



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**PREPARAÇÃO QUIMIO-ENZIMÁTICA DE EPÓXIDOS  
DERIVADOS DO CITRONELOL E OUTROS TERPENOS**

**GABRIELA HEERDT**

Florianópolis  
Junho/2018

**Gabriela Heerd**

**PREPARAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DE EPÓXIDOS DERIVADOS  
DO CITRONELOL E OUTROS TERPENOS**

Relatório apresentado ao Departamento de Química  
da Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito parcial da disciplina de  
Estágio II (QMC 5512)

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria da Graça Nascimento**

Florianópolis  
Junho/2018

## Agradecimentos

Em todos os momentos de nossas vidas, existem pessoas que estão ao nosso lado, promovendo trocas enriquecedoras e auxiliando no nosso crescimento. Ao longo da graduação, tive a oportunidade de conviver com pessoas que contribuíram muito para a minha formação e crescimento pessoal.

Agradeço primeiramente à minha Mãe, uma mulher forte e amorosa, que se dedicou enormemente na minha criação, e sempre me incentivou durante a graduação, e em todas as escolhas da minha vida.

Um agradecimento especial à Profª Drª Maria da Graça Nascimento, por toda a dedicação na orientação e por sua amizade. Possuo uma imensa admiração e carinho pela mulher e cientista que és.

Agradeço à Natália Caon Branco pela oportunidade de participar da equipe de monitores, contribuindo muito para o meu crescimento e aprendizagem.

A Profª Drª Daniela Zambelli Mezalira pelo auxílio com as análises de CG.

Aos amigos do Laboratório de Biocatálise, Douglas, Juana, Leandro e Pâmela, pelo apoio e amizade. Aos meus amigos de graduação pelos momentos divididos, em especial, Thainá e Drielle, pelas conversas e companhia nos almoços do RU.

Agradeço ao André, meu companheiro nesta jornada, pelo amor e compreensão sempre.

Aos professores do Departamento de Química que contribuíram para a minha formação.

A Universidade Federal de Santa Catarina, pelo apoio institucional e espaço físico fornecido.

Ao CNPq, INCT-Catálise e Capes pelo suporte financeiro.

A Novozymes e Amano Enzymes Inc, pela doação das lipases.

A Central de Análises pelas numerosas análises realizadas.

## **Sumário**

1.Introdução .....	1
2.Revisão da literatura .....	2
2.1. Enzimas .....	2
2.1.1. Lipases .....	6
2.2. Imobilização .....	9
2.2.1. Ágar .....	11
2.2.2. Bucha vegetal .....	12
2.3. Terpenos e Aplicações .....	13
2.4. Epóxidos .....	16
3. Objetivos .....	20
3.1. Objetivo Geral .....	20
3.2. Objetivos específicos .....	20
4. Metodologia .....	21
4.1. Materiais .....	21
4.2. Equipamentos .....	22
4.3. Segurança no laboratório e tratamento de resíduos .....	22
4.4. Procedimentos experimentais .....	23
4.4.1. Preparação do acetato de citroneíla .....	23
4.4.2. Epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla (Procedimento Geral) .....	24
4.4.3. Imobilização da lipase em bucha vegetal .....	25
4.4.4. Preparação do gel de ágar e imobilização da lipase .....	26
5. Resultados e discussão .....	27
5.1. Preparação de caracterização do acetato de citroneíla .....	27
5.2. Epoxidação quimioenzimática do acetato de citroneíla .....	29

5.2.1. Influência do tempo para a reação de epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla .....	32
5.2.2. Influência da massa de CALB para a reação de epoxidação do acetato de citroneíla .....	32
5.2.3. Adição controlada de UPH na reação de epoxidação do acetato de citroneíla .....	34
5.2.4. Influência do solvente orgânico para a epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla .....	36
5.2.5. Epoxidação quimio-enzimática do $\beta$ -pineno e outros terpenos.....	38
5.2.6. Epoxidação quimio-enzimática do acetato de citronelíla utilizando F-AP15 livre e imobilizada .....	42
6. Conclusão .....	45
7. Referências .....	46

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação estrutural da urease proveniente do “feijão-de-porco” ( <i>Canavalia ensiformis</i> ).....	2
<b>Figura 2.</b> Diagrama de energia para uma reação catalisada e uma não catalisada. ...	3
<b>Figura 3.</b> Representação do sítio ativo da enzima e aproximação do substrato. ....	4
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática do modelo “chave e fechadura” (a) e do “ajuste induzido” (b). <sup>3,7</sup> .....	4
<b>Figura 5.</b> Representação estrutural da lipase <i>Candida antarctica B</i> .....	6
<b>Figura 6.</b> Mecanismo de catálise das serina hidrolases (Adaptado da ref. 3) .....	7
<b>Figura 7.</b> Formação de $\alpha$ -aminofosfonatos catalisada por lipases. ....	8
<b>Figura 8.</b> Hidrólise enzimática para obtenção do (R)-1-(2-metiliazol-4-il)etan-1-ol....	8
<b>Figura 9.</b> Métodos de imobilização de enzimas (adaptado da ref. 26) .....	9
<b>Figura 10.</b> Principais métodos de imobilização: (A) adsorção, (B) aprisionamento e (C) ligação covalente e/ou cross-linking. (adaptado da ref. 29).....	10
<b>Figura 11.</b> Exemplos de suportes para a imobilização de enzimas. (Fonte: o autor) .....	10
<b>Figura 12.</b> Estrutura dos monômeros do ágar .....	11
<b>Figura 13.</b> Epoxidação quimioenzimática do $\beta$ -cariofileno catalisada pela lipase F-AP15 imobilizada em gel de ágar .....	12
<b>Figura 14.</b> Fruta madura e seca de <i>Luffa cylindrica</i> .....	12
<b>Figura 15.</b> Representação estrutural dos monômeros da celulose.....	13
<b>Figura 16.</b> Síntese do oleato de metila utilizando a lipase de <i>R. oryzae</i> .....	13
<b>Figura 17.</b> Estruturas de alguns terpenos.....	15
<b>Figura 18.</b> Epoxidação quimio-enzimática do ciclohexeno catalisada pela LRM.....	19
<b>Figura 19.</b> Epoxidação quimio-enzimática do $\alpha$ -pineno.....	19
<b>Figura 20.</b> Espectro de $^1\text{H}$ -RMN do acetato de citroneíla .....	28
<b>Figura 21.</b> Espectro de absorção no infravermelho do acetato de citroneíla (filme) .	29
<b>Figura 22.</b> Espectro de $^1\text{H}$ -RMN da mistura reacional obtida na epoxidação do acetato de citroneíla. ....	31
<b>Figura 23.</b> Influência do tempo na epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla.....	32
<b>Figura 24.</b> Avaliação da massa de CALB na epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla. ....	33

<b>Figura 25.</b> Espectro de $^1\text{H}$ -RMN mostrando a influência da adição controlada de UPH na epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla.....	35
<b>Figura 26.</b> Cromatograma expandido na região de 1 a 5 min do reagente e de uma alíquota da reação de epoxidação quimio-enzimática do $\beta$ -pineno. ( $t_R = 1,7$ min ; $t_R = 4,2$ min) .....	40
<b>Figura 27.</b> Cromatograma expandido na região de 2 a 8 min do reagente e produto da epoxidação quimio-enzimática do eugenol. ( $t_R = 4,8$ min ; $t_R = 7,5$ min). .....	41
<b>Figura 28.</b> Aspecto macroscópico da bucha vegetal com F-AP15 imobilizada antes (A) e após (B) a reação. ....	43
<b>Figura 29.</b> Aspecto macroscópico do gel de ágar com F-AP15 imobilizada antes (A) e após (B) a reação. ....	44

### LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Mecanismo para a formação de epóxidos utilizando perácidos. ....	17
<b>Esquema 2.</b> Epoxidação quimio-enzimática catalisada por lipase .....	18
<b>Esquema 3.</b> Epoxidação quimio-enzimática do (+)-3-careno. ....	18
<b>Esquema 4.</b> Reação de transesterificação enzimática do citrionelol com acetato de vinila catalisada pela CALB. ....	23
<b>Esquema 5.</b> Epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla com a CALB. .	24
<b>Esquema 6.</b> Imobilização da F-AP15 em bucha vegetal .....	25
<b>Esquema 7.</b> Preparação e imobilização da lipase em gel de ágar. ....	26
<b>Esquema 8.</b> Reação de transesterificação enzimática do citrionelol com acetato de vinila catalisada pela CALB. ....	28
<b>Esquema 9.</b> Epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla utilizando CALB como biocatalisador. ....	30

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação das enzimas segundo a UIBBM.....	5
<b>Tabela 2.</b> Classificação de terpenos.....	14
<b>Tabela 3.</b> Efeito do solvente orgânico na epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla.....	37
<b>Tabela 4.</b> Conversões para epoxidação quimio-enzimática de outros terpenos.....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS

CALB = lipase B de *Candida antarctica*

$\text{CDCl}_3$  = clorofórmio deuterado

CG = cromatografia gasosa

Col. = colaboradores

ee = excesso enantiomérico

g = gramas

h = horas

IV = infravermelho

L = litro

Log P = logaritmo do coeficiente de partição octanol/água

mCPBA = ácido *meta*-cloroperbenzóico

mL = mililitro

MTBE = éter t-butil metílico

N° = número

pH = potencial hidrogeniônico

RMN  $^1\text{H}$  = ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RPM= rotação por minuto

UIBBM = União internacional de bioquímica e biologia molecular

UPH = ureia peróxido de hidrogênio

$\sigma$  = sigma

## Resumo

Os epóxidos são éteres que possuem em sua estrutura um átomo de oxigênio incorporado em um anel de três membros, muito reativos e importantes intermediários sintéticos para formação de dióis e outros compostos bifuncionais. Podem ser preparados a partir de terpenos, substâncias responsáveis pelo aroma e sabor e de grande relevância biológica.

Epóxidos derivados de terpenos podem ser obtidos a partir da catálise enzimática, utilizando lipases como biocatalisadores. Esta reação ocorre por meio da formação de perácido *in situ* para posterior oxidação da ligação dupla C=C do terpeno, formando o epóxido. As lipases podem ser imobilizadas em suportes, tais como bucha vegetal e gel de ágar, para aumentar a estabilidade e possibilitar a reutilização destes sistemas catalíticos.

Neste trabalho foram estudados diversos parâmetros reacionais na epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla, tais como massa de lipase (CALB), tempo de reação (3-24h), efeito do solvente orgânico e adição consecutiva ou não de UPH. Por meio da adição controlada de UPH, obteve-se o epóxido derivado do acetato de citroneíla com conversões de até 91% utilizando diclorometano como solvente, e de >99% utilizando acetato de etila. Os parâmetros otimizados foram aplicados na epoxidação de outros terpenos tais como  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -pineno, 3-careno, eugenol e citronelal. As conversões foram determinadas por  $^1\text{H}$ -RMN ou CG.

A lipase de *Rhizopus oryzae* (F-AP15) foi utilizada na epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla na forma livre, obtendo 17% de conversão. Após a imobilização em gel de ágar e bucha vegetal, as conversões foram de 17% e 8%, respectivamente.

**Palavras-chave:** lipases, epóxidos, terpenos.

## **1.Introdução**

A biotecnologia é um campo multidisciplinar que está intimamente relacionado a processos comprometidos com a Química Verde, possibilitando a união do economicamente viável com o ecologicamente correto. Dentre os estudos na área da biotecnologia, a aplicação de enzimas como biocatalisadores em processos industriais é uma alternativa às metodologias convencionais. <sup>1</sup>

Diversas transformações ocorrem simultaneamente nos sistemas vivos. Esse complexo conjunto de reações químicas são promovidas por centenas de milhares de enzimas que catalisam a conversão de substratos a produtos. <sup>2</sup>

As enzimas são responsáveis por catalisar reações das mais simples às mais complexas, com alta especificidade e velocidade, promovendo transformações que podem ocorrer em uma única etapa, diminuindo a geração de resíduos e aumentando a economia atômica. <sup>2</sup>

As lipases são enzimas que realizam reações de hidrólise de diversos substratos, sendo caracterizadas pela ampla especificidade, convertendo diversos substratos a seus respectivos produtos. São aplicadas na reação de epoxidação, a partir da formação *in situ* de perácidos. <sup>3</sup>

Os epóxidos são intermediários sintéticos importantes para a obtenção de compostos bifuncionais de extrema relevância comercial. Estas substâncias podem ser produzidas a partir de terpenos, que são compostos encontrados em animais, plantas e micro-organismos, e são responsáveis pelas características de aroma e sabor. Destacam-se pela atividade biológica que desempenham. A produção de epóxidos catalisada por lipases a partir dessas substâncias tende a valorizá-las e fomenta o desenvolvimento de novos compostos com atividade biológica. <sup>4</sup>

Devido a fatores químicos, físicos ou biológicos, as enzimas em geral podem ter seu uso comprometido pela possibilidade da perda da atividade catalítica. Para minimizar esses efeitos, técnicas de imobilização dos biocatalisadores têm sido desenvolvidas. <sup>3</sup>

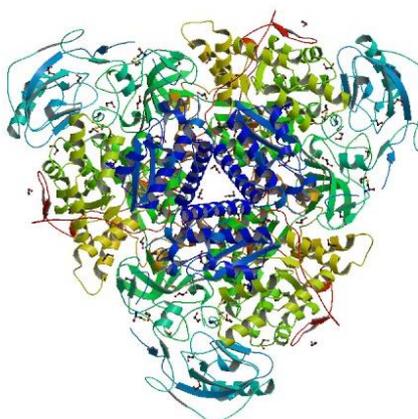
Neste contexto, este trabalho baseou-se no estudo de epoxidação quimio-enzimática de terpenos utilizando lipases como biocatalisadores.

## 2.Revisão da literatura

### 2.1. Enzimas

As células vivas são um sistema complexo onde ocorrem diversas reações químicas. Para que essas reações ocorram, é necessário a presença de catalisadores, que neste caso são as enzimas. O potencial catalítico dessas biomoléculas foi constatado há milênios no antigo Egito, por meio da fermentação na produção de queijos, vinhos, cervejas e para cozimento. <sup>5</sup>

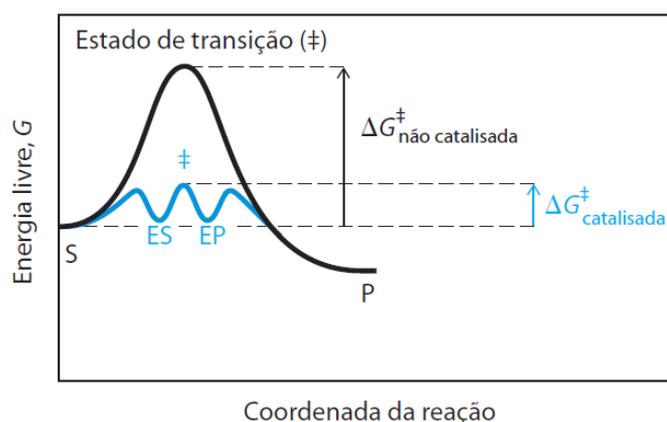
Em 1700 a catálise biológica foi reconhecida através de estudos realizados com secreções estomacais provenientes da digestão de carne. A partir daí, outros pesquisadores contribuíram para a elucidação dos conceitos que envolviam esses fenômenos. Em 1850, Louis Pasteur concluiu que a fermentação de açúcares em álcool por levedura era catalisada por “fermentos” e que esse processo só poderia ocorrer em células vivas. Esse ponto de vista, conhecido como vitalismo, permaneceu por décadas. A partir de extratos de levedura sem célula, Eduard Buchner concluiu em 1897, que a atividade era mantida mesmo fora do ambiente celular, marcando o fim da visão vitalista e contribuindo para o desenvolvimento da engenharia enzimática. Mais tarde Frederick W. Kühne nomeou as moléculas detectadas por Buchner como enzimas (do grego *enzymos*, levedado). A estrutura das enzimas foi elucidada por James Sumner em 1926 a partir da cristalização da uréase presente no feijão, concluindo que estas moléculas eram inteiramente compostas por proteínas (**Figura 1**). <sup>6-8</sup>



