



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA**



Thiago Bergler Bitencourt

Formação de Epóxidos e Oxaziridinas via Químio-Enzimática

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento

Florianópolis, fevereiro de 2006.

Aos meus pais Amilton e Simone, pelo amor e apoio incondicionais.

À minha orientadora Maria da Graça, pelo apoio e atenção em todas as horas

AGRADECIMENTOS

A Deus,

A minha família, Pai, Mãe, Dhiego e Carol, pelo apoio nos meus estudos e por todo amor que sempre recebi.

Agradecimento especial a minha orientadora, Profa. Maria da Graça Nascimento pela amizade, pelo incentivo, orientação e confiança em meus trabalhos, e pelas oportunidades que me proporcionou. Minha eterna gratidão.

A UFSC, pelo espaço físico fornecido para a realização do trabalho

Ao Departamento de Química, (funcionários, bolsistas e professores) pela atenção dispensada.

Ao CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro e facilidades concedidas.

A PRAC, pelas bolsas de treinamento me concedidas, e pelo suporte em congressos e encontros estudantis.

A Central de Análises, por tornar possível nosso trabalho, com suas análises.

Aos professores do departamento de química, que contribuíram e me ajudaram muito na minha formação.

A Amano e a Novozymes, pelo fornecimento das enzimas.

Aos amigos e parceiros do Laboratório de Biocatálise, (Damianni, Marcelo, Fernanda, Tiago, Aline, Vanessa, Patrícia, Alexandre, Cristiane, Maria Alice), pelo carinho, amizade e bate-papos no laboratório.

A Profa. Áurea Echevarria, pelo fornecimento dos derivados substituídos do ácido cinâmico

Ao Prof. Jairton Dupont, pelo fornecimento dos líquidos iônicos.

A Criscie, minha namorada, pelo carinho e companheirismo.

A todos os meus amigos

Aos amigos conquistados na minha carreira acadêmica.

Agradeço a todas pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho

Índice

Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. Introdução	
1.1. Considerações gerais.....	01
1.2. Enzimas.....	02
1.3. Lipases.....	07
1.4. Imobilização de enzimas.....	11
1.4.1. Imobilização em suportes sólidos.....	12
1.4.2. Sistema bifásico.....	13
1.5. Peróxi-ácidos.....	14
1.6. Epóxidos.....	16
1.6.1. Epoxidação eletrofílica por perácidos.....	18
1.6.2. Epoxidação via halohidrinas.....	20
1.6.3. Epoxidação catalisada por aminoácidos.....	20
1.6.4. Epoxidação nucleofílica.....	21
1.6.5. Epoxidação químio-enzimática de alcenos.....	22
1.7. Oxaziridinas.....	23
1.8. Relações lineares de energia-livre (Análises de correlação).....	25
2. Objetivos	
2.1. Objetivo geral.....	28
2.2. Objetivos específicos.....	28
3. Parte Experimental	
3.1. Equipamentos utilizados nas reações e caracterização dos reagentes e produtos.....	29
3.2. Sistema bifásico.....	31
3.3. Reagentes, solventes e lipases utilizadas.....	31
3.4. Métodos Experimentais.....	33
3.4.1. Preparação do cicloexeno.....	33

3.4.2. Preparação dos ésteres etílicos a partir dos derivados do ácido cinâmico <i>para</i> e <i>meta</i> substituídos.....	34
3.4.3. Preparação de iminas (Bases de Schiff).....	38
3.4.4. Procedimento geral para as reações de epoxidação químio-enzimática do cicloexeno em sistema bifásico.....	40
3.4.5. Procedimento para a epoxidação nucleofílica via-enzimática dos derivados do cinamato de etila.....	41
3.4.6. Procedimento para a oxidação químio-enzimática das iminas (formação de oxaziridinas).....	42
4. Resultados e Discussão.....	44
4.1. Epoxidação químio-enzimática do cicloexeno em sistema bifásico.....	45
4.1.1. Influência do solvente orgânico no meio reacional.....	45
4.1.2. Influência do doador acila na formação do perácido.....	48
4.1.3. Influência da cadeia do doador acila na epoxidação químio-enzimática do cicloexeno em sistema bifásico.....	50
4.1.4. Influência da concentração de doador acila no meio reacional.....	51
4.1.5. Reutilização da lipase de <i>Candida antarctica</i> (Novozym 435).....	52
4.2. Epoxidação nucleofílica via-enzimática dos derivados do cinamato de etila.....	54
4.2.1. Epoxidação do cinamato de etila com diversas lipases.....	58
4.2.2. Efeito de grupos substituintes dos cinamatos na epoxidação químio-enzimática.....	60
4.3. Formação de oxaziridinas via-enzimática.....	65
5. Conclusões Finais.....	70
6. Perspectivas.....	72
7. Referências Bibliográficas.....	73
8. Produção Científica (2004-2006).....	82

Índice de Figuras

Figura 1.	Ligação de aminoácidos para a formação de um peptídeo.....	02
Figura 2.	Representações gráficas das estruturas tridimensionais secundárias (a e b) e terciárias (c) da lipase de <i>Penicillium sp</i> obtidas por Raio-X.....	02
Figura 3.	Representação esquemática do mecanismo de ação das enzimas.	03
Figura 4.	Diagrama de energia de uma reação na presença e ausência de um catalisador.....	04
Figura 5.	Representação da cavidade do sítio ativo da lipase de <i>Thermomyces (humicola) lanuginosa</i> mutante complexada com ácido oléico.....	04
Figura 6.	Utilização relativa das enzimas em biotransformações.....	06
Figura 7.	Representação gráfica da estrutura tridimensional da lipase de <i>Candida rugosa</i> , destacando o seu sítio ativo.....	07
Figura 8.	Produção de biodiesel através de interesterificação do óleo de soja com acetato de metila.....	09
Figura 9.	Resolução cinética da mistura racêmica do éster 2-etóxi- <i>etil</i> -ibuprofeno.....	09
Figura 10.	Resolução enzimática de α -metileno β -hidróxi ésteres.....	10
Figura 11.	Síntese enzimática de um intermediário quiral para a obtenção de eptilona A.....	10
Figura 12.	Peridrólise do fenilacetato de etila.....	11
Figura 13.	Representação gráfica dos principais métodos de imobilização de enzimas.....	12
Figura 14.	Hidrólise enzimática da penicilina G.....	14
Figura 15.	Emprego de perácidos em processos de síntese orgânica.....	15
Figura 16.	Processo industrial de epoxidação do eteno, por oxidação catalítica.....	16
Figura 17.	Mecanismo de formação do poli(etilenoglicol), via catálise ácida....	17
Figura 18.	Abertura de epóxidos na síntese de moléculas multifuncionalizadas.....	17
Figura 19.	Conversão direta à difluoretos vicinais a partir de epóxidos.....	17

Figura 20. Esquema geral da epoxidação do norborneno (21) catalisada por complexos de cobre II.....	18
Figura 21. Mecanismo de epoxidação de alcenos via peróxi-ácidos.....	19
Figura 22. Epoxidação de derivados de álcoois alílicos via <i>m</i> -CPBA.....	19
Figura 23. Reação de epoxidação via halodrinhas.....	20
Figura 24. Epoxidação assimétrica de uma cetona α,β -insaturada catalisada por poli(L-leucina).....	20
Figura 25. Epoxidação nucleofílica de ésteres α - β insaturados catalisada por <i>tert</i> -butilperóxido de lítio.....	21
Figura 26. Epoxidação nucleofílica catalisada por <i>m</i> -CPBA em meio alcalino.....	21
Figura 27. Epoxidação quimio-enzimática de alcenos.....	22
Figura 28. Epoxidação quimio-enzimática do ácido oleico.....	22
Figura 29. Epoxidação do α -pineno, mediada pela lipase de <i>Candida antarctica</i> (Novozym 435).....	23
Figura 30. Síntese de oxaziridinas via tricloro-acetonitrila e peróxido de hidrogênio.....	24
Figura 31. Oxigenação de iminas com Oxone [®]	24
Figura 32. Oxidação de sulfetos mediado por oxaziridinas.....	25
Figura 33. Reação de aminação utilizando oxaziridinas.....	25
Figura 34. Reação de descoloração térmica de bis-benzopiranos.....	27
Figura 35. Representação gráfica de um sistema bifásico (a) sob agitação magnética e (b) sob agitação do tipo Dubnoff.....	31
Figura 36. Reação de formação do cicloexeno via desidratação do cicloexanol.....	33
Figura 37. Reação de esterificação dos derivados do ácido cinâmico <i>para</i> e <i>meta</i> substituídos.....	34
Figura 38. Preparação de iminas.....	38
Figura 39. Espectro de RMN- ¹ H, de uma alíquota da fase orgânica da reação de epoxidação quimio-enzimática do cicloexeno. [Novozym 435- 50mg, 30°C, 6 h, tolueno, (CDCl ₃ , 200MHz).].....	40

