari, J. *Synth. Commun.* **2008**, *38*, 2619–2624.
- 67 Safari, J.; Zarnegar, Z. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 17738–17745.
- 68 Hu, L.; Cao, X.; Chen, L.; Zheng, J.; Lu, J.; Sun, X.; Gu, H. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (28), 3445–3447.
- 69 Pereira, L.; Coelho, A. V.; Viegas, C. A.; Santos, M. M. C. dos; Robalo, M. P.; Martins, L. O. *J. Biotechnol.* **2009**, *139* (1), 68–77.
- 70 Wong, Y.; Yu, J. *Water Res.* **1999**, *33* (16), 3512–3520.
- 71 Madhavi, V.; Lele, S. S. *BioResources* **2009**, *4* (4), 1694–1717.
- 72 Polak, J.; Jarosz-Wilkolazka, A. *Microb. Cell Fact.* **2010**, *9*, 51.
- 73 Bruyneel, F.; Payen, O.; Rescigno, A.; Tinant, B.; Marchand-Brvnaert, J. *Chem. - A Eur. J.* **2009**, *15* (33), 8283–8295.
- 74 Sousa, A. C.; Piedade, M. F. M. M.; Martins, L. O.; Robalo, M. P. *Green Chem.* **2015**, *17* (3), 1429–1433.
- 75 Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Second Edi.; John Wiley & Sons, I., Ed.; New York, 1944.
- 76 Cantarella, G.; Galli, C.; Gentili, P. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2003**, *22* (3–4), 135–144.
- 77 Liu, Z.; Xie, T.; Zhong, Q.; Wang, G. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol. Commun.* **2016**, *72*, 328–335.
- 78 Sousa, A. C. C. de. Biotransformação de aminas aromáticas catalisada por lacases, Universidade de Lisboa, Instituto Superior Técnico, 2015.
- 79 Sousa, A. C.; Oliveira, M. C.; Martins, L. O.; Robalo, M. P. *Adv Synth Catal.* **2017**, In press.
- 80 Baetzold, R. C. **1970**, 1347–1353.