**Figura 1.** Representação estrutural da urease proveniente do “feijão-de-porco” (*Canavalia ensiformis*).<sup>9</sup>

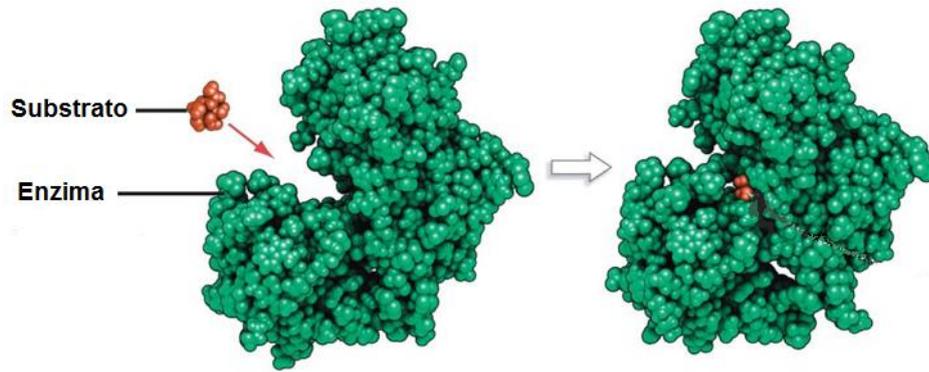
As enzimas são biomoléculas que possuem um poder catalítico extraordinário, capazes de aumentar a velocidade das reações na ordem de  $10^6$  até  $10^{23}$  vezes quando comparadas às não catalisadas. Além disso, destacam-se devido ao seu alto grau de especificidade e por catalisarem reações em soluções aquosas, sob condições amenas de temperatura e pH. Poucos catalisadores não biológicos apresentam o mesmo desempenho nessas condições.<sup>6,10</sup>

A capacidade catalítica das enzimas é atribuída ao fato de possuírem em sua estrutura uma região denominada sítio ativo responsável por induzir o substrato a se aproximar com uma orientação favorável, promovendo um estado de transição que diminui a energia de ativação necessária para que a reação ocorra (**Figura 2**). Essa característica é essencial para organismos vivos, tendo em vista que grande parte dos processos químicos seriam impossibilitados cineticamente sem a presença de enzimas para catalisá-los.<sup>6,7</sup>



**Figura 2.** Diagrama de energia para uma reação catalisada e uma não catalisada.<sup>6,7</sup>

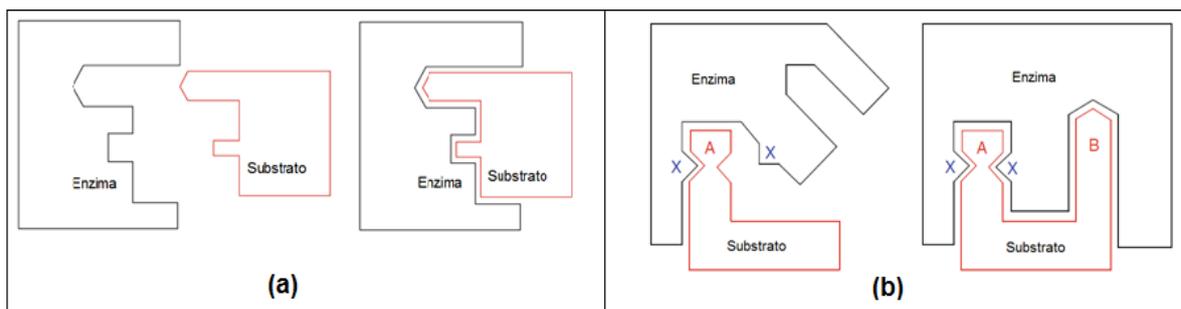
As enzimas, com exceção de um pequeno grupo de ácido ribonucléico (RNA), são proteínas que possuem em sua estrutura uma cavidade composta por resíduos de aminoácidos, denominada sítio ativo. O reconhecimento molecular de um substrato ocorre neste ambiente, através de interações eletrostáticas, van der Waals e/ou por ligações de hidrogênio, resultando na formação do complexo enzima-substrato (ou complexo de Michaelis-Menten). Na **Figura 3** está representado o sítio ativo das enzimas e a aproximação do substrato.<sup>6,7,11</sup>



**Figura 3.** Representação do sítio ativo da enzima e aproximação do substrato. <sup>6,7,11</sup>

Com o intuito de elucidar o funcionamento das enzimas, Emil Fisher propôs em 1894 o primeiro modelo denominado “chave e fechadura”. A proposta era que a especificidade de uma enzima para o seu substrato surge a partir da complementaridade de suas formas geométricas, assumindo uma estrutura rígida do sítio ativo (**Figura 4a**). Contudo, este modelo não explicava a capacidade que diversas enzimas têm de catalisar reações com diferentes substratos. <sup>3,7</sup>

Um novo modelo baseado em estudos de cinética enzimática foi proposto pelo bioquímico americano Daniel E. Koshland Jr. em 1960. Ele assumiu que um complexo enzima-substrato era formado a partir de um ajuste estrutural do sítio ativo da enzima para receber o substrato. Esse modelo ficou conhecido como “ajuste induzido” (**Figura 4b**). <sup>3,7</sup>



**Figura 4.** Representação esquemática do modelo “chave e fechadura” (a) e do “ajuste induzido” (b). <sup>3,7</sup>

As enzimas são classificadas de acordo com as reações que catalisam e segundo o Enzyme Data Base, organizado pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM), existem cerca de 7214 enzimas registradas e classificadas. <sup>3,12</sup>

**Tabela 1.** Classificação das enzimas segundo a UIBBM. <sup>3,12</sup>

<b>Classe</b>	<b>Nome</b>	<b>Tipo de reação que catalisa</b>
1	Oxirredutases	Oxidação e redução
2	Transferases	Transferência de grupos funcionais
3	Hidrolases	Reações de hidrólise
4	Liasas	Adição ou eliminação de pequenas moléculas (C=C, C=N, C=O)
5	Isomerasas	Reações de isomerização
6	Ligases	Formação ou clivagem de ligações C-O, C-S, C-N, C-C via condensação

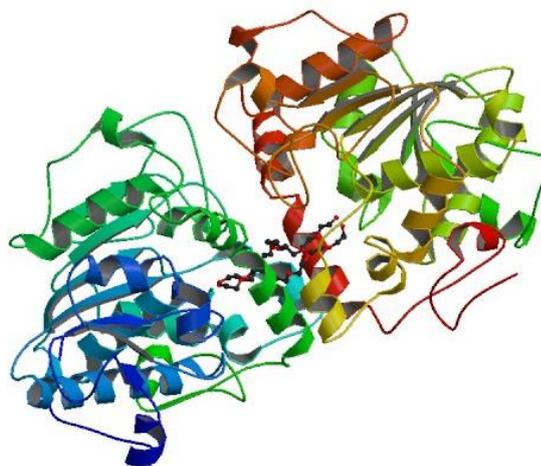
O potencial sintético e a especificidade dessas biomoléculas tem sido amplamente estudado, e a partir de 1980 houve um aumento exponencial no interesse na área de biotransformação e sua aplicação industrial no ramo farmacêutico, alimentício, cosmético e de química fina. Além da versatilidade desses biocatalisadores, sua aplicação em reações químicas vai ao encontro com os conceitos da Química Verde, tornando-os ainda mais interessantes. <sup>13,14</sup>

As enzimas pertencentes à classe das hidrolases são responsáveis por reações de hidrólise, podendo gerar uma quantidade considerável de produtos devido à sua capacidade de catalisar reações com distintos substratos. Essa classe de enzimas será estudada ao longo do trabalho, mais especificamente as lipases, devido à sua relevância para a biocatálise. <sup>15,16</sup>

### 2.1.1 Lipases

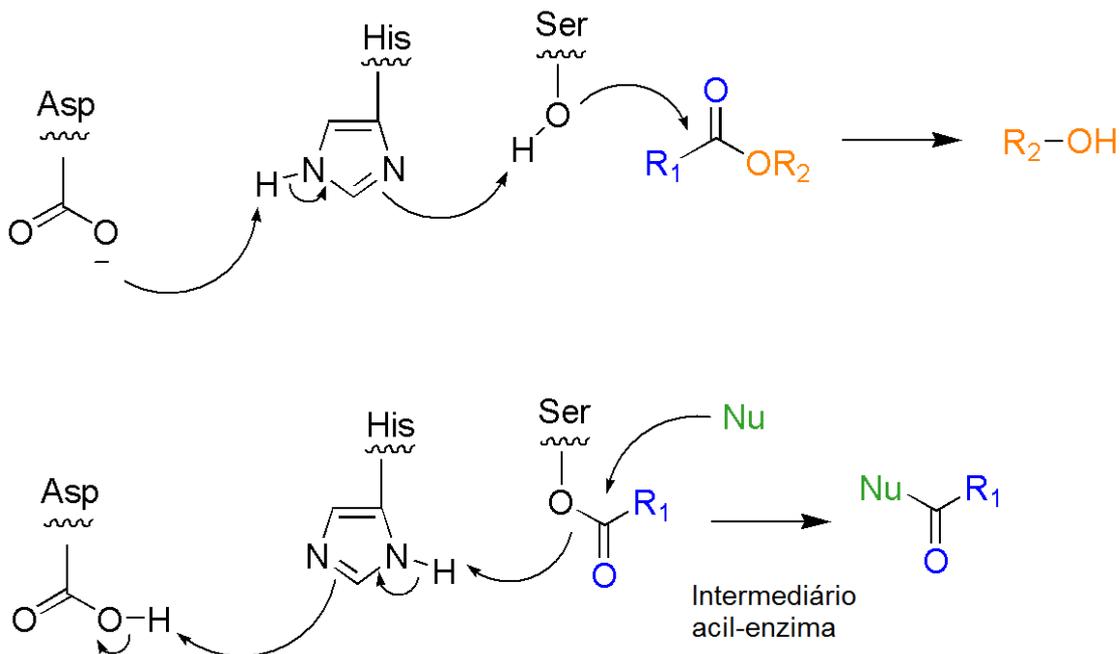
As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas pertencentes à classe das hidrolases encontradas em fungos, bactérias, animais e plantas. Biologicamente, são responsáveis pela hidrólise de ésteres, por exemplo, os triacilgliceróis em ácidos graxos livres e glicerol. <sup>8,13</sup> São caracterizadas com massa molar variando de 20 a 75 kDa, o ponto isoelétrico na faixa de pH 4,0 a 7,5 e a atividade ótima entre pH 6,5 e 8,5. Seu sítio ativo é formado por uma tríade catalítica composta pelos aminoácidos serina, histidina e ácido aspártico. <sup>15, 17-19</sup>

Os micro-organismos são mais interessantes do ponto de vista comercial, pois produzem enzimas extracelulares, facilitando o isolamento e diminuindo o custo para o processo em grande escala. Além disso, as lipases provenientes de micro-organismos possuem alto desempenho e são aplicadas no processamento industrial de alimentos, cosméticos, detergentes, biodiesel, produtos farmacêuticos, entre outros. A exemplo, tem-se as lipases provenientes dos fungos *Aspergillus* sp e de *Candida* sp e das bactérias *Pseudomonas* sp. A lipase de *Candida antarctica* B (CALB) proveniente do fungo *Candida* sp está representada na **Figura 5**. <sup>18,20</sup>



**Figura 5.** Representação estrutural da lipase *Candida antarctica* B. <sup>21,22</sup>

O mecanismo de catálise para as lipases, assim como para todas as enzimas pertencentes à classe das serina hidrolases, propõe a formação de um intermediário acil-enzima por meio da ligação entre um doador acila e o resíduo serina presente no sítio ativo da enzima (**Figura 6**). <sup>3</sup>

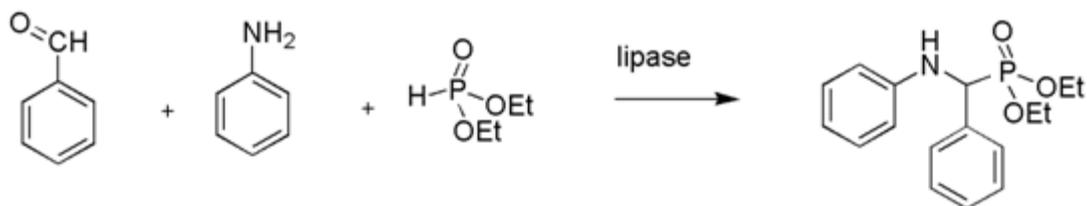


**Figura 6.** Mecanismo de catálise das serina hidrolases (Adaptado da ref. 3)

Devido a proximidade espacial entre os três grupos da tríade catalítica (Asp, His, Ser), ocorre uma diminuição no pKa do grupo hidroxila da serina, tornando possível um ataque nucleofílico à carbonila do substrato. Através de uma ligação covalente, o substrato forma o intermediário acil-enzima. Neste momento, ocorre o ataque do nucleófilo à carbonila do intermediário acil-enzima, regenerando a enzima e liberando o produto.<sup>3</sup>

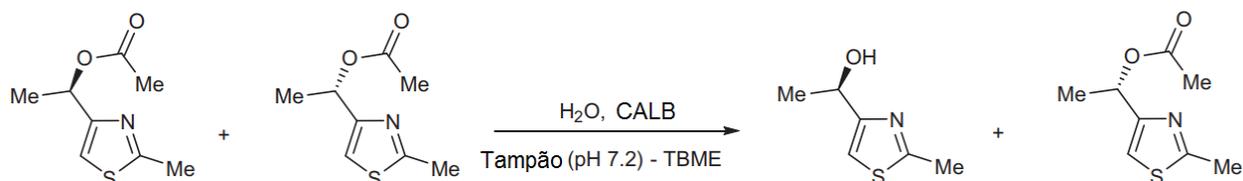
A habilidade que as enzimas possuem de catalisar reações distintas das reações fisiológicas e naturais tem sido amplamente descrita na literatura. Essa versatilidade catalítica é observada nas lipases, que atualmente são utilizadas para catalisar reações de hidrólise de ésteres, esterificação, transesterificação, aminólise, resolução de alcoóis e epoxidação, em ambientes aquosos ou orgânicos anidros. Isso é possível devido as lipases possuírem especificidade para distintos substratos.<sup>15</sup>

Guezane e *col.* estudaram a formação de  $\alpha$ -aminofosfonatos a partir da reação entre benzaldeído e anilina catalisada por diversas lipases, obtendo 94% de conversão utilizando a CALB e sem a utilização de solventes (**Figura 7**).<sup>23</sup>



**Figura 7.** Formação de  $\alpha$ -aminofosfonatos catalisada por lipases. <sup>23</sup>

Estudos de resolução de alcoóis, mais especificamente de 1-heteroariletanóis, foram realizados por Kucher e *col.* O (*R*)-1-(2-metiltiazol-4-il)etan-1-ol, foi obtido a partir da hidrólise dos respectivos ésteres utilizando a lipase de *C. antarctica B* (CALB) em solução de fosfato de sódio (pH 7,2). Nestas condições, o produto foi obtido com conversão de 90% e excesso enantiomérico (e.e.) >99% (**Figura 8**). <sup>24</sup>



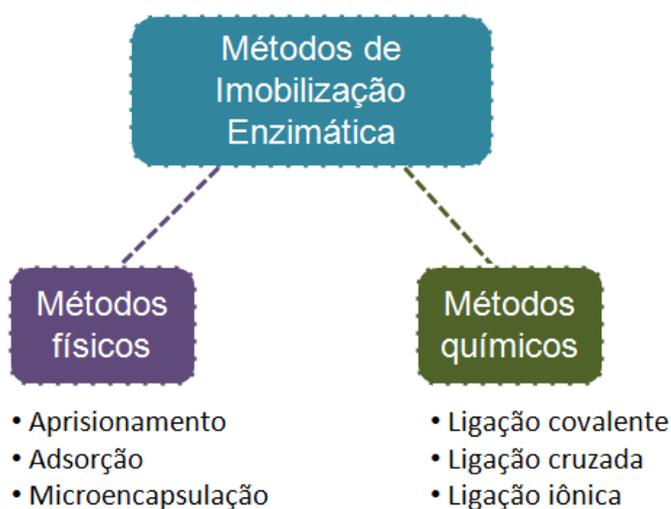
**Figura 8.** Hidrólise enzimática para obtenção do (*R*)-1-(2-metiltiazol-4-il)etan-1-ol. <sup>24</sup>

É notável o interesse industrial frente à capacidade catalítica das lipases, tornando necessário o desenvolvimento de técnicas que possibilitam o reuso e o aumento da estabilidade destes sistemas catalíticos. Neste contexto, a imobilização destes biocatalisadores vem sendo amplamente estudada. <sup>25</sup>

## 2.2 Imobilização

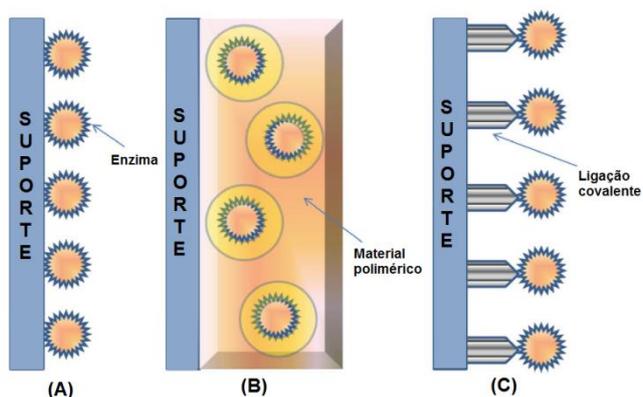
A imobilização consiste no confinamento do biocatalisador em uma região restrita que seja capaz de manter a sua atividade. Na catálise enzimática, estas técnicas são utilizadas para aperfeiçoar os processos, com o intuito de garantir a possibilidade de reutilização desses sistemas e proteger a enzima dos ambientes menos favoráveis à sua estabilidade. Para que a reutilização seja possível, a estabilidade da enzima imobilizada deve ser elevada, garantindo que ela resista aos diversos ciclos de reuso.<sup>26-28</sup>

Os processos de imobilização podem ocorrer através de métodos físicos e químicos, como os descritos na **Figura 9**.<sup>26</sup>



**Figura 9.** Métodos de imobilização de enzimas (adaptado da ref. 26)

A imobilização de enzimas por meio de processos físicos ocorre através de interações hidrofóbicas e de van der Waals e ligações de hidrogênio, sendo um método reversível e controlado por parâmetros físico-químicos. A imobilização de enzimas através de processos químicos é irreversível e consiste na ligação covalente ou iônica da enzima a diferentes matrizes. A **Figura 10** mostra os principais métodos utilizados para a imobilização de enzimas.<sup>26-29</sup>



**Figura 10.** Principais métodos de imobilização: (A) adsorção, (B) aprisionamento e (C) ligação covalente e/ou cross-linking. (adaptado da ref. 29)

O método de adsorção envolve a ligação da enzima ao suporte por meio de ligações não covalentes. As matrizes utilizadas são as mais diversas, por exemplo, cerâmica, alumina, carvão ativado, quitosana, gelatina, celulose, entre outros. O método de aprisionamento envolve a ligação cruzada da enzima a um polímero, e ou biopolímero, por exemplo, alginato, poliácridamida, ágar, entre outros. O método de ligação covalente e cross-linking consistem na ligação covalente entre a enzima e a matriz.<sup>26,27</sup>

A **Figura 11** mostra alguns exemplos de suportes que podem ser usados para a imobilização de enzimas e microrganismos.