Figura 40	Espectro de RMN- ¹ H, de uma alíquota da fase orgânica da reação de epoxidação quimio-enzimática do cinamato de etila. [Novozym 435 (150mg), 30°C, 96 h, tolueno, (CDCl ₃ , 400MHz)].....	41
Figura 41	Cromatograma da reação de oxidação químio-enzimática da N-benzilidenanilina (1mmol – 53a). [Novozym 435 (100mg), ácido octanóico (a) 10mmol, 25°C, 1 h, CH ₂ Cl ₂ .].....	42
Figura 42.	Espectro de RMN- ¹ H, da fase orgânica da reação de oxidação químio-enzimática da N-Benziliden-p-metóxi-anilina (52b). [Novozym 435 (100mg), 25°C, 24h, CH ₂ Cl ₂ (CDCl ₃ , 400MHz).....	43
Figura 43.	Preparação de perácidos via-enzimática.....	48
Figura 44.	Conversão em epóxido (%) do cicloexeno em função do doador acila (10mmol). [Novozym 435, LPS e LRO, H ₂ O ₂ (30%, 1mL), 30°C, 24h, tolueno].....	50
Figura 45.	Variação da conversão em epóxido de cicloexeno em função da quantidade de ácido octanóico. [Novozym 435, LPS e LRO, H ₂ O ₂ (30%, 1mL), 30°C, 24h, tolueno].....	51
Figura 46.	Conversão em óxido de cicloexeno em função da reutilização da Novozym 435 a cada 24 h de reação.....	53
Figura 47.	Espectro de infravermelho do cinamato de etila (50a).....	55
Figura 48.	Espectro de RMN- ¹ H do cinamato de etila em CDCl ₃ , 200MHz.....	55
Figura 49.	Espectro de RMN- ¹³ C do cinamato de etila em CDCl ₃ , 200MHz.....	56
Figura 50.	Variação do rendimento em éster etílico em função dos parâmetros σ dos substituintes. (r = 0,8678, ρ = 22,861).....	57
Figura 51.	Conversões em epóxido (55a-j) em função das constantes de efeito indutivo (σ _i). [Novozym 435 (150mg), 96h, (A) tolueno e (B) diclorometano, 1mmol substrato, 30°C, 96h.].....	62
Figura 52.	Conversões em epóxido (55a-j) em função das constantes de efeito mesomérico (σ _r). [Novozym 435 (150mg), (A) tolueno e (B) diclorometano, 1mmol substrato, 30°C, 96h.].....	62
Figura 53.	Formas ressonantes para o cinamato de etila com grupos retiradores de elétrons (a) e grupos doadores de elétrons (b).....	63

Figura 54. Conversões em epóxido (55a-j) em função das constantes de grupo substituinte (σ). [Novozym 435 (150mg), 96h, 30°C, 1mL de H ₂ O ₂ , tolueno.].....	64
Figura 55. Conversões em epóxido (55a-j) em função das constantes de grupo substituinte (σ). [Novozym 435 (150mg), 96h, 30°C, 1mL de H ₂ O ₂ , CH ₂ Cl ₂].....	64
Figura 56. Oxidação de iminas via-enzimática.....	65
Figura 57. Cromatograma da reação de oxidação químio-enzimática da N-benzilidenanilina (1mmol – 53a). [Novozym 435 (100mg), ácido octanóico 10mmol, 25°C, 2,5 h, CH ₂ Cl ₂].....	66
Figura 58. Conversão em oxaziridina (56a) em função do tempo de reação. [Novozym 435(100mg), H ₂ O ₂ (30%, 1mL), 25°C].....	66
Figura 59. Cromatograma da reação de oxidação químio-enzimática da N-benziliden-p-metóxianilina (1mmol - 53b). [Novozym 435 (100mg), ácido octanóico 10mmol, 25°C, 24 h, CH ₂ Cl ₂]	68
Figura 60. Conversão em oxaziridina (56b) em função do tempo de reação. [Novozyme 435(100mg), H ₂ O ₂ (30%, 1mL), 25°C].....	68
Figura 61. Conversão em oxaziridina (56c) em função do tempo de reação. [Novozym 435(100mg), H ₂ O ₂ (30%, 1mL), 25°C].....	69

Índice de Tabelas

Tabela 1. Classificação das enzimas de acordo com a UIBBM.....	05
Tabela 2. Parâmetros das análises por cromatografia gasosa.....	29
Tabela 3. Lipases utilizadas.....	32
Tabela 4. Epoxidação químio-enzimática do cicloexeno em diferentes sistemas bifásicos.....	46
Tabela 5. Formação de perácidos em função do tipo de doador acila.....	49
Tabela 6. Rendimentos dos ésteres etílicos derivados do ácido cinâmico.....	56
Tabela 7. Epoxidação do cinamato de etila em diferentes sistemas reacionais.....	59
Tabela 8. Epoxidação químio-enzimática dos derivados do cinamato de etila.....	61

Índice de Esquemas

Esquema 1. Mecanismo proposto para a hidrólise enzimática de um éster.	08
Esquema 2. Método de quantificação de perácidos.....	30
Esquema 3. Reações de oxidação estudadas neste trabalho.....	44
Esquema 4. Representação do procedimento de reutilização da Novozym 435.....	53
Esquema 5. Mecanismo de esterificação via-química.....	58
Esquema 6. Mecanismo de epoxidação nucleofílica.....	60
Esquema 7. Reações de oxidação e hidrólise de N-benzilidenanilinas via químio-enzimática.....	67

Siglas e Abreviaturas

%c – percentual de conversão

Asp – ácido aspártico

CALB – lipase de *Candida antarctica* B

CCD – cromatografia de camada delgada

CG – cromatografia gasosa

CMC – carboximetilcelulose

Col. – colaboradores

DFMBA – *N,N*-dietil- α,α -difluoro-(*m*-metilbenzil)amina

DHCT - 1,8-dibenzil-1,3,6,8,10,13-hexaazaciclotetradecano

DMSO – dimetilsulfóxido

E_a - Energia de ativação

ee – excesso enantiomérico

ee_p – excesso enantiomérico do produto

eq. – equivalente

Glu – ácido glutâmico

His – histidina

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

IV – infravermelho

Ka – constante de acidez

KDa – quilo Daltons

LCr – lipase de *Candida rugosa*

Log P - logaritmo do coeficiente de partição

LPS – lipase de *Pseudomonas* sp

LRO – lipase de *Rhizopus orizae*

m-CPBA – ácido *meta*-cloroperbenzóico

M.M. – massa molar

n.d. - não houve detecção do produto

P_{eb} – ponto de ebulição

PEO – poli(óxidoetileno)

P_f – ponto de fusão

pH - potencial hidrogeniônico
poli(HEMA-MAPA) – poli(2-hidróxiethylmetacrilato-co-metacrilamido-fenilalanina)
PSS – poli(estireno sulfonato)
PVA – álcool polivinílico
R_f – índice de retenção
RMN – ressonância magnética nuclear
RNA - ácido ribonucléico
rpm – rotações por minuto
Ser – serina
sp. - espécie não determinada
TBDMS – terc-butildimetilsilil
t.r. – tempo de retenção
t-BPLi - *terc*-butilperóxido de lítio
THF – tetrahidrofurano
TMS – tetrametilsilano
UIBBM – União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
 α – alfa
 β - beta
 ρ – ro
 σ – sigma

RESUMO

Lipases foram utilizadas em reações de epoxidação químio-enzimática de compostos que contêm duplas ligações carbono-carbono e carbono-nitrogênio. Foram utilizados três diferentes sistemas insaturados; cicloexeno, derivados *para* e *meta* do cinamato de etila e N-benzilidenanilinas (iminas ou Bases de Schiff). Como biocatalisadores foram utilizadas as lipases de *Candida antarctica* (Novozym 435 ou CAL-B), *Pseudomonas* sp. (LPS) e de *Rhizopus oryzae* (LRO). Foram investigados alguns parâmetros experimentais que influenciam estas reações, a 35°C.

Em uma primeira etapa, foram avaliados o efeito do solvente orgânico na epoxidação do cicloexeno em sistema bifásico, e os resultados mostraram grandes variações na conversão em epóxido dependendo do solvente utilizado (12-99%). A influência do doador acila foi verificada em função do seu tipo e quantidade (0-12,5mmoles). Foram utilizados os ácidos propanóico(C3), butanóico(C4), hexanóico(C6), octanóico(C8), decanóico(C10) e láurico(C12) como doadores acila. Os resultados demonstraram que as maiores conversões em epóxido (>99%), foram com os ácidos de cadeias alquílicas maiores e com quantidades superiores a 2,5 mmoles do doador acila. A CAL-B, foi reutilizada por até 10 vezes, formando o produto com conversão de 90-99%.

Na epoxidação dos derivados *para* e *meta* do cinamato de etila, foram estudados diversos sistemas reacionais (tais como solventes orgânicos, sistema bifásico e a influência do meio básico) a fim de se obter as maiores conversões no epóxido correspondente. Foi verificado também o efeito do grupo substituinte. As conversões variaram de 13-40% em tolueno e de 9-35% em diclorometano, dependendo da natureza do grupo substituinte, em meio básico (tampão fosfato de potássio pH 9,0) Estes resultados são concordantes com o mecanismo de epoxidação nucleofílica.

Na oxidação de N-benzilidenanilinas, foi avaliada influência da presença dos grupos substituintes *p*-metoxi e *o*-hidroxi nos anéis benzal e anilínico. Os resultados demonstraram que neste tipo de reação além do produto epoxidado, houve formação de produtos de hidrólise devido da presença de água no meio reacional. As N-benziliden-*p*-metóxi-anilina e *o*-hidróxi-N-benziliden-*p*-metóxi-anilina, que contêm grupos doadores de elétrons, são mais estáveis frente à hidrólise e as correspondentes oxaziridinas foram obtidas com 72% e 83%, respectivamente.

Os resultados obtidos neste trabalho, mostraram a habilidade e importância do uso de enzimas na oxidação de sistemas insaturados. Estas reações, mostraram-se dependente da fonte de lipase, solvente, pH, e da estruturas do doador acila e substrato.

ABSTRACT

Lipases were employed in the chemo-enzymatic epoxidation of compounds containing carbon-carbon and carbon-nitrogen double bonds. Three different systems were used; cyclohexene, *para* and *meta* substituted ethyl cinamate derivatives and N-benzylidenanilines (imines or Schiff Bases). As biocatalysts lipases from *Candida antarctica* (Novozym 435, CAL-B), *Pseudomonas* sp. and *Rhizopus oryzae* were employed. Some experimental parameters which affect these reactions were investigated, at 35 °C.

Firstly, the influence of organic solvent in the epoxidation of cyclohexene in a biphasic system was evaluated, and the conversion in epoxide showed to be dependent on solvent (12-99%). The influence of acyl donor was evaluated as function of time and amount (0-12.5 mmols). Propanoic (C3), butanoic (C4), hexanoic (C6), octanoic (C8), decanoic (C10) and lauric (C12) acids were employed as acyl donors. Higher conversions in epoxide were obtained using 2.5 mmols of octanoic, decanoic and lauric acids or a higher amount, being of >99%. CAL-B was re-used 10 times, forming the product in 90-99% conversion.