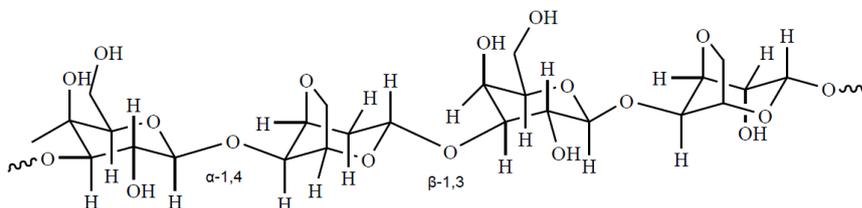
**Figura 11.** Exemplos de suportes para a imobilização de enzimas. (Fonte: o autor)

A escolha do método de imobilização, bem como a matriz, é de extrema importância, pois as propriedades da catálise enzimática com a enzima imobilizada são regidas pelas interações do biocatalisador com o suporte.<sup>27,28,30</sup>

Neste contexto, serão estudados dois métodos físicos de imobilização, sendo eles o de aprisionamento e adsorção. As matrizes utilizadas serão o gel de ágar e a bucha vegetal.

### 2.2.1. Ágar

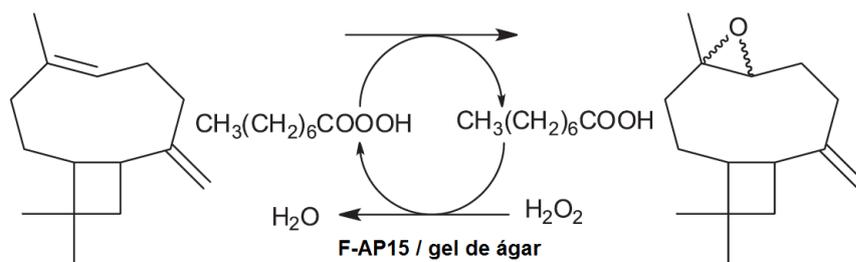
O ágar-ágar é um polissacarídeo extraído de algas da classe das *Rhodophyceae* e possui aplicações como agente gelificante nas indústrias de alimentos, cosméticos, produtos farmacêuticos, biomedicina e biotecnologia. É considerado um biopolímero inerte biocompatível, não-tóxico e econômico, e possui em sua estrutura unidades de  $\beta$ -1,3 D-galactose,  $\alpha$ -1,4 3,6-anidro-L-galactose e a agarosectina, sendo esta última responsável pela característica de gelificação do ágar. As estruturas dos monômeros deste polímero estão representadas na **Figura 12**.<sup>31-33</sup>



**Figura 12.** Estrutura dos monômeros do ágar.<sup>31,32</sup>

Dentre suas características, o ágar possui excelente estabilidade térmica entre 80 a 85 °C, possibilitando sua aplicação na imobilização de enzimas termossensíveis, protegendo-as dentro de sua rede polimérica e mantendo a atividade catalítica.<sup>33</sup>

Silva e Nascimento estudaram a imobilização da lipase F-AP15 em gel de ágar para a epoxidação quimio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno, obtendo uma conversão de 96% ao produto oxidado. O gel de ágar mostrou-se um suporte vantajoso, mantendo a atividade catalítica na presença de meio orgânico, agente oxidante e líquidos iônicos (**Figura 13**).<sup>34</sup>



**Figura 13.** Epoxidação quimioenzimática do  $\beta$ -cariofileno catalisada pela lipase F-AP15 imobilizada em gel de ágar.<sup>34</sup>

### 2.2.2. Bucha vegetal

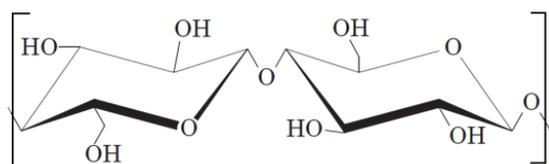
A bucha vegetal é derivada da fruta madura e seca da *Luffa cylindrica* pertencente à família *Cucurbitaceae*. Amplamente comercializada para uso doméstico e de higiene pessoal, a bucha é muito comum em países tropicais e subtropicais. A **Figura 14** mostra a fruta madura e seca de *Luffa cylindrica*.<sup>35,36</sup>



**Figura 14.** Fruta madura e seca de *Luffa cylindrica*.<sup>36,37</sup>

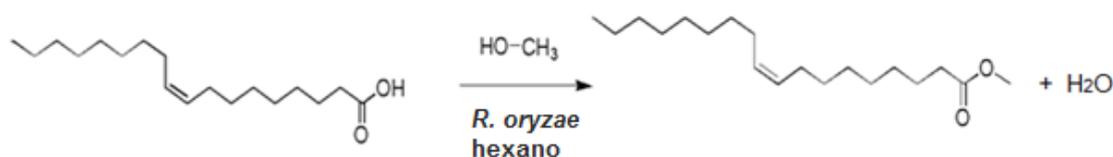
A rede fibrosa da bucha vegetal possui extensa área superficial proveniente do seu alto grau de porosidade, e é um material inerte, tornando-se um suporte interessante para imobilização. Suas fibras são compostas por celulose (55-90%) lignina (10-23%) e hemicelulose (8-22%).<sup>38,39</sup>

A celulose é composta pela união de moléculas de glicose através de uma ligação  $\beta$ -1,4 glicosídica e apresenta boa estabilidade química, capacidade de recuperação e resistência mecânica. Por ser o seu principal componente, estas mesmas características são observadas na bucha vegetal. A estrutura dos monômeros da celulose está representada na **Figura 15**.<sup>38-40</sup>



**Figura 15.** Representação estrutural dos monômeros da celulose.

Sattari e *col.* estudaram a síntese de oleato de metila a partir de uma reação de esterificação utilizando células de *Rhizopus oryzae* como biocatalisadores imobilizados em bucha vegetal, resultando em atividade de até  $13 \times 10^2$  U.mg<sup>-1</sup>, sendo maiores se comparadas com a atividade das células livres ( $3 \times 10^2$  U.mg<sup>-1</sup>). O éster foi obtido com conversões de até 80%.<sup>41</sup>



**Figura 16.** Síntese do oleato de metila utilizando a lipase de *R. oryzae*.<sup>41</sup>

Os sistemas contendo biocatalisadores imobilizados em gel de ágar e bucha vegetal podem ser utilizados para catalisar reações de terpenos ou derivados. Estes compostos serão descritos a seguir.

### 2.3 Terpenos e Aplicações

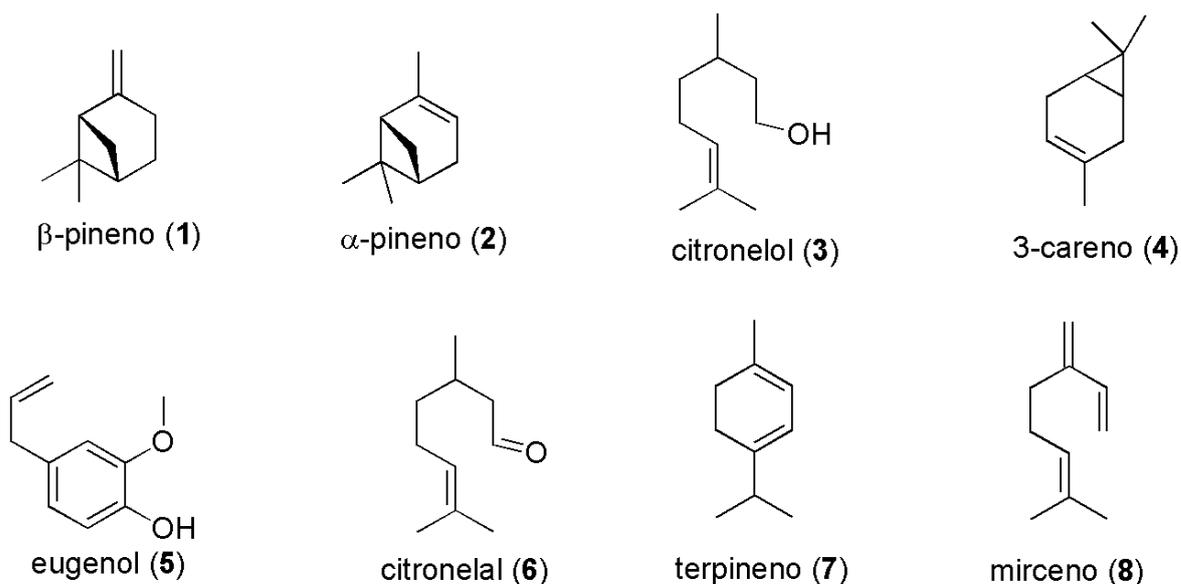
Animais e plantas produzem uma grande variedade de compostos orgânicos, tais como lipídeos, ácidos nucleicos, proteínas, terpenos, entre outros. Muitas destas substâncias são comuns a todas as espécies, sendo responsáveis pela formação de estruturas essenciais, denominadas como metabólitos primários. Já os metabólitos secundários podem ser comuns a todas as espécies ou produzidos por uma única espécie. Os terpenos pertencem à classe de metabólitos secundários, conferindo as características de aroma e sabor. E são eles os responsáveis por duas plantas serem fisicamente idênticas, mas uma ser inodora e a outra possuir um odor intenso e característico, por exemplo.<sup>42</sup>

O termo terpeno é proveniente da terebintina, uma resina encontrada nos troncos de plantas coníferas que possui odor característico, e a palavra terpeno é de origem grega e significa “cheiro agradável”. A definição estrutural foi proposta em 1887 por Wallach a partir de estudos feitos sobre a sua composição, concluindo que os terpenos são substâncias que contém unidades de isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno) em sua estrutura. O isopreno é considerado o bloco de construção destas substâncias e, portanto, a quantidade de átomos de carbono presentes em sua composição é sempre múltipla de cinco. Neste contexto, os terpenos são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno. Na **Tabela 2** está descrita a classificação dos terpenos.<sup>42</sup>

**Tabela 2.** Classificação de terpenos.<sup>42</sup>

Nome	Número de unidades de isopreno	Número de átomos de carbono
Hemiterpeno	1	5
Monoterpeno	2	10
Sesquiterpeno	3	15
Diterpeno	4	20
Sesterterpenos	5	25
Triterpenos	6	30
Tetraterpenos	8	40
Poliisoprenos	>8	>40
Carotenos	8	40

Além de unidades isoprênicas, podem estar contidos em sua estrutura diversos grupos funcionais tais como cetonas, álcoois e aldeídos, sendo então denominados terpenóides. Na **Figura 17**, estão representadas as estruturas de alguns terpenos.<sup>42,43</sup>



**Figura 17.** Estruturas de alguns terpenos.

Os terpenos são produzidos por uma grande variedade de animais, plantas e microorganismos, e desempenham um papel biológico importante. Os monoterpenos em plantas são responsáveis pela defesa contra pragas e sinalização para os agentes polinizadores. Estudos propõem o uso de suas propriedades para o desenvolvimento de inseticidas e pesticidas. Nos mamíferos, os terpenos estão envolvidos na estabilização das membranas celulares, vias metabólicas e como reguladores das reações enzimáticas. O colesterol e esteróis são derivados terpênicos.<sup>42, 44-46</sup>

Além das características conhecidas destes compostos, tais como aroma e sabor, modificações estruturais podem ser realizadas a fim de valorizar ainda mais esses produtos. Muitas das modificações descritas na literatura estão baseadas na reatividade da ligação dupla ou em grupos funcionais presentes nas estruturas dos terpenos.<sup>45,47</sup>

A biotransformação de terpenos tem sido explorada devido ao uso de condições reacionais brandas e a possibilidade de obtenção de produtos enantiomericamente puros. Além disso, os produtos obtidos através destes processos podem ser considerados naturais.<sup>45,48</sup>

Diversos trabalhos têm sido feitos sobre a oxidação de terpenos a partir da formação de perácidos *in situ* intermediados pela catálise enzimática.<sup>49</sup> Destaca-se

a possibilidade de utilizar os epóxidos gerados como intermediários sintéticos capazes de gerar dióis e compostos bifuncionais.

A seguir serão descritos os epóxidos e suas características, bem como métodos para obtê-los.

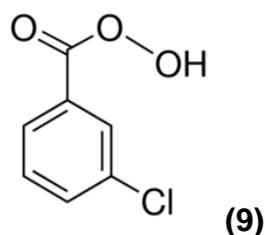
## 2.4 Epóxidos

Epóxidos, ou oxiranos, são éteres que possuem em sua estrutura um átomo de oxigênio incorporado em um anel de três membros por meio de duas ligações  $\sigma$ .<sup>11</sup> A tensão do anel de três membros confere maior reatividade aos epóxidos se comparados a outros éteres, tornando-os suscetíveis a reações com diversos nucleófilos, eletrófilos, ácidos, bases, agentes redutores e agentes oxidantes.<sup>50,51</sup>

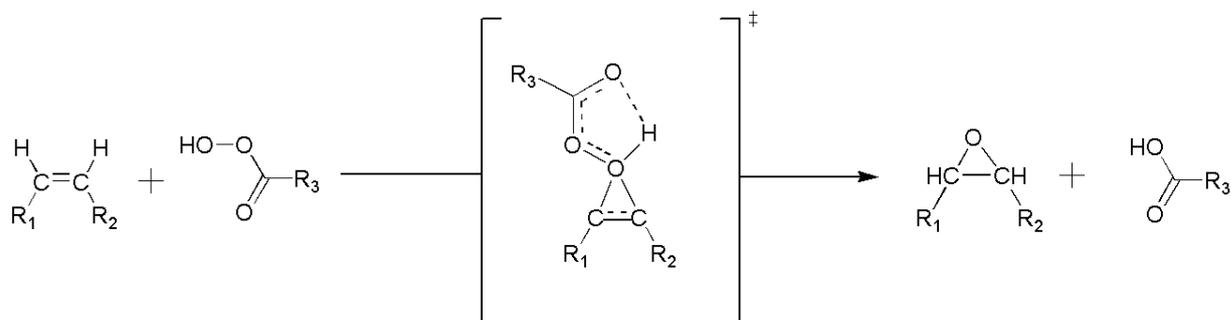
Devido a sua sensibilidade frente a uma ampla classe de reagentes, os epóxidos são considerados intermediários sintéticos importantes, pois possibilitam a formação de compostos bifuncionais como alcanolaminas e glicóis, além de olefinas substituídas, poliésteres, poliuretanos e resinas epóxidos, amplamente empregados na indústria de química fina. A epoxidação de óleos vegetais e ésteres de ácidos graxos fazem parte da função plastificante de diversos materiais plásticos, dentre eles o policloreto de vinila (PVC).<sup>52,53</sup>

A preparação de epóxidos é realizada a partir de uma reação de oxidação da ligação dupla carbono-carbono com o uso de reagentes responsáveis pela inserção do oxigênio. Esta reação foi amplamente explorada, e tradicionalmente utiliza catalisadores metálicos, peróxidos orgânicos ou perácidos como agentes oxidantes.<sup>50,54</sup>

Os perácidos são ácidos que possuem em sua estrutura um grupo  $-OOH$  e podem ser classificados como inorgânicos e orgânicos, onde o mais comum dentro da classe dos inorgânicos é o ácido peroxi(mono)sulfúrico. Aqueles classificados como orgânicos podem ser alifáticos ou aromáticos, sendo estes últimos os mais estáveis e normalmente obtidos na forma de sólidos cristalinos. O perácido orgânico aromático mais utilizado disponível comercialmente é o ácido *m*-cloroperbenzóico (*m*-CPBA) (**9**).<sup>50</sup>



A reação que descreve a formação de epóxidos a partir de olefinas e perácidos é conhecida como a Reação de Prilaschajew, reportada na literatura em 1908 e amplamente empregada atualmente. Esta reação é usualmente realizada em solventes apróticos de baixa polaridade, como diclorometano, clorofórmio, entre outros. No **Esquema 1** está representado o esquema reacional para a epoxidação de olefina utilizando perácido. <sup>50</sup>

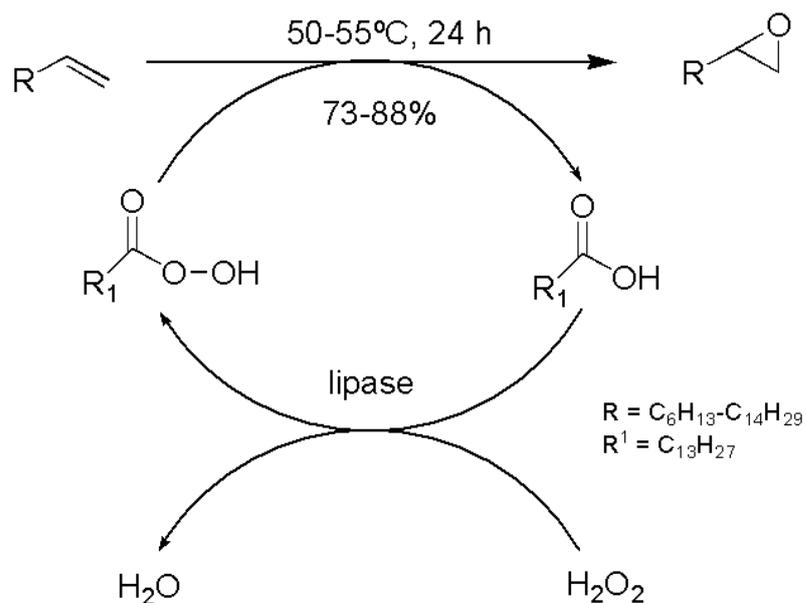


**Esquema 1.** Mecanismo para a formação de epóxidos utilizando perácidos. <sup>50</sup>

A proposta mecanística é de um ataque nucleofílico ao perácido que, estabilizado por meio de ligação de hidrogênio, gera um estado de transição onde as ligações C-O são formadas, resultando no epóxido e no ácido carboxílico. A estrutura de transição denominada *Butterfly* foi proposta por Bartlett e promoveu a elucidação do mecanismo para esta reação. <sup>50</sup>

Como descrito anteriormente, o ácido *m*-cloroperbenzóico é o perácido mais utilizado para reações de epoxidação, mas a alta reatividade lhe confere um caráter explosivo dificultando o seu uso em larga escala. <sup>50</sup>

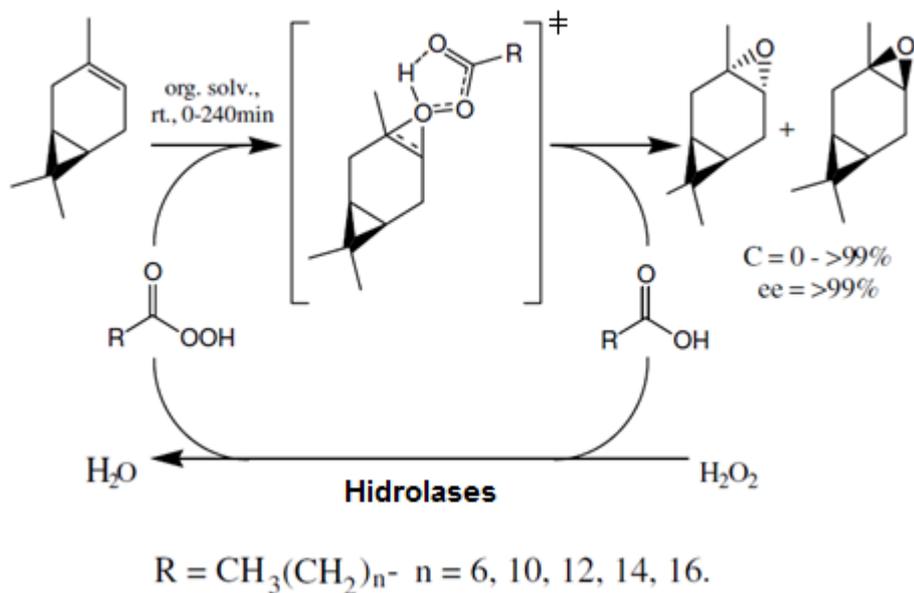
Como alternativa, Björkling desenvolveu no início da década de 1990 uma rota sintética para preparação de perácidos *in situ* a partir de ácidos carboxílicos e peróxido de hidrogênio por meio de catálise enzimática utilizando lipases. A reação originalmente estudada em seu trabalho e publicada está descrita no **Esquema 2**.<sup>55</sup>



**Esquema 2.** Epoxidação quimio-enzimática catalisada por lipase. <sup>55b</sup>

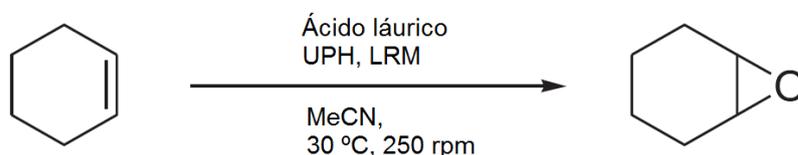
Trabalhos subsequentes de epoxidação quimio-enzimática foram baseados neste protocolo.

A reação de epoxidação quimio-enzimática do (+)-3-careno catalisada por CALB e utilizando peróxido de hidrogênio, foi estudada por Moreira e Nascimento, obtendo os respectivos epóxidos com conversões de até >99% e excesso enantiomérico (ee.) de >99% (**Esquema 3**). <sup>57</sup>



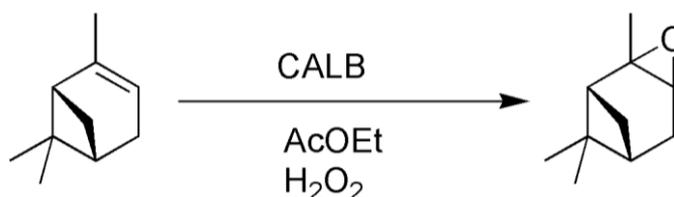
**Esquema 3.** Epoxidação quimio-enzimática do (+)-3-careno. <sup>57</sup>

A epoxidação quimio-enzimática do ciclohexeno com a formação de perácido *in situ* (com ácido láurico e ureia peróxido de hidrogênio-UPH) foi estudada por Méndez-Sánchez e *col.* formando o produto oxidado com conversão >91%. A reação foi catalisada pela lipase de *Rhizomucor miehei* (LRM) e está representada na **Figura 18.**<sup>56</sup>



**Figura 18.** Epoxidação quimio-enzimática do ciclohexeno catalisada pela LRM.<sup>56</sup>

Recentemente, Meyer-Waßewitz e *col.* avaliaram os diversos parâmetros que influenciam a epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno com acetato de etila e catalisada pela lipase imobilizada de *C. antarctica* B (CALB), bem como o progresso da reação em termos cinéticos. A reação está representada na **Figura 19.**<sup>49</sup>



**Figura 19.** Epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno.<sup>49</sup>

Dando continuidade aos estudos relacionados às reações de epoxidação, neste trabalho serão descritos os resultados obtidos na epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla, 3-careno,  $\beta$ -pineno, entre outros terpenos, utilizando CALB e lipase de *Rhizopus oryzae* (F-AP15) livre e imobilizada em bucha vegetal e gel de ágar.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Realizar reações de per-hidrólise do ácido hexanóico catalisada por lipases (imobilizadas ou não) para a formação do respectivo perácido e a utilização deste na oxidação *in situ* de monoterpenos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Preparar e caracterizar por técnicas espectroscópicas de  $^1\text{H}$  RMN e IV o acetato de citroneíla usando a CALB como catalisador.
- Avaliar o uso das lipases de *C. antarctica* (CALB) e de *Rhizopus oryzae* (F-AP15), na epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla utilizando uréia de peróxido de hidrogênio (UPH) como doador peróxido.
- Analisar o efeito da variação na massa da CALB, tempo de reação (3-24h), solventes orgânicos e a adição controlada de UPH na epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla.
- Preparar o epóxido derivado do  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -pineno, 3-careno, citronelal e eugenol pelo método quimio-enzimático utilizando as melhores condições obtidas na epoxidação do acetato de citroneíla.
- Imobilizar a lipase de *Rhizopus oryzae* (F-AP15) em gel de ágar e em bucha vegetal, e usar estes suportes como biocatalisadores na epoxidação do acetato de citroneíla.
- Comparar com os resultados obtidos com a lipase não imobilizada.
- Isolar e caracterizar os epóxidos obtidos através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ( $^1\text{H}$ -RMN).
- Comparar os resultados obtidos com outros descritos na literatura.

## **4. Metodologia**

### **4.1 Materiais**

Os reagentes e solventes que serão utilizados possuem grau de pureza >95% ou são P.A.

- Aldrich: ácidos hexanóico (99,5%), clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) (99,8%), uréia de peróxido de hidrogênio (UPH) (97%), citrônolol (95%).
- Vetec: peróxido de hidrogênio (30%), diclorometano (99,5%), ciclohexano (99%), *t*-butanol (99%), éter *t*-butil-metílico (99,5%), acetato de vinila (99%).
- Grupo Química: acetato de etila, etanol (99,5%).
- Reagen: hexano (98,5%).
- Fluka Chemika: β-pineno (80%), α-pineno (80%).
- F. Maia: tetrahidrofurano (THF).
- SAFC: citrônolol.
- Geroma do Brasil: eugenol.
- Carlo Herba: acetona (99,5%).
- Cromoline: metanol (99,8%).
- Nuclear: clorofórmio (99,8%), sulfato de magnésio anidro (98%).
- Dinâmica: éter etílico.
- Acros Organics: 3-careno (90%).

As lipases utilizadas foram recebidas como doação da Novozymes e da Amano Pharmaceutical CO e serão descritas a seguir.

- Novozymes: lipase de *Candida antarctica* (imobilizada em macroporos de resina acrílica) (Novozyme 435-CALB) (10.000 PLU/g<sup>a</sup>); Lipozyme 435 (imobilizada e geneticamente modificada a partir da *Mucor miehei*).
- Amano: lipase de *Rhizopus oryzae* (F-AP15) (150u/mg<sup>b</sup>).

---

<sup>(a)</sup>PLU/g é uma unidade relacionada a síntese de ésteres, expressa em unidades de laurato de propila. A reação utilizada é omitida na ficha técnica. <sup>65</sup>

<sup>(b)</sup> u/mg sólido é a quantidade necessária para liberar 1,0 μmol/min de ácidos graxos de um triacilglicerol a pH 7,2 e 37°C

## 4.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados neste trabalho estão localizados no laboratório 301/306 do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina e serão descritos a seguir:

- Agitador orbital: Certomat MO
- Agitador magnético: Dist
- Banho termostatizado: MQBTZ99-20 Microquímica
- Rota-evaporador: Buchi 461waterbath
- Balanças analíticas: Sartorius Basic, Marte A500, AND Ek-200i
- Espectrômetro de ressonância magnética (RMN  $^1\text{H}$ ) – Varian400MHz
- Banho de ultrassom: UltrasonicCleaner Thornton T1140
- Espectrofotômetro de Infravermelho: Prestige Shimadzu 21. <sup>1</sup>
- Cromatógrafo a gás (CG Agilent Tecnologia 7820 A), equipado com coluna apolar (Agilent HP-5-M30)

<sup>1</sup> Equipamento disponível no Laboratório 202/204 do Departamento de Química – Polimat

## 4.3. Segurança no laboratório e tratamento de resíduos

Laboratórios de química são locais de trabalho que possuem certo grau de periculosidade, e por este motivo deve-se trabalhar com atenção e tomar certas precauções.

Ao longo deste trabalho, alguns solventes utilizados são classificados como nocivos ou que oferecem risco à saúde, tais como diclorometano, clorofórmio e metanol. Por este motivo, foi necessária atenção especial no manuseio destas substâncias e utilização de equipamento de proteção individual (EPI), tais como luvas e guarda-pó. Os solventes mais voláteis foram manuseados em capela ou em locais bem ventilados, de acordo com o que é indicado pelas normas dispostas no Manual de Regras Básicas de Segurança Para Laboratórios de Química.

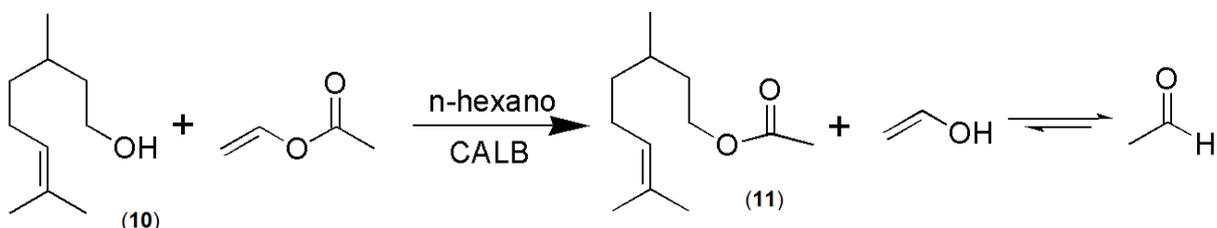
O reagente de partida para estes estudos foi preparado a partir de resíduos de reações anteriores do grupo, onde existiam misturas do álcool (citronelol) e do éster (acetato de citroneíla) referente a estudos de transesterificação cujas conversões não atingiram 100%.<sup>66</sup> A metodologia para o preparo do éster está descrito em Procedimentos Experimentais (pág. 23). Portanto, a preocupação com o destino de resíduos e sua possível reutilização vem sendo contemplada ao longo de todo o trabalho.

Os resíduos aquosos gerados, majoritariamente soluções aquosas de NaHCO<sub>3</sub>, foram devidamente descartados. Os solventes orgânicos foram rotaevaporados e armazenados para posterior destilação, buscando recuperá-los e reutilizá-los.

#### 4.4 Procedimentos experimentais

##### 4.4.1 Preparação do acetato de citroneíla

A partir de uma reação de transesterificação, adicionou-se em um erlenmeyer de 125 mL, citronelol (1,8 mL, 10 mmol), acetato de vinila (1,8 mL, 20 mmol), *n*-hexano (25 mL) e a CALB (50 mg). A mistura reacional foi mantida a 35°C, por 24 h em banho termostatizado. Terminada a reação, filtrou-se a mistura para a remoção da lipase, evaporou o solvente em rota-evaporador, e o produto (óleo incolor), foi analisado por espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN e espectrofotometria de infravermelho. A reação está representada no **Esquema 4**.