In the epoxidation of *para* and *meta* ethyl cinamate derivatives, various reactional systems were studied (such as organic solvents, biphasic system and the basic media influence) in order to obtain the highest conversions in the corresponding epoxide. The effect of the substituent group was also considered. The conversions were in the range of 13-40% in toluene and 9-35% in dichloromethane, depending on the nature of the substituent group in basic media (potassium phosphate buffer pH (9.0)). These results are in agreement with the nucleophilic epoxidation mechanism.

In the enzymatic oxidation of N-benzylidenanilines, the influence of *p*-methoxy and *o*-hydroxy groups in benzal and anilinic rings were evaluated. The results showed that in this reaction besides the epoxide product, it was formed hydrolysis products due to the water present in the reactional media. N-benzyliden-*p*-methoxyaniline and *o*-hydroxy-N-benzylidenaniline, containing donor electron groups are more stable related to the hydrolysis, and the corresponding oxaziridines were obtained in 72% and 83% yields, respectively.

The results obtained in this work showed the ability and importance to use enzymes in the oxidation of unsaturated systems. These reactions showed to be dependent on the lipase source, solvent, pH, and acyl donor and substrate structures.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

Os pesquisadores, em particular os químicos, têm confrontado diariamente por razões econômicas e ambientais com a obrigação de otimização dos processos sintéticos e analíticos, objetivando sempre a maximização da eficiência de um determinado processo e a conseqüente diminuição dos custos e poluição. Portanto estes são desafios constantes para as mais variadas linhas de pesquisa.¹

O uso de microorganismos, em especial as enzimas, como catalisadores, em reações orgânicas vem ao encontro deste desafio. Estes por sua vez, possuem uma grande importância dentro da indústria químico-farmacêutica, devido aos mais variados tipos de reações que catalisam com uma eficiência extraordinária em comparação com os catalisadores convencionais.² Muitas pesquisas têm sido realizadas nesta área com o intuito de se encontrar um método eficiente, barato e que proporcione a manutenção da integridade da enzima durante o processo, considerando que podem ser desnaturadas por solventes orgânicos, meio no qual a grande maioria das reações orgânica é realizada.³

A grande vantagem da utilização desses biocatalisadores se encontra nas condições suaves e seletivas nas quais são realizadas as reações, sendo estas bastante importante quando se trabalha em síntese. Um caso muito comum é a utilização dos reagentes em condições muito drásticas, levando a perda e/ou decomposição do produto de interesse da síntese.⁴

Apesar das vantagens, o uso para aplicações industriais ainda é limitado devido à instabilidade destes biocatalisadores nas condições operacionais requeridas e/ou na dificuldade de separação do mesmo dos substratos e produtos.^{5,6}

Nos últimos 20 anos tem aumentado o uso destes biocatalisadores em meio orgânico e, com isso, novas implicações teóricas e aplicações práticas estão surgindo. O desenvolvimento de novos métodos e o teste de novos meios reacionais alternativos, que possibilite o uso de enzimas em processos de síntese é de grande interesse.⁷

A versatilidade destes biocatalisadores tem sido recentemente explorada em síntese orgânica, e neste trabalho será explorado o uso e aplicações de lipases em reação de oxidação de alguns sistemas insaturados.

1. 2. Enzimas

Enzimas são proteínas produzidas pelos organismos vivos com funções catalíticas de inúmeras reações biológicas.⁵ Como outras proteínas, são formadas por uma longa cadeia de aminoácidos, ligados através de ligações peptídicas. **(Figura 1)**

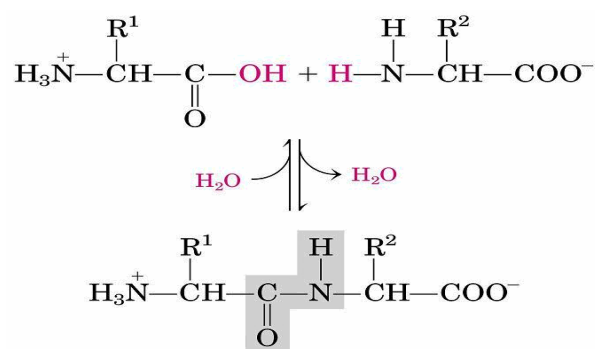


Figura 1. Ligação de aminoácidos para a formação de um peptídeo.

A seqüência exata de aminoácidos da cadeia protéica é chamada estrutura primária. A conformação tridimensional dessa seqüência é denominada estrutura secundária **(Figuras 2a e 2b)** e a disposição espacial destas estruturas é denominada de estrutura terciária. **(Figura 2c).**⁸

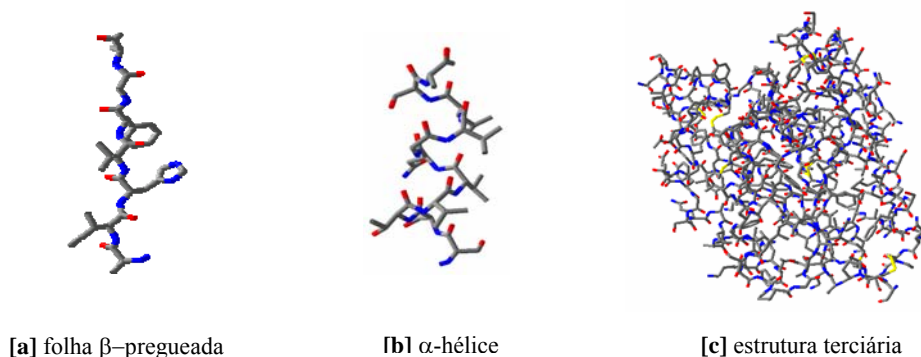


Figura 2. Representações gráficas das estruturas tridimensionais secundárias (a e b) e terciárias (c) da lipase de *Penicillium sp* obtidas por Raio-X.⁹

Diversos processos no metabolismo dos seres vivos são regidos por enzimas, constituindo a base das complexas e variadas reações que caracterizam os fenômenos vitais. Elas estão encontradas em todas as células vivas, e tem o papel do controle das funções vitais.¹⁰

Uma outra característica das enzimas é que são altamente específicas, ou seja, geralmente catalisam um tipo ou uma determinada reação.⁴ Essa especificidade é de extrema importância, pois diversos processos no metabolismo animal são regidos pelas enzimas e estes se realizam em condições favoráveis para o indivíduo sem liberação brusca de energia, num meio de pH e concentração salina, praticamente constantes.^{4,5} Estas condições minimizam problemas de isomerização, racemização, rearranjos, etc., que freqüentemente permeiam a metodologia tradicional. Além disso, as enzimas de um modo geral são catalisadores altamente eficientes, sendo que as velocidades das reações catalisadas por enzimas podem ser até 10^{12} vezes mais rápidas do que as correspondentes não catalisadas.² Devido a estas propriedades cada vez mais são empregadas em sínteses orgânicas.

Essa especificidade só ocorre devido ao formato de seu sítio catalítico, que só atua em moléculas com configurações bastante precisas.^{4,8,11} A **Figura 3**, mostra de forma esquemática o mecanismo de ação das enzimas.

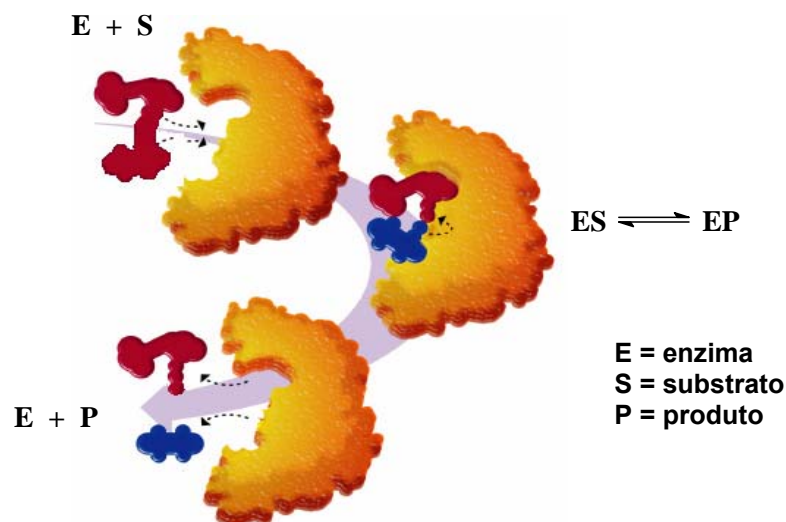


Figura 3. Representação esquemática do mecanismo de ação das enzimas.¹¹

Grande parte do poder catalítico das enzimas é devido elas aproximarem os substratos em orientações favoráveis, diminuindo assim a barreira energética no complexo enzima-substrato.⁴⁻⁷ (**Figura 4**)

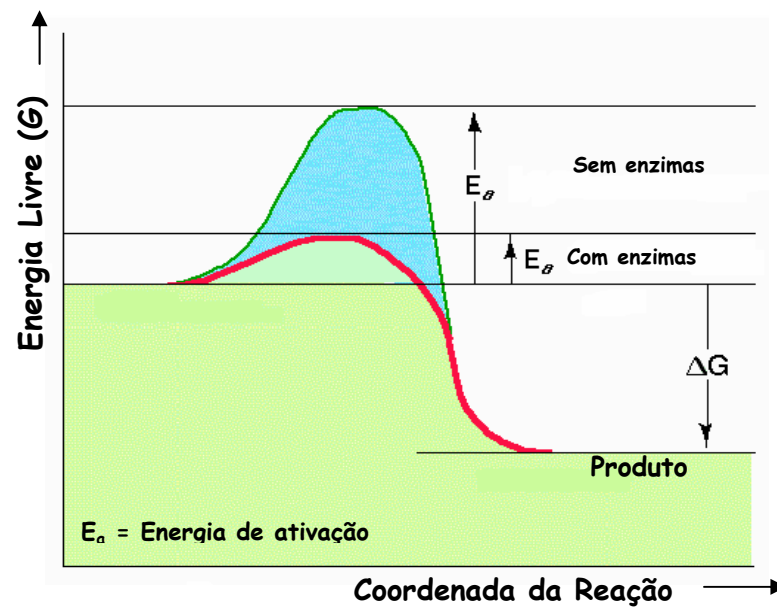


Figura 4. Diagrama de energia de uma reação na presença e ausência de um catalisador.