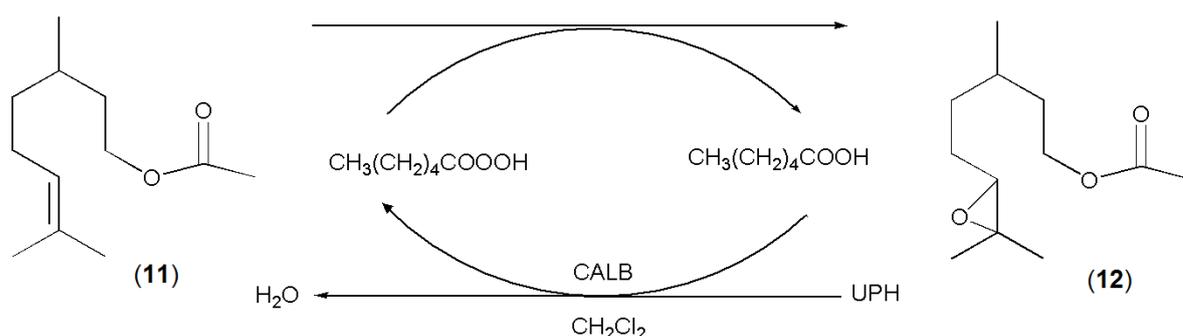
**Esquema 4.** Reação de transesterificação enzimática do citronelol com acetato de vinila catalisada pela CALB.

A formação do acetato de citroneíla (**11**) foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando como eluente uma mistura de hexano/acetato de etila (7:3 v/v), obtendo-se um valor de R<sub>f</sub> de 0,64.

A preparação do acetato de citroneíla foi realizada sete vezes a fim de obter uma quantidade suficiente para os estudos descritos ao longo deste trabalho. O rendimento médio foi de 90%.

#### 4.4.2 Epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla (Procedimento Geral)

Em um erlenmeyer de 125 mL, adicionou-se 1,0 mL (5 mmol) de acetato de citroneíla, 0,95 g (10 mmol) de uréia de peróxido de hidrogênio (UPH) em uma única adição ou em adições consecutivas (a cada 2h), 0,15 mL (1,0 mmol) do ácido hexanóico, a CALB (10-50 mg) e o diclorometano (20 mL). A mistura reacional foi mantida em banho termostatizado a 35°C por 3-24 h. A seguir, a parte sólida contendo a UPH e a lipase foi removida por filtração simples. A fase orgânica foi lavada com solução aquosa de NaHCO<sub>3</sub> (2x30mL). Após separação, foi seca com sal secante (MgSO<sub>4</sub> anidro) e rota-evaporada (**Esquema 5**).<sup>34, 49</sup>



**Esquema 5.** Epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla com a CALB.

As porcentagens de conversão aos produtos foram determinadas por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (<sup>1</sup>H-RMN), através da razão das áreas dos sinais da ligação dupla do reagente (5,0-5,1 ppm), em comparação com o do epóxido formado (2,6-2,7 ppm) obtidos de acordo com a **Equação 1**. O espectro de

$^1\text{H-RMN}$  de uma alíquota da reação será apresentado nos Resultados e Discussão, página 27.

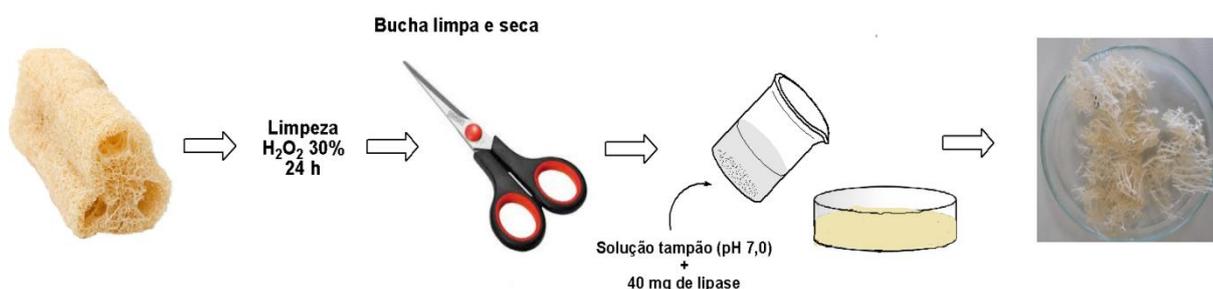
$$(\%)\text{conversão} = \frac{\text{área do sinal do produto}}{\text{área do sinal do produto} + \text{área do sinal do reagente}} \times 100\% \quad \text{Eq. 1}$$

Alguns parâmetros foram estudados nesta reação, tais como solvente orgânico, massa de lipase, tempo de reação, adição controlada ou não de UPH. Além destes estudos, utilizou-se a lipase de *R. oryzae* (F-AP15) livre e imobilizada em gel de ágar e bucha vegetal.

Os resultados obtidos para todos estes estudos serão descritos em Resultados e Discussão.

#### 4.4.3 Imobilização da lipase em bucha vegetal

Inicialmente a bucha foi limpa em uma solução de peróxido de hidrogênio 30%, sendo mantida por 24 h. Após a secagem, a bucha foi cortada em pequenos cubos e utilizada para a imobilização das lipases. 40 mg da lipase de *R. oryzae* (F-AP15) foi dissolvida em 20 mL de solução tampão fosfato de potássio (pH = 7,0) e colocada sobre 500 mg de bucha em uma placa de Petri. O sistema foi seco em capela por aproximadamente 24 h, obtendo o suporte com o biocatalisador. O procedimento está representado no **Esquema 6**.<sup>58</sup>

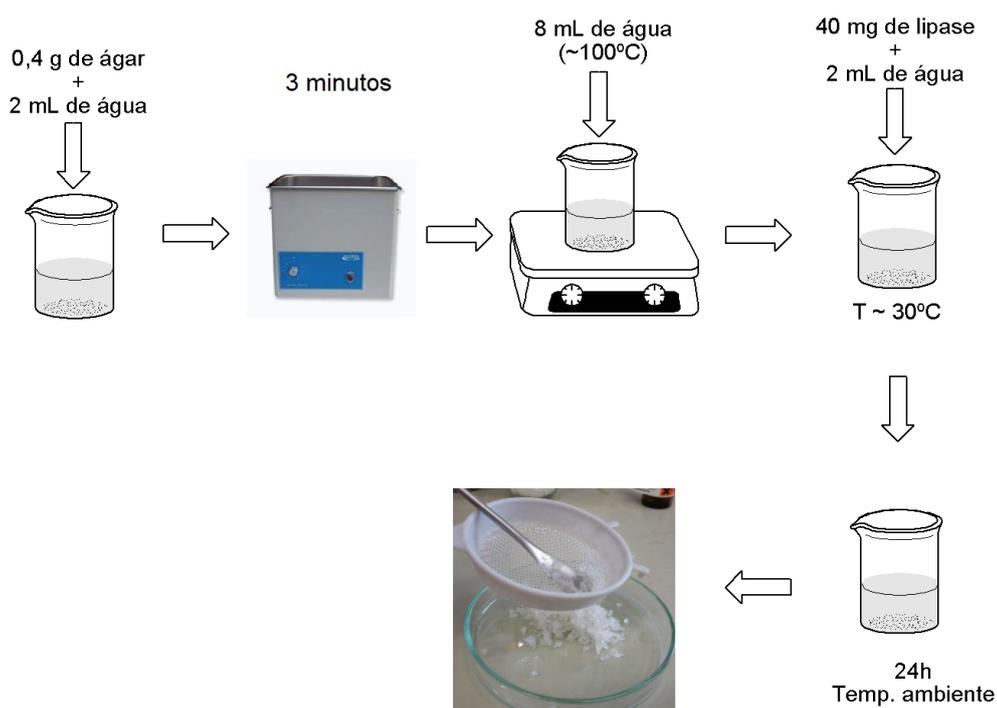


**Esquema 6.** Imobilização da F-AP15 em bucha vegetal

#### 4.4.4 Preparação do gel de ágar e imobilização da lipase

Um béquer contendo uma mistura de 0,40 g de ágar-ágar e 2 mL de água destilada foi mantido em um banho de ultrassom por 3 minutos. Posteriormente, foram adicionados 8 mL de água a 100 °C, mantendo-a sob aquecimento em uma chapa até que a solução se torne transparente. Em seguida, a mistura foi retirada da chapa de aquecimento e foi aguardada a gelificação até atingir 30-35 °C. Neste momento, 40 mg da F-AP15 dissolvida em 2 mL de água foram adicionados à mistura.<sup>34</sup>

Para que o gel atingisse uma consistência satisfatória, manteve-se à temperatura ambiente por um período de 24 h. Em seguida, o gel foi passado em uma peneira com o intuito de obter pequenos cubos de ágar com a lipase. O processo está representado no **Esquema 7**.<sup>34</sup>



**Esquema 7.** Preparação e imobilização da lipase em gel de ágar.

Todas as metodologias descritas anteriormente serão usadas ao longo deste trabalho para a obtenção de epóxidos derivados de monoterpenos a partir de reações químio-enzimática utilizando lipases como biocatalisadores.

## **5. Resultados e discussão**

Neste tópico serão apresentados os resultados obtidos na epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla variando massa de CALB, tempo de reação, solvente orgânico e adição controlada ou não de UPH. Em seguida, os melhores parâmetros foram aplicados na epoxidação quimio-enzimática do  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -pineno, 3-careno, citronelal e eugenol.

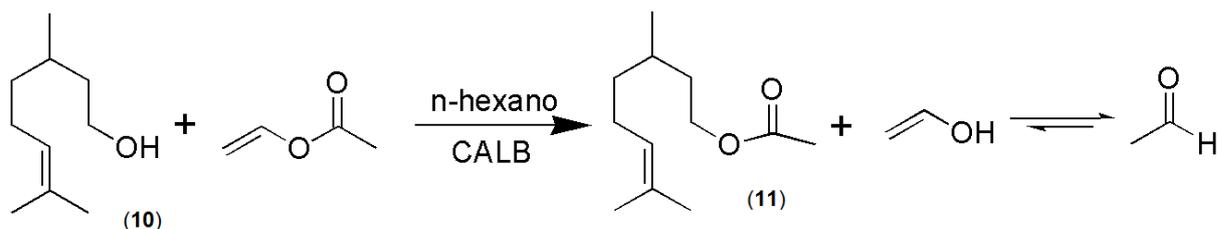
Além destes estudos utilizando a CALB, a lipase de *R. oryzae* (F-AP15) foi utilizada na epoxidação quimio-enzimática do éster (**11**) na sua forma livre e imobilizada em gel de ágar e bucha vegetal.

### **5.1. Preparação de caracterização do acetato de citroneíla**

O acetato de citroneíla foi preparado conforme a metodologia descrita no tópico “Procedimentos Experimentais” (pág. 23). Optou-se por utilizar o éster derivado do citronelol para evitar a competição da reação de transesterificação entre o álcool e o doador acila (ácido carboxílico) durante a epoxidação quimio-enzimática. Portanto, ao usar o éster, a reação de epoxidação é favorecida.

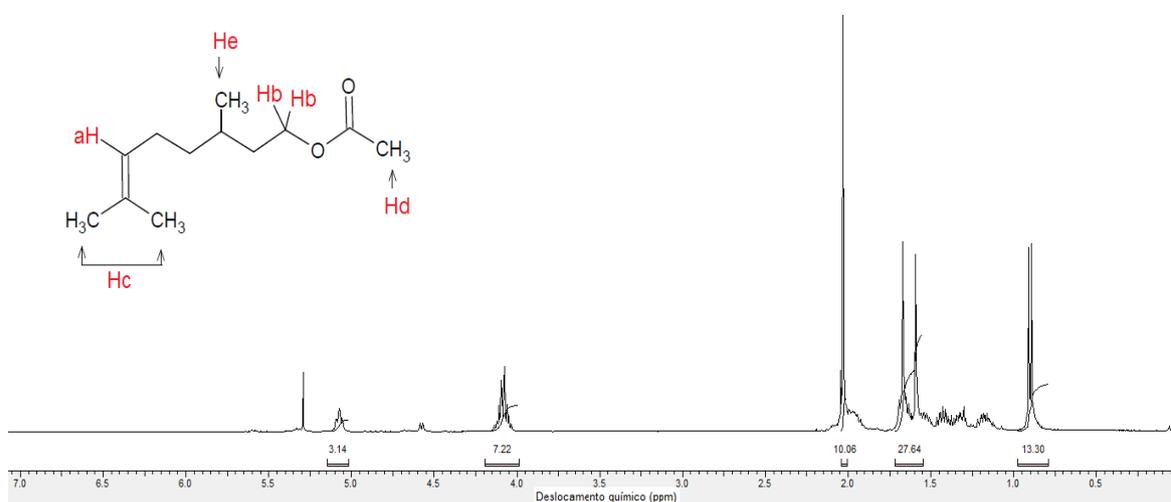
A CALB tem sido amplamente empregada em reações de esterificação e transesterificação, obtendo-se conversões satisfatórias aos correspondentes produtos.<sup>59</sup> Trabalhos anteriores realizados pelo grupo demonstraram a alta eficiência desta lipase para a transesterificação do citronelol, e por este motivo ela foi selecionada para a preparação do acetato de citroneíla.<sup>60</sup>

A reação de transesterificação do citronelol com o acetato de vinila gera como produto secundário o álcool vinílico, que está em equilíbrio com o acetaldeído. Devido ao equilíbrio favorecer a formação do acetaldeído, e este por sua vez ser muito volátil e não participar da reação inversa, a formação do éster de interesse é favorecida. Essas observações foram comprovadas durante a preparação do acetato de citroneíla utilizando o acetato de vinila como doador acila.<sup>11,51</sup>



**Esquema 8.** Reação de transesterificação enzimática do citronelol com acetato de vinila catalisada pela CALB.

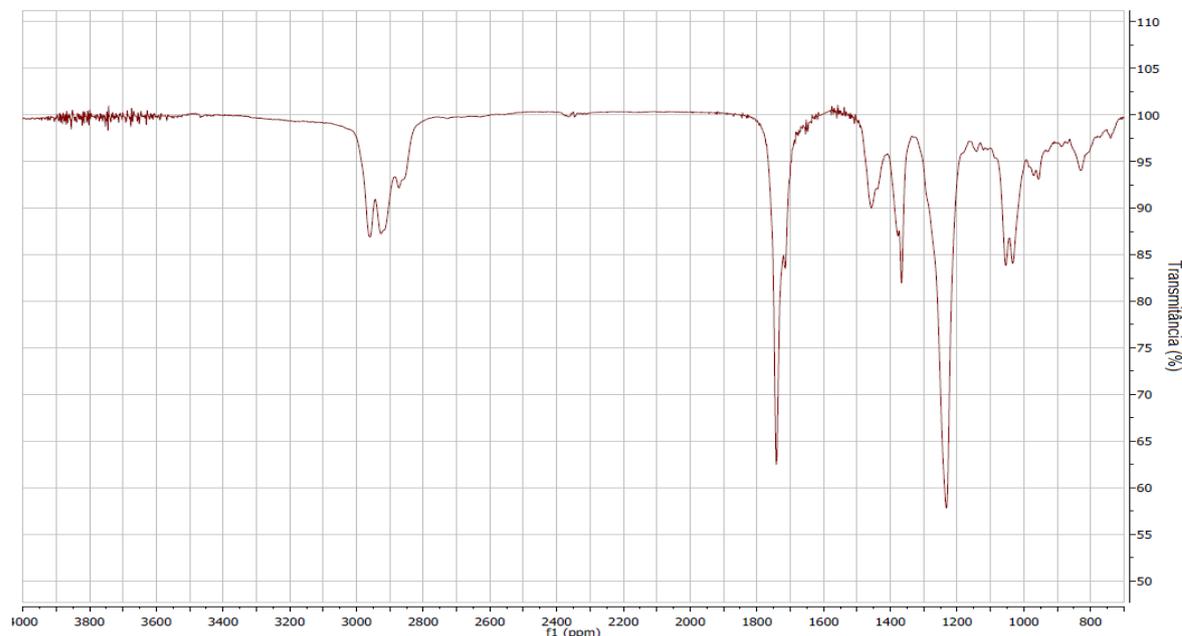
Na **Figura 20** está representado o espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ( $^1\text{H}$ -RMN) para o acetato de citroneíla.



**Figura 20.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do acetato de citroneíla [ $\text{CDCl}_3$ , 400MHz] (Condições reacionais: citronelol (10 mmol), acetato de vinila (20 mmol), *n*-hexano (25 mL), CALB (50 mg). 35°C, 24 h)

Observa-se o pico localizado na região de 5,1-5,2 ppm (multiplete) referente ao hidrogênio da ligação dupla carbono-carbono ( $\text{H}_a$ ). Em 4,1-4,2 ppm, é observado um multiplete referente aos dois hidrogênios vizinhos ao oxigênio do éster ( $\text{H}_b$ ). Em 2,05 ppm observa-se a presença do singlete referente aos hidrogênios  $\text{H}_d$  da metila vizinha à carbonila. Na região entre 1,60-1,75 ppm observam-se dois singletes referentes às metilas da ligação dupla carbono-carbono e dos hidrogênios metilênicos. Em 0,90 ppm observa-se um dublete referente a metila dos hidrogênios  $\text{H}_e$ .