As enzimas produzidas pelos organismos vivos só catalisam, habitualmente, um tipo ou uma determinada reação. Esta habilidade está diretamente ligada à configuração L dos aminoácidos e ao formato dos sítios catalíticos que proporcionam o encaixe adequado do substrato.

A **Figura 5** mostra a cavidade do sítio ativo de uma lipase complexada com ácido oléico.⁹

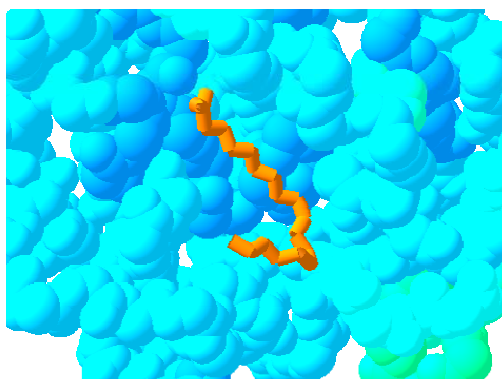


Figura 5. Representação da cavidade do sítio ativo da lipase de *Thermomyces (humicola) lanuginosa* mutante complexada com ácido oleico.⁹

As enzimas têm uma especificidade tão marcada que, em geral, atuam exclusivamente sobre substâncias de configuração precisa. Por exemplo, só

reagem com aminoácidos que tem seu carbono α assimétrico, com configuração L e não revelam a menor atividade sobre formas idênticas desses aminoácidos que apresentam configuração do tipo D. Esta estereoespecificidade é decorrente da inerente quiralidade das proteínas (pois são formadas exclusivamente de L-aminoácidos), formando sítios ativos assimétricos.^{8,12}

Conforme a sua atividade, as enzimas são classificadas segundo a UIBBM – União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular - em seis grandes classes distintas designadas por um nome recomendado nas quais estão inclusos as sub-classes com os nomes relacionados ao tipo de reação que catalisam.^{4-6,13} As classes de enzimas estão relacionadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Classificação das Enzimas de acordo com a UIBBM.

Classe de Enzimas	Algumas Subclasses	Reações catalisadas
Oxidoredutases	Hidrogenases, Oxidases, Peroxidases	Oxidação e redução: oxigenação de ligações C-H, C-C, C=C, C=O
Transferases	Transaldolases, Transcetolases	Transferência de grupos: aldeídico, cetônico, acila, fosforila, metila
Hidrolases	Esterases, Lípases, Peptidases	Formação e hidrólise de ésteres, amidas, epóxidos, nitrilas e anidridos
Liases	Descarboxilases, Cetoácidosliases	Adição e eliminação de pequenas moléculas sobre ligações C=C, C=O, C=N.
Isomerases	Racemases, Epimerases, Mutases	Isomerizações tais como racemização, epimerização.
Ligases	Sintetases	Formação e clivagem de ligações C-O, C-S, C-N, C-C.

O primeiro fator a ser levado em consideração para a incorporação de uma biotransformação em um processo sintético é a regio e estereosseletividade que pode ser obtida com o uso de reações catalisadas por

enzimas. Biotransformações estão sendo utilizadas como um método para gerar compostos opticamente puros.¹⁴ A biotransformação vem se tornando uma ferramenta alternativa e muitas vezes competitiva à disposição dos químicos sintéticos.

De acordo com Faber¹⁵ e Loughlin¹⁶, as enzimas possuem certas vantagens em reações de síntese orgânica:

- ⇒ são catalisadores de alta eficiência – as velocidades de reação via enzimática são maiores se comparadas a catálise química;
- ⇒ atuam sob condições suaves de temperatura (20 – 40 °C);
- ⇒ podem catalisar reações em regiões pouco reativas da molécula;
- ⇒ são quimiosseletivas – podem atuar em somente um tipo de grupo funcional mesmo na presença de outros grupos reativos;
- ⇒ são regio e diastereosseletivas – as enzimas podem distinguir entre grupos funcionais com a mudança do meio reacional;
- ⇒ são enantiosseletivas – são catalisadores quirais e sua especificidade pode ser explorada para sínteses seletivas e assimétricas;
- ⇒ não são restritas aos seus substratos naturais;
- ⇒ catalisam reações em meios não aquosos (ou aquo-restritos), embora as vezes, se observe perda de atividade.

As enzimas hidrolíticas (proteases, celulases, amilases e lipases) são as mais freqüentemente utilizadas em síntese orgânica. Entre as várias razões que as tornam mais atrativas, pode-se citar a ampla disponibilidade, baixo custo, condições brandas de síntese, facilidade no seu uso e aplicação.⁵

(Figura 6)

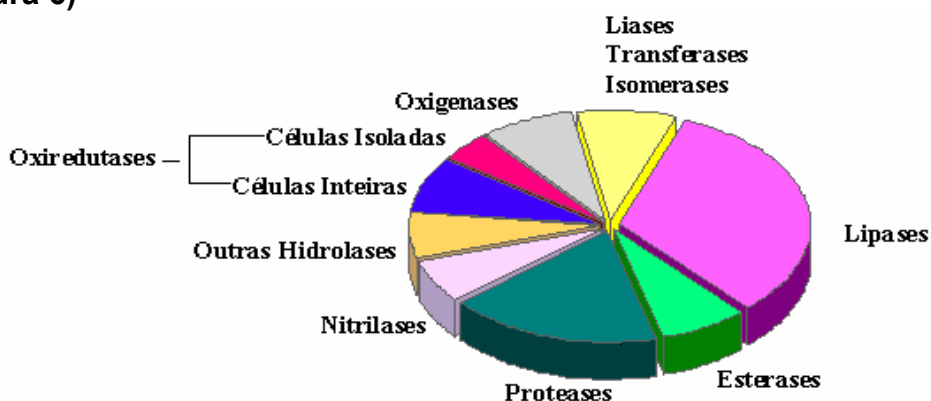


Figura 6. Utilização relativa das enzimas em biotransformações.⁵

1. 3. Lipases

As lipases (3.1.1.3.triacilglicerol hidrolases) são enzimas hidrolíticas presentes em diversos organismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias. Possuem massa molar em torno de 40 a 50 Kda, com mais ou menos 300 resíduos de aminoácidos.¹⁷⁻²⁰ Em seu meio natural possuem a habilidade de catalisar a hidrólise de ésteres, especificamente triacilgliceróis em ácidos graxos livres, di e monoacilglicerol e glicerol.²¹ Também possuem a função de catalisar a reação inversa executando esterificações, transesterificações (acidólise, interesterificação, alcoólise), aminólise e tiotransesterificação em solvente orgânico anidro, sistema bifásico e em solução micelar com alta especificidade. São enzimas extracelulares, produzidas por fungos tais como *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum sp* *Bacillus megaterium*, e por leveduras *Tulopsis sp* e *Candida sp*. Algumas bactérias que produzem lipases são *Pseudomonas sp*, *Achromobacter sp* e *Staphylococcus sp*. Destes organismos, as de *Aspergillus sp*, *Mucor sp*, *Rhizopus sp* e *Candida sp* já estão disponíveis comercialmente.^{19,22,23}

As lipases cujas estruturas foram elucidadas, são membros da família α - β -hidrolases e possuem uma tríade catalítica constituída dos resíduos de aminoácidos serina, histidina e ácido aspártico ou glutâmico. (Ser-His-Asp/Glu).

A **Figura 7** mostra a representação gráfica obtida por cristalografia de raio X da estrutura da lipase de *Candida rugosa*, destacando o seu sítio ativo.²⁴

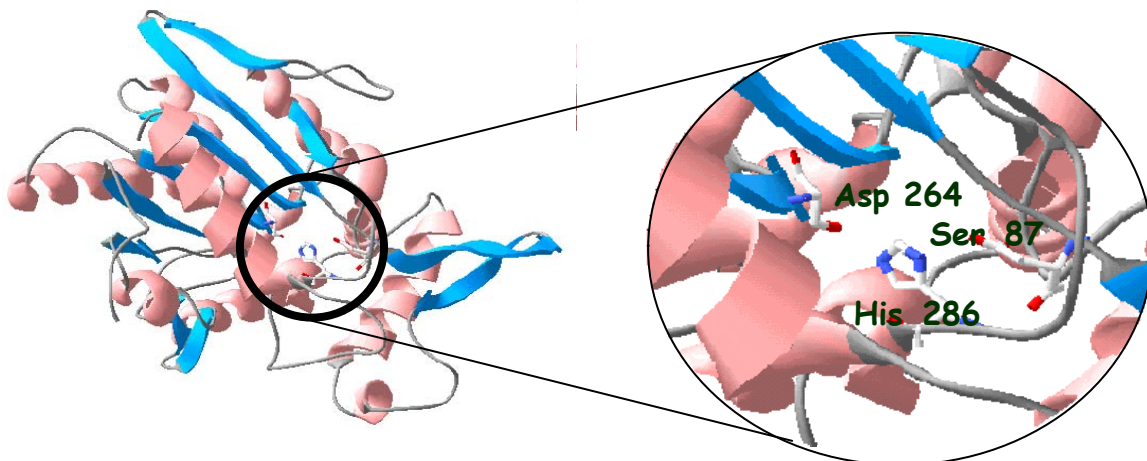
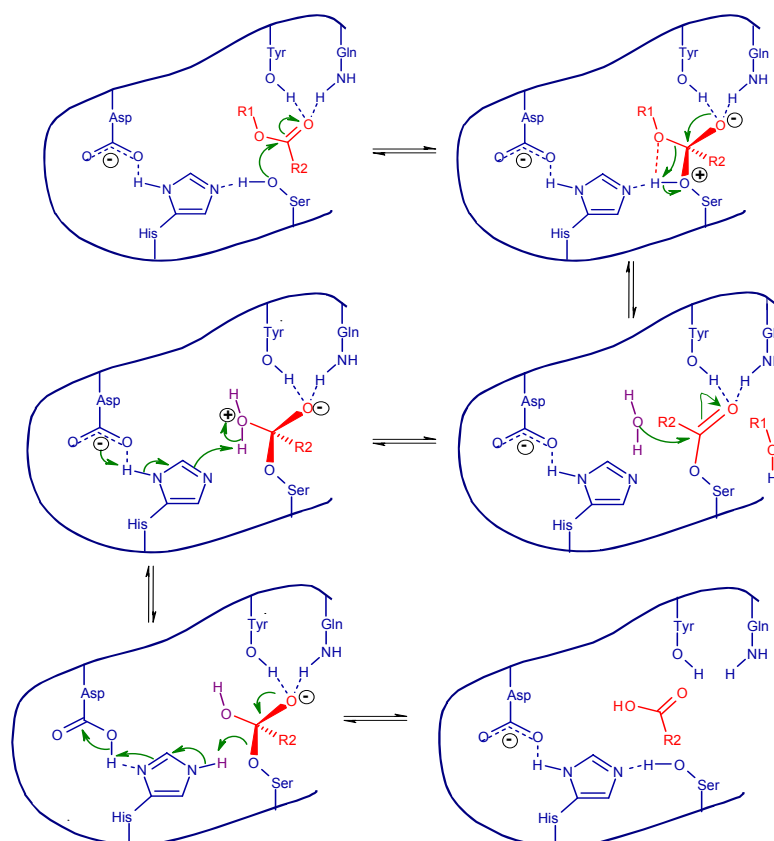