Na **Figura 21** está representado o espectro de infravermelho obtido para o acetato de citroneíla.



**Figura 21.** Espectro de absorção no infravermelho do acetato de citroneíla (filme)

Observa-se a presença de uma banda em  $1750\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento de carbonila de éster, assim como uma por volta de  $1220\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento da ligação C-O de éster. Na região entre  $2920\text{--}2930\text{ cm}^{-1}$  observa-se a banda referente ao estiramento de ligação C-H de carbono  $\text{sp}^3$ . Estes valores são concordantes com os citados na literatura. <sup>61</sup>

Este substrato será utilizado para o estudo da reação de epoxidação quimioenzimática, em diferentes condições reacionais.

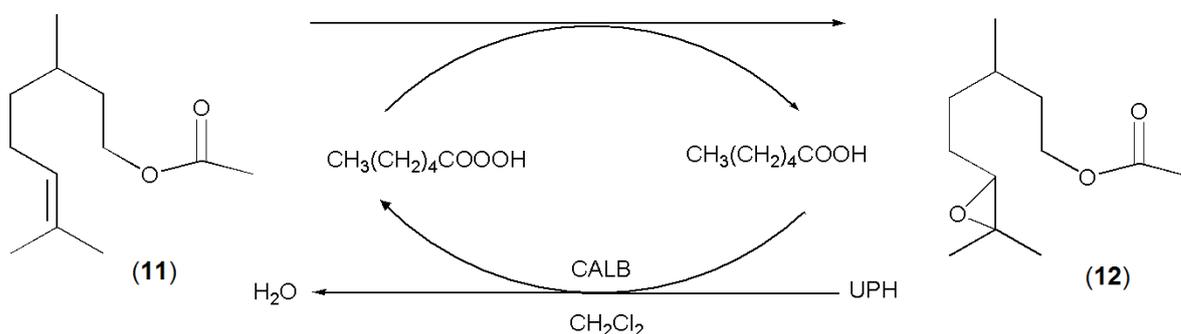
## 5.2 Epoxidação quimioenzimática do acetato de citroneíla

A epoxidação de olefinas utilizando perácidos é usualmente realizada em solventes apróticos e apolares. Neste contexto, para os estudos iniciais da reação, o diclorometano foi selecionado por possuir as características necessárias. Muitos estudos são descritos na literatura utilizando a CALB como biocatalisador para as mais variadas reações, inclusive para catalisar reações de epoxidação quimio-

enzimática. Por este motivo, esta lipase foi selecionada para realizar os estudos iniciais.<sup>49</sup>

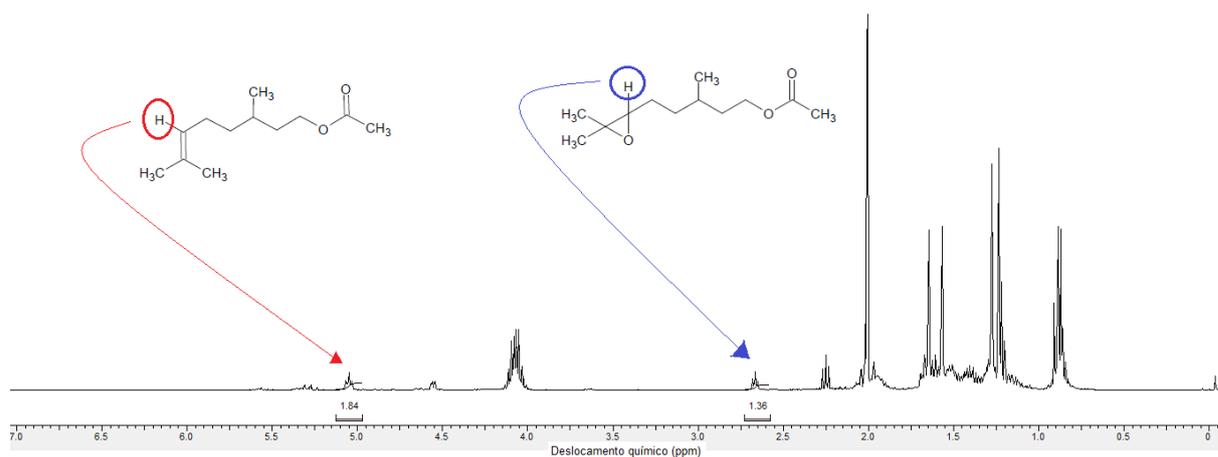
O doador acila possui um papel importante na epoxidação quimio-enzimática por ser responsável pela geração do perácido. É importante que a ligação ao sítio ativo da enzima seja efetiva, porém não muito intensa, para que o perácido seja gerado e rapidamente liberado para o meio reacional. Para isto, o doador acila não deve ter uma cadeia alquílica muito curta, caso contrário pode ocorrer a inativação da enzima através de uma ligação irreversível em seu sítio ativo, e também não deve possuir uma cadeia alquílica muito longa, pois isso dificultaria a sua aproximação e, conseqüentemente, o ajuste ao sítio ativo.<sup>8</sup> Neste contexto, o ácido hexanóico foi selecionado para os estudos iniciais, por ter uma cadeia alquílica de tamanho intermediário.

O tempo de reação foi selecionado como 8 h e a temperatura foi mantida em 35°C durante toda a reação. A agitação do meio reacional foi realizada utilizando um agitador magnético (500 rpm) (**Esquema 9**).



**Esquema 9.** Epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla utilizando CALB como biocatalisador.

Para verificar a formação do epóxido (12), fez-se análise do resíduo obtido (líquido), por <sup>1</sup>H-RMN (**Figura 22**).



**Figura 22.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da mistura reacional obtida na epoxidação do acetato de citroneíla. [ $\text{CDCl}_3$ , 400MHz]. Condições reacionais: acetato de citroneíla (5 mmol), ácido hexanóico (1,0 mmol), UPH (10 mmol), diclorometano (20 mL), CALB (50 mg).  $35^\circ\text{C}$ , 8 h, 500rpm

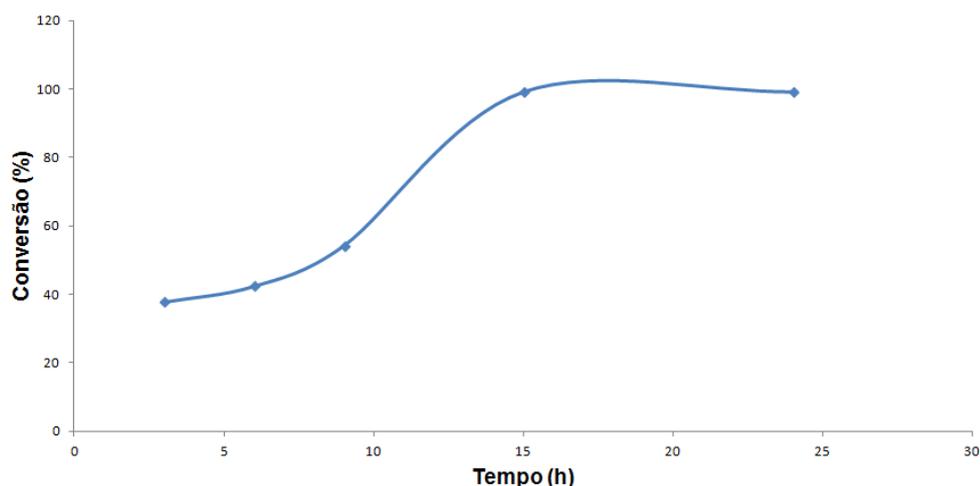
Na **Figura 22**, verifica-se a presença do pico referente ao hidrogênio da ligação dupla carbono-carbono do éster terpênico em 5,0-5,1 ppm, e a presença do pico em 2,6-2,7 ppm que é referente ao hidrogênio ligado ao anel de três membros do epóxido (**12**). Estes valores são concordantes com os citados na literatura.<sup>60</sup> Salienta-se que este pico não é observado no espectro do acetato de citroneíla (**Figura 20**).

A partir da análise das áreas relativas ao hidrogênio da dupla (5,0-5,1 ppm) e ao hidrogênio do epóxido (2,6-2,7 ppm), determina-se que a conversão ao éster epoxidado foi de 43%, sendo este um dado satisfatório.

Este resultado pode ser aprimorado a partir de modificações em alguns parâmetros reacionais, tais como tempo de reação, massa de CALB, adição controlada de UPH, solvente orgânico e uso de diferentes lipases (imobilizadas ou não). Estes dados serão descritos a seguir.

### 5.2.1. Influência do tempo para a reação de epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla

Inicialmente foi realizado o estudo da influência do tempo na reação de epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla. Os resultados podem ser observados na **Figura 23**.



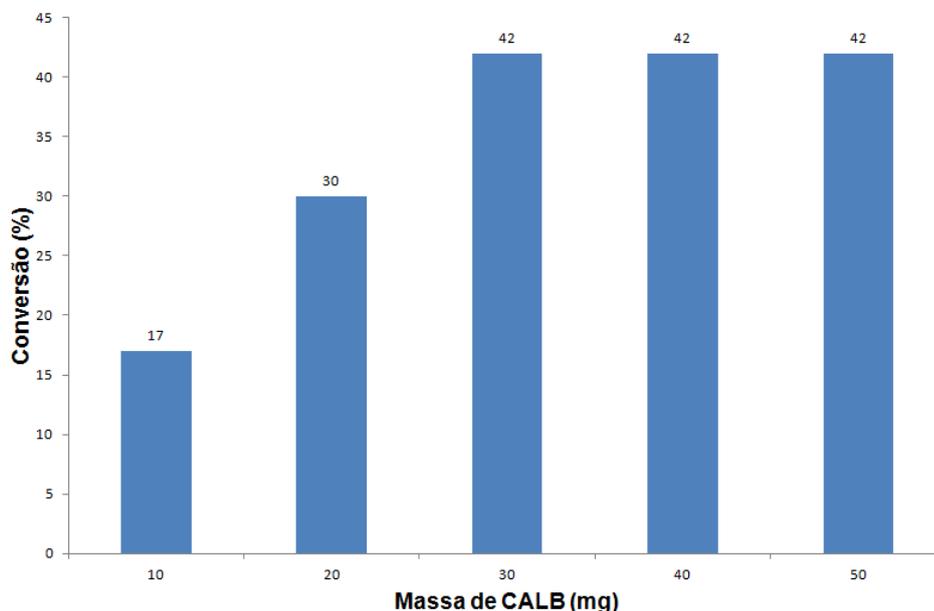
**Figura 23.** Influência do tempo na epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla. (Condições reacionais: acetato de citroneíla (5,0 mmol), UPH (10 mmol), ácido hexanóico (1,0 mmol), CALB (25 mg), diclorometano (15 mL); 35°C, 3-24 h, 500 rpm.)

Observa-se um aumento na conversão ao produto oxidado em função do tempo. A maior conversão obtida foi de >99% após 15 horas de reação. Em 6 horas de reação obteve-se uma conversão de 42% e a partir deste resultado optou-se por avaliar a influência da massa de CALB a fim de aumentar os valores de conversão.

### 5.2.2. Influência da massa de CALB para a reação de epoxidação do acetato de citroneíla

A epoxidação quimio-enzimática ocorre a partir da reação entre o perácido e o alceno. A formação do perácido *in situ* é catalisada pela lipase, portanto, a massa deste biocatalisador está diretamente relacionada com a epoxidação efetiva do terpeno utilizado.<sup>55</sup>

A partir destas considerações, foi realizado o estudo da influência da massa de lipase, mais especificamente de CALB, na epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla em uma reação com duração de 6 horas. A **Figura 24** mostra os resultados obtidos para estes estudos.



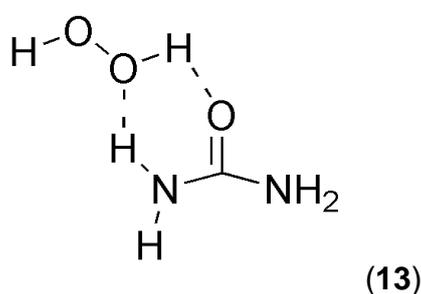
**Figura 24.** Avaliação da massa de CALB na epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla. (Condições reacionais: acetato de citroneíla (5 mmol), UPH (10 mmol), ácido hexanóico (1,0 mmol), CALB (10-50 mg), diclorometano (15 mL); 35°C, 6 h , 500 rpm.)

Observou-se que ao aumentar a massa de CALB, a conversão ao produto oxidado foi de até 42% ao usar 30 mg. Com 40 ou 50 mg de CALB, não foi verificado um aumento na conversão ao correspondente epóxido (42%). Este resultado pode ser explicado devido à saturação do meio reacional, onde a partir de uma determinada massa de lipase, não é constatado maior conversão.

A partir destes resultados, optou-se por avaliar outros parâmetros na epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla tais como adição controlada de UPH, efeito do solvente orgânico e uso de diferentes lipases (imobilizadas ou não).

### 5.2.3 Adição controlada de UPH na reação de epoxidação do acetato de citroneíla

A ureia de peróxido de hidrogênio (UPH) (**13**) também conhecida como peróxido de carbamida, é um sólido branco e cristalino composto por ureia e peróxido de hidrogênio, e foi preparada pela primeira vez por Tanatar em 1908. Quando dissolvida, resulta na liberação de peróxido de hidrogênio livre. Por este motivo, é amplamente utilizada como agente oxidante em síntese orgânica, devido a sua alta estabilidade e fácil manuseio.<sup>62</sup>

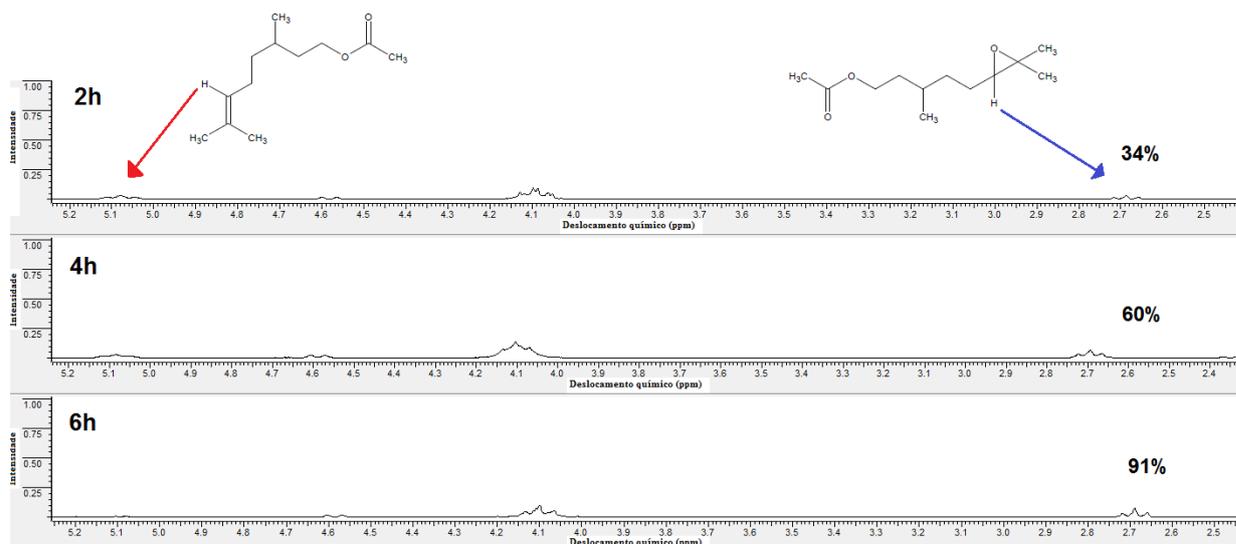


A sua função como doador peróxido é essencial para a reação de epoxidação quimio-enzimática, considerando que é necessário a presença de peróxido de hidrogênio para a formação do perácido *in situ*.<sup>50</sup>

A adição gradativa de peróxido de hidrogênio na reação de epoxidação quimio-enzimática de olefinas foi inicialmente descrita por Björkling e col. em 1992, e foi observado que a conversão ao epóxido do ciclohexeno aumentou de 17% para 95%, em 24 h utilizando esta técnica.<sup>55</sup>

Neste contexto, a epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla foi estudada utilizando a técnica de adição controlada de UPH.

Foram realizadas três adições de 0,33 g de UPH ao longo de 6 h de reação. A formação do epóxido durante este tempo foi acompanhada por <sup>1</sup>H-RMN (**Figura 25**).



**Figura 25.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN mostrando a influência da adição controlada de UPH na epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla. ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). (Condições reacionais: acetato de citroneíla (5 mmol), ácido hexanóico (1,0 mmol), CALB (25 mg), diclorometano (20 mL), UPH (3,33-10 mmol) ;  $35^\circ\text{C}$ , 6 h , 500 rpm.)

Observa-se que com a adição controlada houve um aumento progressivo na conversão ao epóxido (**12**), variando de 34% em 2 h de reação, para 60% em 4 h e finalmente para 91% após 6 h. Através da uma adição controlada e gradativa, o peróxido de hidrogênio é liberado e imediatamente reage com o ácido hexanóico, promovendo a formação do perácido *in situ* para a posterior epoxidação do acetato de citroneíla. Quando se realiza uma única adição da UPH, o peróxido de hidrogênio é liberado e pode ser degradado ao longo do tempo, inibindo a sua função na formação do perácido e, conseqüentemente, diminuindo a conversão ao éster epoxidado.

É importante salientar que esta reação foi previamente estudada com uma única adição de UPH, onde a conversão ao produto oxidado foi de 42%.

Este resultado mostrou-se satisfatório e esta técnica foi utilizada para os estudos posteriores relacionados à influência do solvente orgânico.

#### 5.2.4. Influência do solvente orgânico para a epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla

A eficiência da catálise enzimática está diretamente relacionada ao solvente utilizado, e esta característica também é observada nas reações de epoxidação quimio-enzimática.<sup>3,34</sup>

O  $\text{Log } P$  é um parâmetro importante a ser analisado para a escolha de solventes utilizados em reações biocatalisadas. É definido como o logaritmo do coeficiente de partição do solvente em um sistema octanol/água. Valores maiores de  $\text{Log } P$  correspondem a solventes apolares enquanto que valores menores de  $\text{Log } P$  correspondem a solventes mais polares.

Considera-se que solventes com  $\text{Log } P > 4,0$  são mais eficientes em reações biocatalisadas. Os solventes com  $\text{Log } P$  entre 2,00 e 4,00 são moderadamente eficazes e os com  $\text{Log } P < 2,0$  são pouco adequados para estas reações.<sup>63</sup>

Neste contexto, a epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla foi estudada em diferentes solventes orgânicos. Os dados de conversão ao epóxido (12) estão descritos na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Efeito do solvente orgânico na epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla.<sup>(a)</sup>

Solvente	Log $P^{(b)}$	Conversão (%)
<i>n</i> -Hexano	3,50	13
Ciclohexano	3,20	7
Clorofórmio	2,00	39
MTBE	1,43	49
Diclorometano	0,93	60
Acetato de etila	0,68	>99
THF	0,49	40
Etanol	-0,24	<2
Metanol	-0,76	<2

(a) Condições reacionais: acetato de citroneíla (5 mmol), ácido hexanóico (1,0 mmol), CALB (25 mg), solvente (20 mL), UPH (duas adições de 3,33 mmol a cada 2 horas) ; 35°C, 4 h , 500 rpm.

(b) Referência 63.

Observa-se que ao utilizar solventes mais polares como etanol e metanol, as conversões ao epóxido (**12**) foram muito baixas (<2%), sugerindo que estes solventes não são adequados para esta reação. Estes resultados são esperados pois solventes com Log  $P < 0$  inativam as enzimas de modo geral, pela substituição das moléculas de água que estão ligadas à sua estrutura terciária.<sup>3</sup>

Ao utilizar solventes com Log  $P > 2$ , tais como o *n*-hexano e ciclohexano, as conversões foram consideravelmente baixas. Estes resultados são justificados devido ao fato de que solventes apolares não estabilizam o intermediário de transição na reação de epoxidação a partir do perácido formado *in situ* (**Esquema 1**, pág 17).<sup>50</sup>

As maiores conversões foram obtidas utilizando solventes com Log  $P$  entre 0 e 2,00, como THF, acetato de etila, MTBE, clorofórmio e diclorometano, sendo de 40%, 99%, 49%, 39% e 60%, respectivamente.

Estes resultados são esperados, pois se tratam de solventes que possuem certa polaridade, porém são apróticos, impossibilitando a substituição das moléculas de água que estabilizam a estrutura terciária da lipase que poderia inativá-la. Além disso, a polaridade do meio é mantida, tornando possível a estabilização do intermediário de transição durante a reação de epoxidação.<sup>50</sup>

Destaca-se o acetato de etila devido à alta conversão obtida (>99%), que pode ser justificada por sua capacidade de atuar como solvente e doador acila, promovendo um aumento na conversão ao produto.<sup>62</sup>

Os resultados descritos demonstram a influência direta do meio orgânico na epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla, sendo considerado um parâmetro importante a ser avaliado nas reações biocatalisadas de modo geral.

A partir dos resultados descritos ao longo do trabalho, será realizado o estudo da epoxidação quimio-enzimática de outros terpenos. Apesar dos bons resultados utilizando o acetato de etila como solvente na epoxidação quimio-enzimática, o diclorometano será utilizado para os estudos posteriores a fim de avaliar as conversões aos epóxidos de diferentes terpenos utilizando apenas o ácido hexanóico como doador acila.

#### **5.2.5. Epoxidação quimio-enzimática do $\beta$ -pineno e outros terpenos**

Neste estudo, foram usadas as melhores condições reacionais obtidas na epoxidação do éster (**11**), com outros cinco terpenos. Para avaliar as conversões, foram realizadas análises de  $^1\text{H-RMN}$  e de cromatografia gasosa (CG).

Na **Tabela 4** estão representados os valores de conversão, bem como os métodos analíticos pelos quais foram determinadas.

**Tabela 4.** Conversões para epoxidação quimio-enzimática de outros terpenos

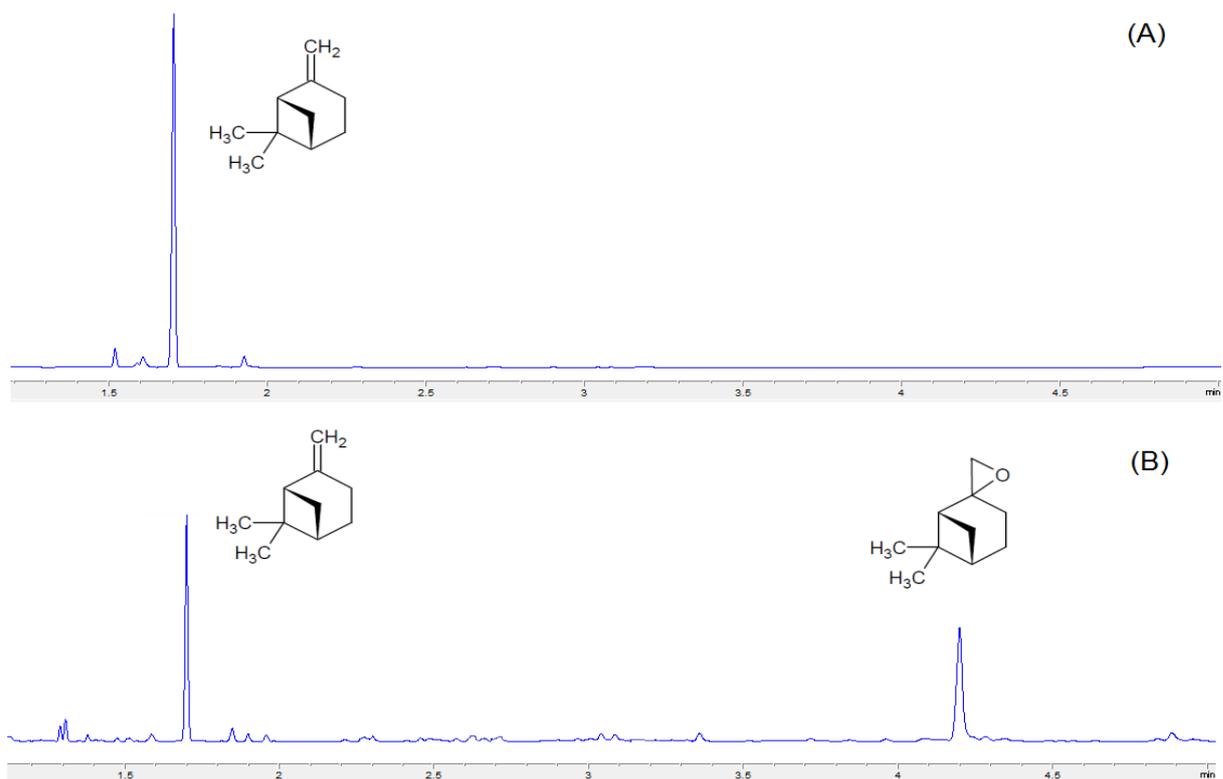
Terpeno	Conversão (%)	Método de análise
3-careno (4)	63	<sup>1</sup> H-RMN
α-pineno (2)	58	<sup>1</sup> H-RMN
citronelal (6)	55	<sup>1</sup> H-RMN
β-pineno (1)	19	CG, <sup>1</sup> H-RMN
eugenol (5)	5	CG, <sup>1</sup> H-RMN

Condições reacionais: terpeno (5 mmol), ácido hexanóico (1,0 mmol), CALB (25 mg), diclorometano (20 mL), UPH (três adições de 3,33 mmol a cada 2 horas) ; 35°C, 6 h , 500 rpm.

O produto epoxidado foi obtido com baixas conversões para o β-pineno (19%) e para o eugenol (5%). Estes resultados podem ser justificados devido a reatividade da ligação C=C terminal ser menor quando comparada a ligações duplas localizadas no meio da cadeia alquílica. <sup>7</sup>

Para a determinação das conversões, uma alíquota do meio reacional foi analisada por CG (CG Agilent Tecnologia 7820 A) equipado com um detector de ionização de chama (FID). As análises foram realizadas em uma coluna apolar (Agilent HP-5-M30), com um programa de temperatura 100°C – 250°C (8°C/min). O injetor e detector foram definidos em 290°C e 320°C respectivamente. A taxa de fluxo de gás hidrogênio foi de 7 mL/min, utilizando 1µL de amostra.

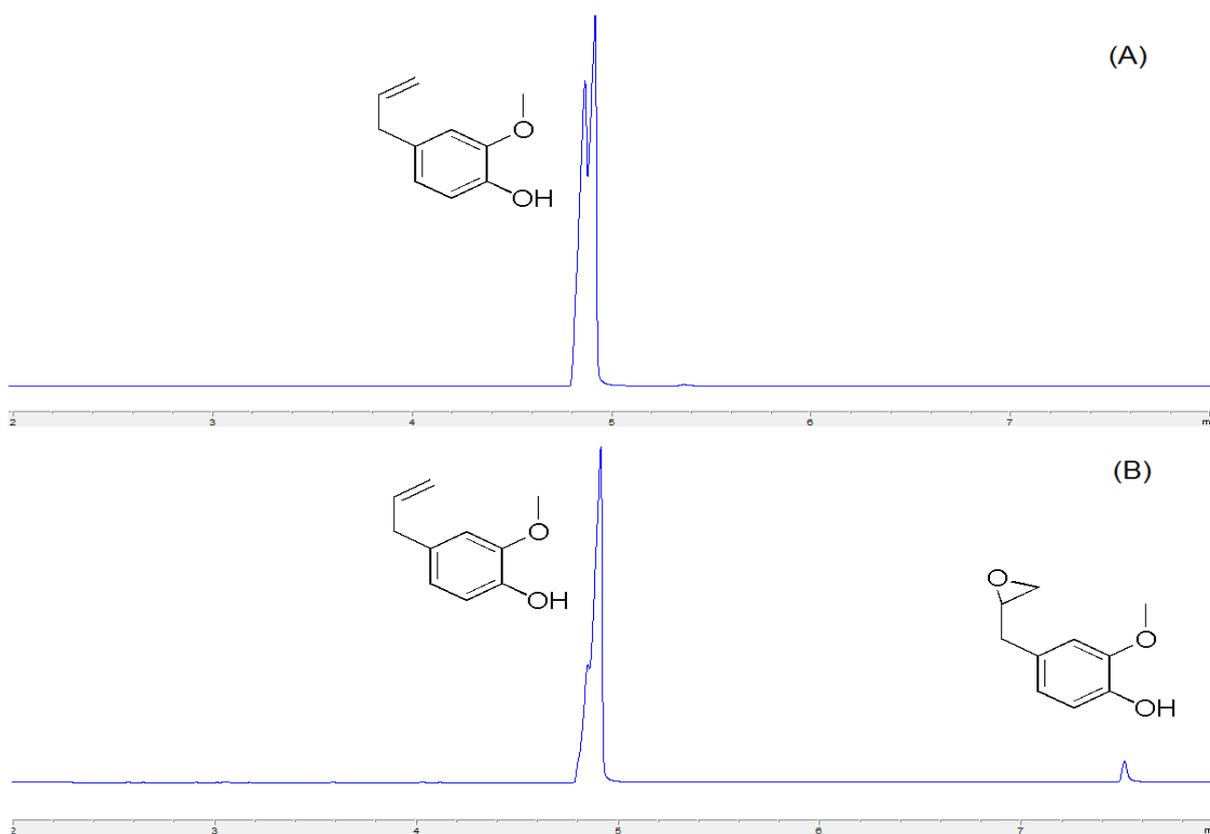
A **Figura 26** mostra os cromatogramas do β-pineno e o de uma alíquota da reação de epoxidação em 6 h.



**Figura 26.** Cromatograma expandido na região de 1 a 5 min do reagente e de uma alíquota da reação de epoxidação quimio-enzimática do  $\beta$ -pineno. ( $t_R = 1,7$  min ;  $t_R = 4,2$  min). Condições reacionais:  $\beta$ -pineno (5 mmol), ácido hexanóico (1,0 mmol), CALB (25 mg), diclorometano (20 mL), UPH (três adições de 3,33 mmol a cada 2 horas) ; 35°C, 6 h , 500 rpm.

Nestas condições de análise, observa-se na **Figura 26a** que o tempo de retenção do reagente é de 1,7 min. Na **Figura 26b**, além do pico de reagente, observa-se o pico do correspondente epóxido em 4,2 min. Por comparação das áreas relativas, determinou-se a conversão ao produto que foi de 19%.

A **Figura 27** mostra os cromatogramas do eugenol, e de uma alíquota da reação de epoxidação em 6 h.



**Figura 27.** Cromatograma expandido na região de 2 a 8 min do reagente e produto da epoxidação quimio-enzimática do eugenol. ( $t_R = 4,8$  min ;  $t_R = 7,5$  min). Condições reacionais: eugenol (5 mmol), ácido hexanóico (1,0 mmol), CALB (25 mg), diclorometano (20 mL), UPH (três adições de 3,33 mmol a cada 2 horas) ; 35°C, 6 h , 500 rpm.

Nestas condições de análise, observa-se na **Figura 27a** que o tempo de retenção do reagente é de 4,8 min. Na **Figura 27b**, além do pico de reagente, observa-se o pico do correspondente epóxido em 7,5 min. Por comparação das áreas relativas, determinou-se a conversão ao produto que foi de apenas 5%.

Os valores de conversão para os epóxidos do 3-careno,  $\alpha$ -pineno (e citronelal) foram satisfatórias sendo de 63%, 58% e 55%, respectivamente.

Estes resultados demonstram que a epoxidação quimio-enzimática catalisada por CALB com adição controlada de UPH é uma alternativa viável para a preparação de epóxidos derivados de monoterpenos.

Em consequência dos bons resultados utilizando a adição controlada de UPH, o próximo estudo irá empregar este método na epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla utilizando a F-AP15 (livre e imobilizada) como biocatalisador.