Figura 7. Representação gráfica da estrutura tridimensional da lipase de *Candida rugosa*, destacando o sítio ativo.²⁴

Todos os membros da família de estrutura α - β -hidrolase possuem um mecanismo comum de hidrólise de ésteres, que consiste em cinco etapas: ligação ao substrato éster; formação do primeiro intermediário tetraédrico por ataque nucleofílico da serina catalítica com o oxiânion estabilizado por duas ou três ligações de hidrogênio; quebra da ligação éster; saída da porção alcoólica e hidrólise. O mecanismo de ação catalítica de uma lipase na hidrólise de éster, está exemplificado no **Esquema 1**.



Esquema 1. Mecanismo proposto para a hidrólise enzimática de um éster.¹⁷⁻¹⁹

Conforme já citado na seção 1.2, as principais vantagens de seu uso em síntese orgânica, são o baixo custo, a grande disponibilidade comercial, não requerem cofatores (isto é, não requerem substâncias que estimulem a ação das enzimas), trabalham numa grande faixa de pH e em geral, apresentam estabilidade térmica.²⁵

As lipases apresentam a capacidade de preservar sua atividade catalítica em solvente orgânico. Devido a esta propriedade, seu potencial para conversão de gorduras e óleos em produtos para usos industriais tem sido amplamente investigado.²⁶

Du e col. utilizaram a lipase Novozym 435 na obtenção de biodiesel a partir do óleo de soja, acetato de metila e metanol como solvente, obtendo conversões de 92% em éster metílico **(1)**.²⁷ **(Figura 8)**

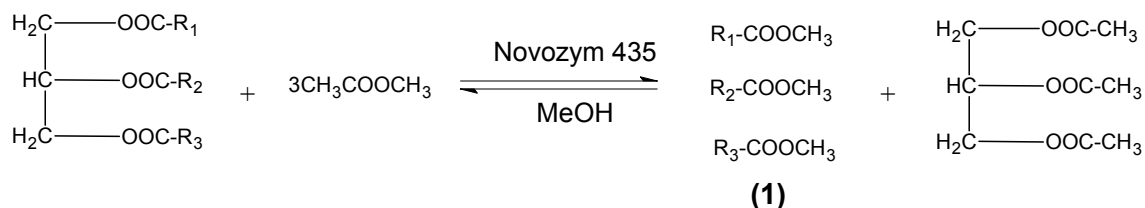


Figura 8. Produção de biodiesel através de interesterificação do óleo de soja com acetato de metila.

As lipases apresentam inúmeras aplicações na resolução de misturas racêmicas. No trabalho de Long e col. foi utilizada a lipase de *Candida rugosa* (LCr) na hidrólise de **(2)** para a produção do S-Ibuprofeno **(3)**. A lipase apresentou enantiopreferência pelo isômero (S), formando como sub-produto o 2-etóxi-etanol.²⁸ **(Figura 9)**

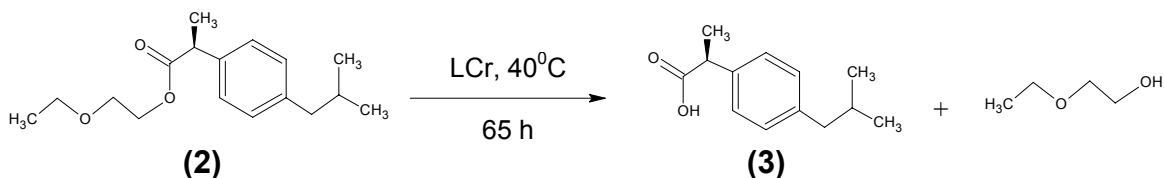


Figura 9. Resolução cinética da mistura racêmica do éster 2-etóxi-etil-ibuprofeno **(2)**.

A resolução cinética dos produtos das reações de Baylis-Hillman é um dos métodos mais convenientes para obtenção de moléculas multifuncionais opticamente ativas.²⁹ Nascimento e col., recentemente realizaram a transesterificação enantiosseletiva de diferentes α -metileno- β -hidroxi ésteres catalisada pela lipase de *Pseudomonas* sp (LPS) livre ou imobilizada em

poli(óxidoetileno) (PEO). Os produtos foram obtidos valores de ee_p de 99% e conversão de 50%.³⁰ (**Figura 10**).

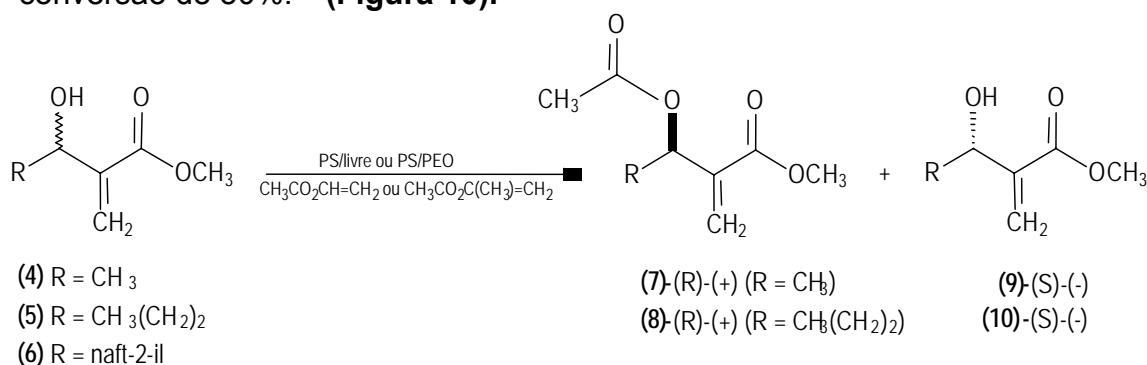


Figura 10. Resolução enzimática de α -metileno β -hidróxi ésteres.

As lipases também podem ser usadas na produção de fármacos, onde pode-se destacar o trabalho de Jaeger e col., que estudaram a síntese de um intermediário opticamente puro (**11**) para a produção de epotilona A, um agente antitumoral com a lipase de *Pseudomonas AK*.³¹ (**Figura 11**)

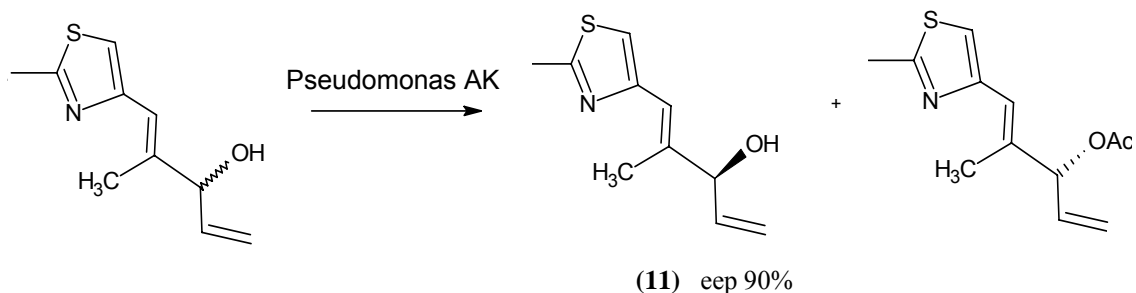


Figura 11. Síntese enzimática de um intermediário quiral para a obtenção de epotilona A.

As lipases também possuem a habilidade de catalisar reações de peridrólise, isto é catalisam a formação de perácidos utilizando ácidos graxos e peróxido de hidrogênio em condições brandas de temperatura e pH.³²

Klaas e col. prepararam novos perácidos de duas formas distintas, e em ambas utilizaram a lipase de *Candida antarctica* B (CALB) como catalisador. Os ácidos carboxílicos foram convertidos aos correspondentes perácidos com peróxido de hidrogênio ou através da peridrólise de ésteres carboxílicos.

Por exemplo, a **Figura 12** mostra a peridrólise do fenilacetato de etila (**12**).³³

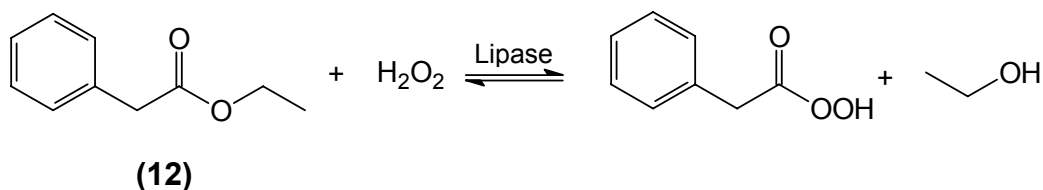


Figura 12. Peridrólise do fenilacetato de etila.

A utilização dessas enzimas em síntese orgânica tem sido de grande importância.³⁴⁻⁴⁰ Porém, a grande dificuldade ainda está em estabilizar estes catalisadores em meio orgânico, tornando desta forma, um processo de alto custo. Muitos estudos tem sido realizados no sentido de se encontrar maneiras de tornar os processos enzimáticos mais eficientes com usos repetidos do biocatalisador, uma vez que dependendo do tipo, fonte, pureza e reações a serem utilizadas, estas estão sujeitas a inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso.

Frente a este problema, técnicas de imobilização vêm sendo desenvolvidas para fornecer estabilidade para as enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização em solventes orgânicos.⁴¹⁻⁴³

1.4. Imobilização de enzimas

Como mencionado anteriormente, essas técnicas envolvem a ligação de enzimas em suporte sólido insolúvel em água (ligação em suporte) ou ligações cruzadas intermoleculares de enzimas por reagentes bifuncionais ou multifuncionais. Outro método de imobilização, consiste na inserção de enzimas em espaços confinados, ao qual ela não pode sair, mas onde permanece cataliticamente ativa (confinamento em matriz sólida).^{43, 44}

Outro método de imobilização, apesar de não apresentar ligações e nem confinar fisicamente as enzimas, é o sistema bifásico. Este, como o próprio nome diz, é formado de duas fases onde na fase aquosa se encontra a enzima e na orgânica, o substrato a ser complexado. A interação das duas fases ocorre através de agitação mecânica.^{44,45}

A enzima quando imobilizada retém sua configuração estrutural devido as possíveis ligações de hidrogênio que ocorrem na superfície do material. Isto conduz a uma certa dificuldade de vibração, aumentando assim sua estabilidade térmica.

Na **Figura 13** estão representados os principais métodos de imobilização de enzimas.

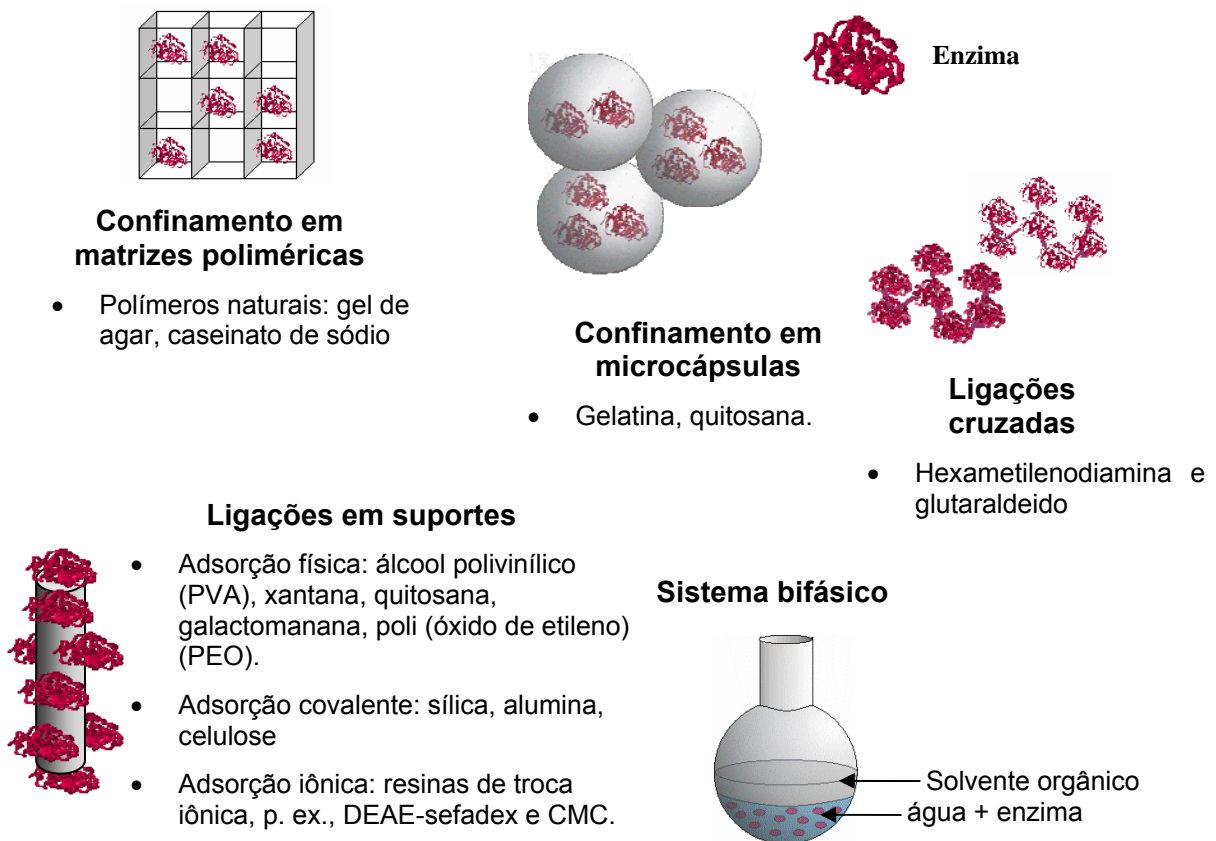


Figura 13. Representação gráfica dos principais métodos de imobilização de enzimas. (adaptado Ref. 5)

1.4.1 - Imobilização em suportes sólidos

Nos últimos dez anos, vários métodos de imobilização vêm sendo desenvolvidos com o intuito de se reutilizar as enzimas e como consequência a diminuição dos custos do processo.

Sinegani e col. utilizaram diversos silicatos tais como a kaolinita e montmorilonita para a imobilização de diversas celulasas com dessorção de apenas 16% do biocatalisador. Os autores estudaram a catálise da degradação de celulose com este suporte.⁴⁶

O encapsulamento de enzimas têm-se mostrado um processo bastante eficiente. Pode-se citar o trabalho de Darder e col. que imobilizam oxidases em nanoporos de alumina (Al_2O_3) e demonstraram a manutenção da atividade enzimática frente a variações de pH e solventes orgânicos.⁴⁷

Yadav e col. imobilizaram a lipase de *Candida antarctica* em sílica e alginato de cálcio para a transesterificação do álcool p-clorobenzílico com acetato de vinila a 30°C, obtendo-se o éster com 68% de conversão. O biocatalisador foi reutilizado até quatro vezes sem perda de atividade.⁴⁸

Recentemente, uma revisão dos métodos mais comuns de imobilização de lipases em diversos polímeros (p. ex.: PEO, PSS, poli(HEMA-MAPA)) e a aplicação destes sistemas para obtenção de compostos de interesse sintético foi apresentado por Vecchia e col.^{49,50}

1.4.2. Sistema bifásico

Este é um método de imobilização bastante particular. Não existem barreiras físicas entre enzima e o substrato, ou seja o biocatalisador não fica ligado ou confinado em um suporte sólido.

No sistema bifásico, a água é o “suporte” para as enzimas, e o solvente orgânico o “suporte” para os substratos. A interação das fases ocorre através de intensa agitação.⁴⁵

Hollander e col. estudaram a hidrólise contínua da Penicilina G (**13**) em sistema água/acetato de butila catalisada pela penicilina acilase imobilizada, obtendo (**14**) com rendimento de 97% à 30°C.⁵¹ (**Figura 14**)

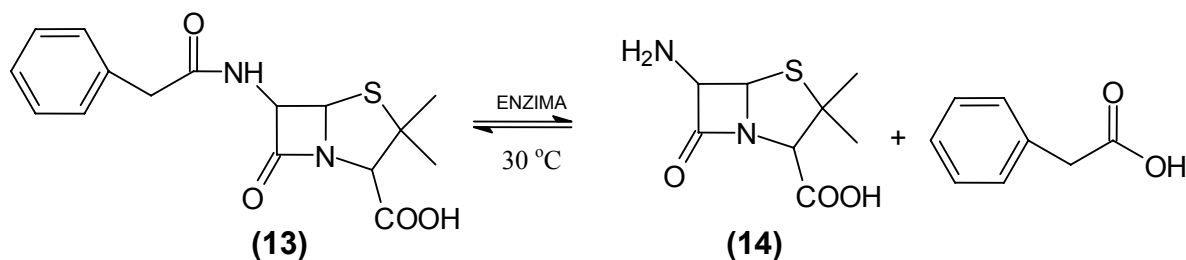


Figura 14. Hidrólise enzimática da Penicilina G.

As principais vantagens do método são:⁵²

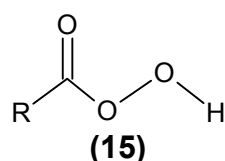
- ⇒ reações de substratos insolúveis em água podem ser feitas em volumes reduzidos de uma mistura de reação;
- ⇒ o produto pode ser facilmente separado do biocatalisador;
- ⇒ a inibição da enzima por substratos ou produtos é minimizada devido a baixa concentração destes na fase aquosa, fase onde se localiza o biocatalisador.

As principais desvantagens desse sistema são:

- ⇒ inativação ou inibição da enzima dependendo do solvente utilizado;
- ⇒ necessidade do sistema permanecer sob agitação vigorosa, para acelerar a reação;
- ⇒ a reutilização desse sistema, em geral, não se mostra satisfatória devido a perda de atividade do biocatalisador.