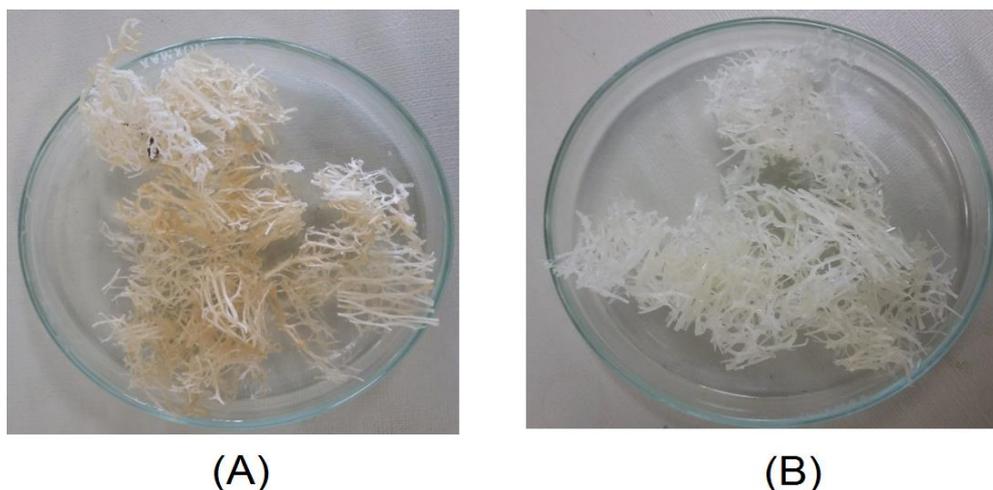
### 5.2.6. Epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla utilizando F-AP15 livre e imobilizada

Com o intuito de utilizar diferentes biocatalisadores para a reação de epoxidação quimio-enzimática, a lipase de *R. oryzae* (F-AP15) foi escolhida para avaliar as conversões ao epóxido (**12**). Esta lipase tem sido amplamente utilizada para catalisar diversas reações, dentre elas a epoxidação de terpenos.<sup>64</sup>

Inicialmente realizou-se o estudo de epoxidação quimio-enzimática de (**11**) com a F-AP15 livre. A reação foi feita a partir de 1,0 mL (5,0 mmol) de acetato de citroneíla, 0,15 mL (1,0 mmol) de ácido hexanóico, 20 mL de diclorometano, 40 mg de F-AP15 e três adições de 0,33 g UPH, sendo realizadas a cada 2 h. A reação foi mantida por 6 h a 35°C em banho termostatizado. Ao final da reação, uma alíquota foi analisada via <sup>1</sup>H-RMN, obtendo conversão de 17% ao produto oxidado (**12**).

Por meio de métodos de imobilização, é possível promover um aumento na estabilização da estrutura terciária das enzimas, obtendo maiores conversões.<sup>26</sup> Neste contexto a F-AP15 foi imobilizada em bucha vegetal com a finalidade de aumentar as conversões ao epóxido (**12**). O processo de imobilização está descrito em Procedimentos Experimentais (pág. 23).

Os cubos de bucha vegetal contendo a F-AP15 imobilizada, foram utilizados na reação de epoxidação quimio-enzimática do éster (**11**). Ao final da reação, uma alíquota foi analisada via <sup>1</sup>H-RMN, obtendo conversão de 8%. Este resultado pode ser justificado devido as fracas interações entre o suporte e a enzima, resultando na possível dessorção do biocatalisador para o meio reacional e, conseqüentemente, na sua inativação. Na **Figura 28** observa-se o aspecto macroscópico da bucha vegetal contendo a F-AP15 imobilizada antes e depois da reação.



**Figura 28.** Aspecto macroscópico da bucha vegetal com F-AP15 imobilizada antes (A) e após (B) a reação.

Observa-se a mudança na coloração e diminuição da rigidez da bucha após a reação, em consequência do contato com o solvente, agente oxidante (UPH) e da possível lixiviação da F-AP15.

Outro suporte utilizado para a imobilização de lipases é o gel de ágar. O biocatalisador é imobilizado por meio do aprisionamento na estrutura polimérica do polissacarídeo.<sup>34</sup> Neste contexto a F-AP15 foi imobilizada em gel de ágar e este sistema foi utilizado para catalisar as reações de epoxidação do éster (**11**). A imobilização da F-AP15 em gel de ágar foi realizada de acordo com o procedimento descrito em Procedimento Experimentais (pág. 23).

Os cubos de gel de ágar contendo a F-AP15 imobilizada foram utilizados na reação de epoxidação quimio-enzimática. Ao final da reação, uma alíquota foi analisada via  $^1\text{H-RMN}$ , e o epóxido (**11**) foi obtido com conversão de 17%. Este resultado pode ser justificado devido ao aprisionamento do biocatalisador comprometer o seu arranjo estrutural, dificultando a aproximação do substrato com orientação favorável para a formação do complexo acil-enzima.<sup>34</sup> Na **Figura 29** está representado o aspecto macroscópico do gel de ágar contendo a F-AP15 imobilizada antes e depois da reação.



**Figura 29.** Aspecto macroscópico do gel de ágar com F-AP15 imobilizada antes **(A)** e após **(B)** a reação.

Observa-se que houve a aglutinação dos cubos resultante da agitação do meio reacional, sugerindo a baixa resistência da forma dos cubos de gel na presença de solvente, agente oxidante (UPH) e agitação.

As conversões ao epóxido (**12**) obtidas utilizando os sistemas com a F-AP15 imobilizada (bucha e gel de ágar) podem ser melhoradas a partir de modificações nos parâmetros reacionais, tais como tempo de reação, solvente orgânico e massa de F-AP15 imobilizada.

Salienta-se que a epoxidação quimio-enzimática é uma alternativa altamente viável para a produção de epóxidos em condições brandas, considerando que estas substâncias são de grande relevância para química orgânica, atuando como intermediários sintéticos na produção de compostos bifuncionais, ou como produtos finais.

## **6. Conclusões**

A reação de epoxidação quimio-enzimática do acetato de citroneíla (**11**) foi estudada variando algumas condições reacionais, tais como tempo de reação, massa de CALB, adição de UPH controlada ou não e solvente orgânico. As melhores condições reacionais obtidas foram utilizadas para a epoxidação do  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -pineno, 3-careno, eugenol e citronelal.

Além destes estudos, a epoxidação quimio-enzimática de (**11**) foi realizada utilizando a F-AP15 livre e imobilizada em gel de ágar e bucha vegetal.

A partir dos resultados obtidos, pode-se considerar que:

- A reação de transesterificação do citronelol (**10**) utilizando acetato de vinila catalisada pela CALB foi satisfatória e de boa reprodutibilidade, obtendo o produto (**11**) com rendimento médio de 90%;
- No estudo da influência do tempo na epoxidação quimio-enzimática de (**11**) obteve o epóxido (**12**) com conversão de >99% após 15 h de reação;
- Ao utilizar 10-50 mg de CALB, a maior conversão ao epóxido (**12**) em 6 h de reação, foi com 30 mg (42%);
- Ao realizar adições consecutivas de UPH em uma reação de 6 h (0,33 g a cada 2 h), as conversões ao epóxido (**12**) aumentaram consideravelmente, passando de 42% com uma única adição, para 91%;
- Os melhores solventes para a obtenção do epóxido (**12**) foram clorofórmio, MTBE, diclorometano, acetato de etila e THF, com conversões de 39%, 49%, 60%, <99% e 40%, respectivamente;
- Ao utilizar a lipase de *R. oryzae* (F-AP15) livre, o epóxido (**12**) foi obtido com conversão de 17%;
- Ao utilizar a F-AP15 imobilizada em gel de ágar e bucha vegetal, as conversões ao epóxido (**12**) foram de 17% e 8%, respectivamente.
- A adição controlada de UPH mostrou-se eficiente na epoxidação de (**2**), (**4**), (**6**), obtendo-se conversões de 58%, 63% e 55%, respectivamente;

Os resultados obtidos ao longo deste trabalho mostraram-se satisfatórios para a obtenção de epóxidos via quimio-enzimática. O aprimoramento no método de adição da UPH foi relevante considerando o aumento nas conversões ao produto oxidado. Contudo, é necessário aperfeiçoar os parâmetros na reação de epoxidação quimio-enzimática de alguns terpenos, devido às baixas conversões obtidas.

## **7. Referências**

1. Gonçalves C. C. S.; Marsaioli A. J.; *Quim. Nova.* 36. 1587-1590. 2013
2. Oliveira L. G., Mantovani S. M.; *Quim. Nova.* 32. 742-756. 2009.
3. Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry.* 6th. ed.: Springer, 2011.
4. Yadav G. D., Devi K. M., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78. 347-351. 2001.
5. Ghanem A.; *Tetrahedron.* V. 63. 2007. P 1721–1754.
6. Nelson D. L., Cox M. M., *Lehninger Principles of Biochemistry.* 6th. ed.: W. H. Freeman, 2012
7. Voet D., Voet J. G.; *Biochemistry.* 4th. Ed.: John Wiley & Sons , INC., 2011
8. Cabral J. M. S, Aires-Barros M. R., Gama M.; *Engenharia Enzimática*, Ed. Lidel – Edições Técnicas, Ltda., 2003.
9. RCSB Protein Data Bank. Disponível em: <<https://www.rcsb.org/structure/4H9M>> Acesso em: 10 de Junho de 2018.
10. Koolman J.; Roehm K. H.; *Color Atlas of Biochemistry.* 2th. ed. Thieme. 2005.
11. Bruice, P. Y. *Organic Chemistry.* 7th. ed.: Pearson Education International, 2013.
12. Database, E. EnzymeCount. Disponível em: <<http://www.enzyme-database.org/stats.php>>. Acesso em: 10 de Junho de 2018.
13. Choi J. M., Han S. S., Kim H. S.; *Biotechnol. Advances.* 33. 1443–1454. 2015.
14. Silva F. M., Lacerda P. S. B., Junior J. J.; *Quim. Nova.* 28. 103-110. 2005.
15. Kapoor G., Gupta M. N.; *Process Biochem.* 47. 555–569. 2012.
16. Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry.* 6th. ed.: Springer, 2011
17. Angajala, G.; Pavan, P.; Subashini, R.; *Biocatal. and Agricultural Biotechnol.* 7. 257-270. 2016.
18. Javed, S.; Azeem, F.; Hussain, S.; Rasul, I.; Siddique, M. H.; Riaz, M.; Kouser, A.; Nadeem, H.; *Prog. in Biophys. and Mol. Bio.* 132. 23-34. 2018.
19. Stauch, B.; Fisher, S. J.; Cianci, M.; *J. Lipid Res.* 56. 2348-2358. 2015.

20. Okoro, O. V.; Sun, Z.; Birch, J.; Reference Module in Food Science. Elsevier Inc. New Zealand. 2018.
21. Xie, Y., An, J., Yang, G., Wu, G., Zhang, Y., Cui, L., Feng, Y.; *J.Biol.Chem.* 289. 7994-8006. 2014.
22. RCSB Protein Data Bank. Disponível em:  
< <http://www.rcsb.org/structure/4K6G>> Acesso em: 17 de Abril de 2018.
23. Guezane-Lakoud S., Toffano M., Aribi-Zouioueche L.; *Heteroatom Chem.* 28. 1-11. 2017.
24. Kucher O. V., Kolodyazhnaya A. O., Smolli O. B., Nazarenko N. K., Kubyskin V., Mykhailiuk P. K., Tolmachev A. A., *Tetrahedron: Asymm.* 27. 341–345. 2016.
25. Cipolatti E. P., Manoel E. A., Lafuente R. F., Freire D. M. G, *Biotech. Res. and Innov.* 1. 26-34. 2017.
26. Dwevedi, A.; Enzyme Immobilization. Springer International Publishing Switzerland. 2016.
27. Mateo C., Palomo J. M., Lorente G. F., Guisan J. M., Lafuente R. F.; *Enzyme Microb. Technol.* 40. 1451–1463. 2007.
28. Sheldon R. A, van Pelt S.; *Chem. Soc. Rev.* 42.6223-6235. 2013.
29. Mohamad N. R., Marzukia N. H. C., Buanga N. A., Huyopb F., Wahab R. A.; *Biotech. & Biotech. Equip.* 29. 205-220. 2015.
30. Tudorachea M., Gheorghea A., Negoia A., Enacheb M., Mariab G. M., Parvulescua V. I.; *Carbohy.Pol.* 152.726-733. 2016
31. Lee W-K.;Lim Y-Y.; Leow A. T-C.; Namasivayam P.; Abdullah J. O.; Ho C-L.; *Carbohy.Pol.* 164. 23-30. 2017.
32. Armisen R.; *J. of App. Phycol.*, 7. 231–243. 1995.
33. Sattar H., Aman A., Qader, S. A. U.; *Inter. J. of Bio. Macromol.* 111. 917–922. 2018.
34. Silva J. M. R., Nascimento M. G.; *Quim. Nova.* 37. 1022-1027. 2014.

35. Bou-Saab H., Boulanger A., Schellenbaum P., Neunlist S.; *J. Biosc. Bioeng.* 116. 506-508. 2013.
36. Behera S., Mohanty R. C., Ray R. C.; *Applied Energy.* 88. 212–215. 2011.
37. Google Imagens. Disponível em <[https://http2.mlstatic.com/bucha-vegetal-natural-sem-casca-e-s-sementes-valor-unid-D\\_NQ\\_NP\\_20598-MLB20192553819\\_112014-F.jpg](https://http2.mlstatic.com/bucha-vegetal-natural-sem-casca-e-s-sementes-valor-unid-D_NQ_NP_20598-MLB20192553819_112014-F.jpg)> Acesso em: 1 de junho de 2018
38. Siqueira G., J. Bras A.; *Biores.* 5. 727-740. 2010.
39. Barroso P. A., Rêgo M. M., Rêgo E. R., Nascimento K. S., Ferreira K. T. C., Santos A. A.; *Agropecuária Técnica.* 35. 89-93. 2014.
40. Saeed A., Iqbal M.; *Biotechnol. Prog.* 29. 573-600. 2013.
41. Sattari S., Vahabzadeh F., Aghtaei, H. K.; *Braz. J. of Chem. Eng.* 32. 367 - 376. 2015.
42. Sell, C. S.; *A Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry.* Quest International, Ashford, Kent, UK, 2003.
43. Mewalal R., Rai D. K., Kainer D., Chen F., Külheim C., Peter G. F., Tuskan G. A.; *Trends Biotechnol.* 35. 227-240. 2017.
44. Demyttenaere J. C. R.; *Studies in Nat. Prod. Chem.* 35. 125-178. 2001.
45. Carvalho C. C. C. R., Fonseca M. M. R.; *Biotech. Adv.* 24. 134-142. 2006.
46. Júnior C. V.; *Quím. Nova.* 26. 390-400. 2003
47. Sahu P., Sarkar P., Bhowmick A. K.; *ACS Sustainable Chem. Eng.* 5. 7659–7669. 2017.
48. Bhatti H. N., Khanb S. S., Khanb A., Rani M., Ahmadb V. U., Choudhary M. I.; *Phytomed.* 21. 1597-1626. 2014.
49. Meyer-Waßewitz J., Elyorgun D., Conradi C., Drews A.; *Chem. Eng. Res. and Design.* 134. 463–475. 2018.
50. von Holleben M. L. A., Schuch C. M; *Quím.Nova.* 20. 58-71. 1997.
51. McMurry, J. *Organic Chemistry*, 8th Ed: Cengage Learning. 2012.

52. Orellana-Coca C., Billakanti J. M., Mattiasson B., Hatti-Kaul R.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 44. 133-137. 2007.
53. Yadav G. D., Devi K. M.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78. 347-351. 2001.
54. Katsuki T., Sharpless K. B.; *J. Am. Chem. Soc.* 102, 5974–5976. 1980.
55. a) Björkling F., Godfredsen S. E., Kirk O.; *Trends Biotechnol.* 9. 360-363. 1991.  
b) Björkling F., Fryman H., Godfredsen S. E., Kirk O.; *Tetrahedron.* 48. 4587-4592. 1992.
56. Mendez-Sanchez D., Ríos-Lombardía N., Gotor V., Gotor-Fernandez V.; *Tetrahedron.* 70. 1144-1148. 2014.
57. Moreira M A., Nascimento M. G.; *Catal. Comm.* 8. 2049-2053. 2007.
58. Nascimento M. G., Silva J. M. R., Silva J. C., Alves M. M.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 112. 1–8. 2015.
59. Aarthy M., Saravananb P., Gowthamana M. K., Rosea C., Kaminia N. R.; *Chem. Eng. Res. and Design.* 92. 1591–1601. 2014.
60. Silva J. M. R., Nascimento M. G.; *Proc. Bio.* 47. 517–522. 2012.
61. Fleming I.; Williams D. H.; *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry.* 4th. ed.: McGRAW-HILL. 1987.
62. Lu C. S., Hughes E. W., Giguère P. A.; *J. Am. Chem. Soc.* 63. 1507–1513. 1941.
63. Laane C., Boeren S., Vos K., Veeger C.; *Biotechnol. Bioeng.* 30, 81-7, 1987
64. Rodrigues J., Canet A., Rivera I., Osório N. M., Sandoval G., Valero F., Ferreira-Dias S.; *Biores. Tech.* 213. 88–95. 2016.
65. Ficha técnica. Disponível em <[www.novozym.com](http://www.novozym.com)> Acesso em 15 de Junho de 2018.
66. WEBER, Douglas. Preparação de ésteres catalisada pela lipase *Burkholderia cepacia* imobilizada em microesferas de quitosana. 2018. 147 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.