1.5. Peróxi-ácidos

Os peróxi-ácidos **(15)** (ou perácidos) são ácidos que possuem um grupamento peróxido.⁵³



Estes compostos são importantes oxidantes em síntese orgânica assim como na indústria química. A oxidação mais comum, promovida pelos perácidos é a de ligações C=C e C=N, mas também são amplamente utilizados em oxidações de Baeyer-Villinger⁵³⁻⁵⁵, oxidações de compostos sulfurados⁵⁶ e em numerosas oxidações catalisadas por metais de transição⁵⁷ e/ou microorganismos.⁵⁸ **(Figura 15)**

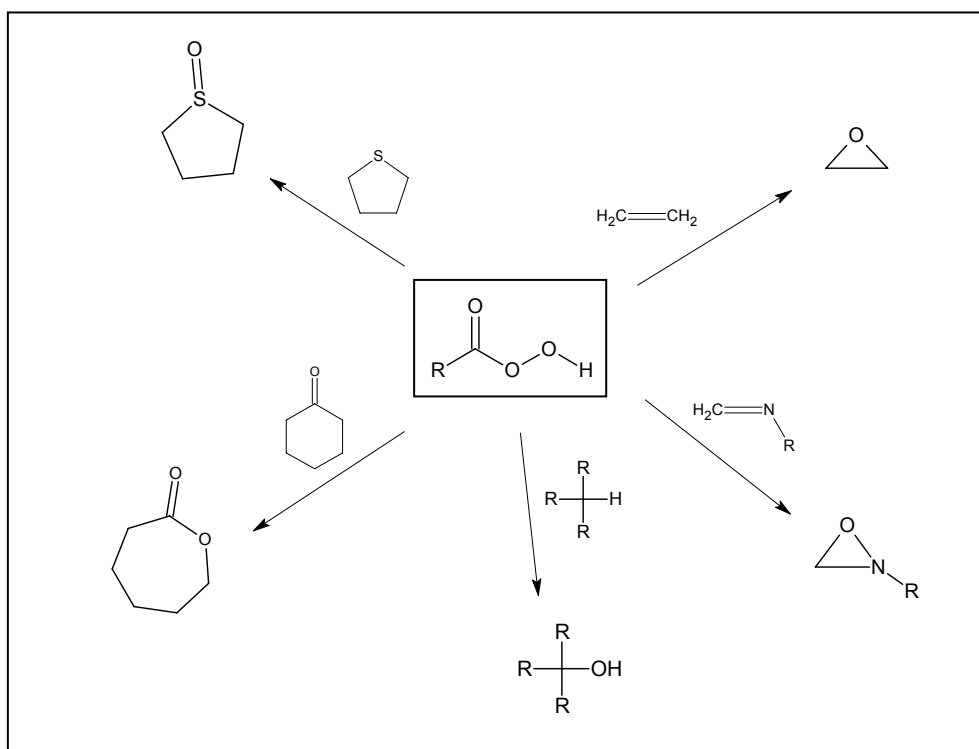


Figura 15. Emprego de perácidos em processos de síntese orgânica.

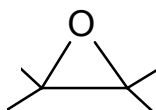
Apesar de sua importância como agente oxidante, o número de peróxido-ácidos disponíveis para síntese orgânica ainda é muito limitado. Os ácidos perfórmico e peroxi trifluor-acético são formados *in situ* a partir de ácidos e peróxido de hidrogênio, enquanto os ácidos peracético e *m*-cloro-perbenzóico (*m*-CPBA) e o sal de magnésio do ácido monoperóxi-ftálico, são produtos comerciais.^{53,59}

A produção quimio-enzimática dos peróxido-ácidos, catalisada por lipases, é atraente porque fornece aos químicos orgânicos sintéticos um importante oxidante em condições brandas (temperatura ambiente, pH neutro), permitindo que as reações de oxidação ocorram *in situ*, sem a necessidade de se isolar o perácido.^{60, 61}

1. 6. Epóxidos

Os oxiranos (termo utilizado pela IUPAC)(**16**) constituem um grupo de éteres, cuja sua característica é a presença de um anel de três membros C-O-C. Estes átomos estão ligados entre si por ligações σ .

As ligações C-O são relativamente polares devido a alta diferença de eletronegatividade entre os átomos.⁶²



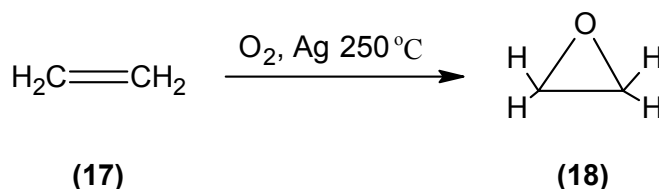
(16)

O epóxidos, possuem propriedades bastante distintas, no que se refere aos seus análogos alifáticos, devido a formação de um anel de três membros, aos quais lhe conferem grande tensão conformacional e angular, contribuindo assim, como um fator desestabilizante na molécula. Essa reatividade diferenciada torna os epóxidos substâncias de grande interesse sintético, pois estes podem reagir com uma grande variedade de nucleófilos formando uma série de produtos multifuncionalizados.^{53,59}

A epoxidação é uma reação de extrema importância em síntese orgânica e consiste na inserção de átomos de oxigênio em uma molécula para a formação de um anel de três membros.^{45,52,53}

Um epóxido muito importante, é o óxido de eteno (**18**), que pode ser preparado industrialmente por oxidação catalítica do eteno (**17**) com o ar.^{62, 63}

(Figura 16)



(17)

(18)

Figura 16. Processo industrial de epoxidação do eteno, por oxidação catalítica.

As reações de clivagem do anel oxirano são extremamente úteis em síntese orgânica, por exemplo, na síntese do poli(etilenoglicol).^{53,62} (**Figura 17**)

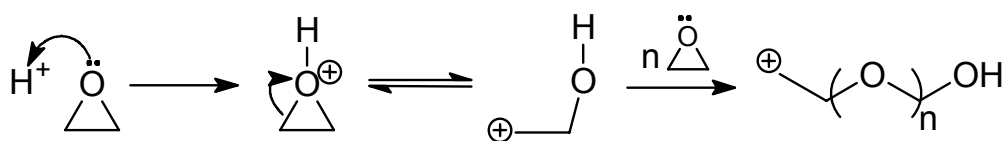


Figura 17. Mecanismo de formação poli(etilenoglicol), via catálise ácida.

McCluskey e col. utilizaram a abertura de epóxidos como um processo de produção de amino álcoois (**19**) e halodrinas (**20**). Como catalisador foi utilizado o BiCl₃, obtendo-se conversões de 5-94% em função do nucleófilo empregado.⁶⁴ (**Figura 18**)

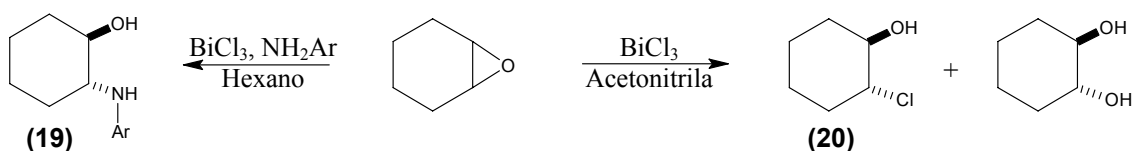


Figura 18. Abertura de epóxidos na síntese de moléculas multifuncionalizadas.

Os epóxidos também podem ser utilizados na preparação de difluoretos. Yu e col. realizam a abertura de epóxidos utilizando *N,N*-dietil- α,α -difluoro-(*m*-metilbenzil)amina (DFMBA).⁶⁵ (**Figura 19**)

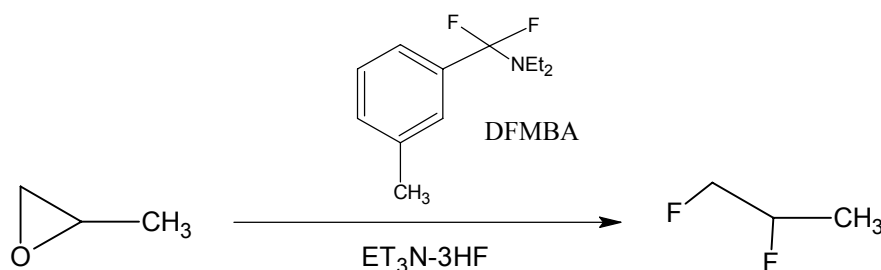


Figura 19. Conversão direta à difluoretos vicinais a partir de epóxidos.

O uso de epóxidos em síntese orgânica vem sendo explorado intensivamente. Podem ser obtidos através de várias metodologias, destacando-se a síntese enzimática via-perácidos⁶⁶, epoxidação nucleofílica.⁶⁷

e epoxidação com o auxílio de complexos metálicos. Cita-se o trabalho de Ghadiri e col. que utilizam cobre II complexado com 1,8-dibenzil-1,3,6,8,10,13-hexaazaciclotetradecano (DHCT-macrosciclo) imobilizado em montmorilonita na epoxidação do norborneno (**21**), obtendo-se o epóxido (**22**) com rendimento de 48%.⁶⁸ (**Figura 20**)

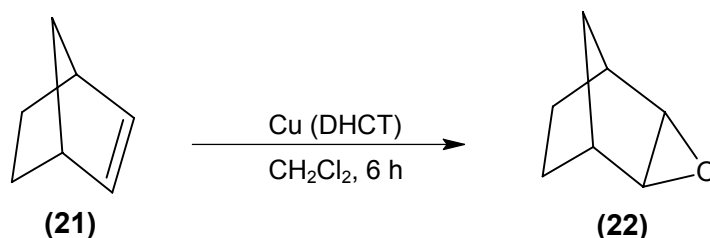
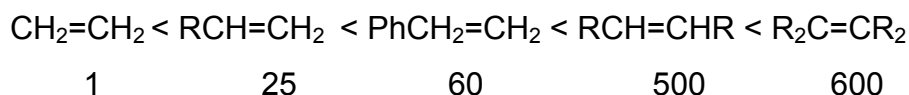


Figura 20. Esquema geral da epoxidação do norborneno (**21**) catalisada por complexos de cobre II.

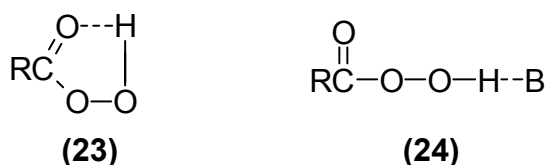
Para a formação de epóxidos existem outras metodologias descritas na literatura, e as mais importantes serão apresentadas a seguir.

1. 6. 1. Epoxidação eletrofílica por perácidos

Neste tipo de reação, a principal característica é a epoxidação através do uso de perácidos e está intimamente ligada a densidade eletrônica na ligação C=C e pelos grupos eletro-atraentes nos perácidos. A escala de reatividade é importante para se prever a seletividade dos produtos.⁵³



A eficiência de uma epoxidação eletrofílica está intimamente ligada às interações intramoleculares do perácido. A ligação intramolecular de hidrogênio (**23**) foi evidenciada por espectroscopia de infra-vermelho (IV) e outras técnicas de análise. Em solventes nos quais possa haver coordenação, os perácidos existem como complexo (**24**) com ligações intermoleculares de hidrogênio.⁵³



O solvente é de grande importância em epoxidações via perácidos. Em éter etílico ou acetato de etila a velocidade de epoxidação é cerca de 1/10 das mesmas em benzeno ou clorofórmio.

Devido a estes fatos, postulou-se a existência de um estado de transição cíclico **(25)** que pode ser estabilizado pelo solvente, conforme apresentado na **Figura 21**.

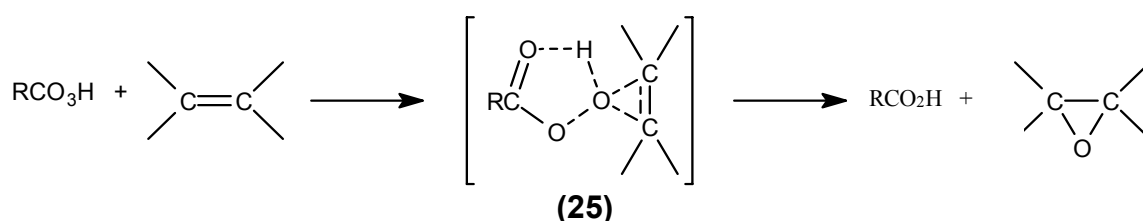


Figura 21. Mecanismo de epoxidação de alcenos via peróxi-ácidos.

A reação de epoxidação que utiliza perácidos como agente oxidante é conhecida como reação de Prilezhaev.⁵⁴

O trabalho mais recente que utiliza perácidos e, em particular o *m*-CPBA, é o de Coelho e col. que estudaram a epoxidação anti-seletiva de álcoois alílicos derivados de adutos de Baylis-Hillman **(26)**.⁶⁹ **(Figura 22)**

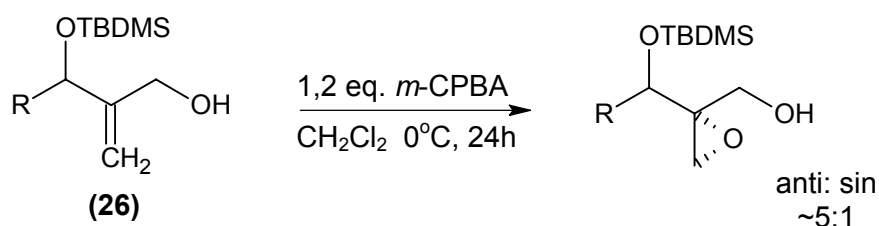


Figura 22. Epoxidação de derivados de álcoois alílicos via *m*-CPBA.

1. 6. 2. Epoxidação via haloidrinas

Um tipo de epoxidação bastante utilizada em síntese orgânica é com o uso de haloidrinas (27), em meio básico.^{70, 71} (Figura 23)

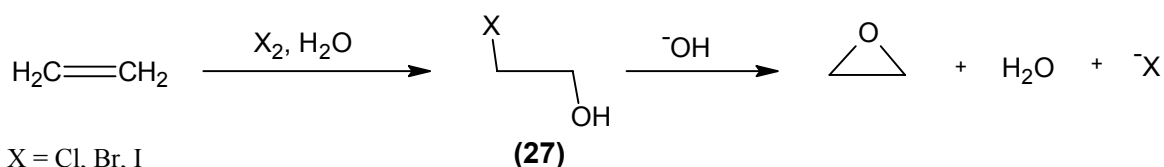


Figura 23. Reação de epoxidação via haloidrinas.

A desvantagem deste método encontra-se na aplicação de halogênios, cuja grau de toxicidade é bastante alto, se comparado com outros métodos de epoxidação.

1.6.3. Epoxidação catalisada por aminoácidos

A idéia original do uso de poli(alanina) ou poli(leucina) como catalisadores para epoxidação de cetonas α,β -insaturadas pode ser atribuída a Juliá e Colonna. As equipes espanholas e italianas estudaram esta reação por um período de cerca de quatro anos no início dos anos 80.⁷²

O mecanismo pelo qual poli(aminoácidos) simples catalisam uma epoxidação assimétrica tipo enzimática não está totalmente claro. Foi comprovado que nem todos poli(aminoácidos) podem ser empregados na reação de Juliá-Colonna.

Roberts e col. descreveram o método de epoxidação de cetonas α,β -insaturadas (28) na presença de peróxido de hidrogênio catalisada por L-leucina, obtendo-se o correspondente epóxido com rendimento de 66% e ee de 95%.^{34, 72} (Figura 24)

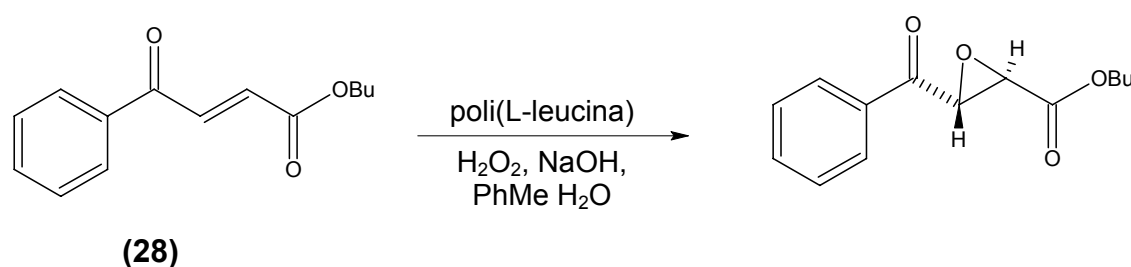


Figura 24. Epoxidação assimétrica de uma cetona α,β -insaturada catalisada por poli(L-leucina).

Existem algumas limitações na epoxidação assimétrica de Juliá-Colonna. Por exemplo outros alcenos que não são cetonas α,β -insaturadas com sistemas “pobres” de elétrons geralmente não são reativos e alcenonas tri-substituídas, no geral também são pouco reativas.

1.6.4. Epoxidação nucleofílica

Esta consiste na reação de íons hidroperóxido com olefinas elétron-deficientes. Esta reação também é conhecida como epoxidação alcalina nucleofílica ou epoxidação de Weitz-Scheffer.⁵³

Utilizando íons peróxido, Rodriguez e col. empregaram o *tert*-butilperóxido de lítio (*t*-BPLi) na epoxidação diastereosseletiva de ésteres α - β insaturados (**29**) obtendo rendimento de 42% e seletividade de 88% para o produto *anti*.⁷³ (**Figura 25**)

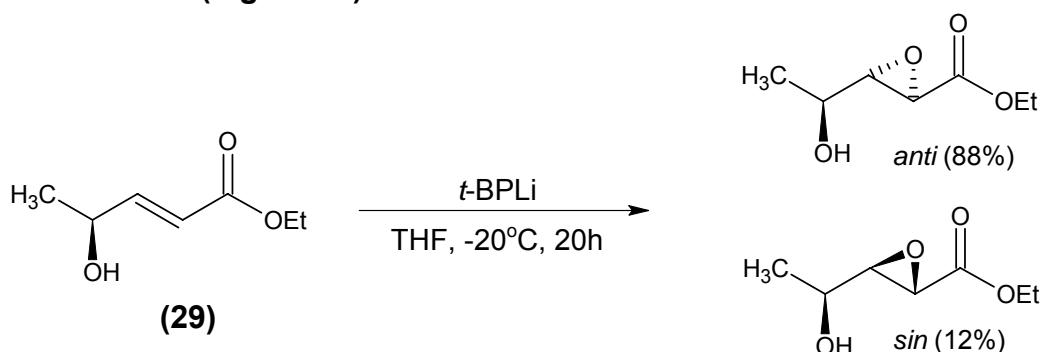


Figura 25. Epoxidação nucleofílica de ésteres α - β insaturados catalisada por *tert*-butilperóxido de lítio.

Outro trabalho que merece destaque é a epoxidação nucleofílica utilizando *m*-CPBA em meio alcalino desenvolvido por García Ruano e col., na epoxidação de compostos com duplas ligações eletro-deficientes (**30**), obtendo o epóxido (**31**) com conversão de 66%. (**Figura 26**)⁷⁴

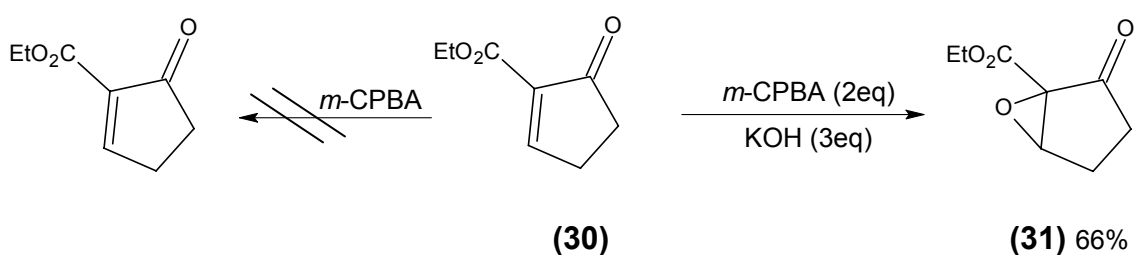


Figura 26. Epoxidação nucleofílica catalisada por *m*-CPBA em meio alcalino.

1. 6. 5. Epoxidação quimio-enzimática de alcenos

A epoxidação quimio-enzimática é uma ferramenta importante na síntese orgânica, visto que a utilização de lipases como catalisadores na formação de peróxidos pode formar peróxi-ácidos de diferentes potenciais de oxidação e conseqüentemente alta seletividade na síntese de epóxidos.⁷⁵⁻⁷⁷ (Figura 27)

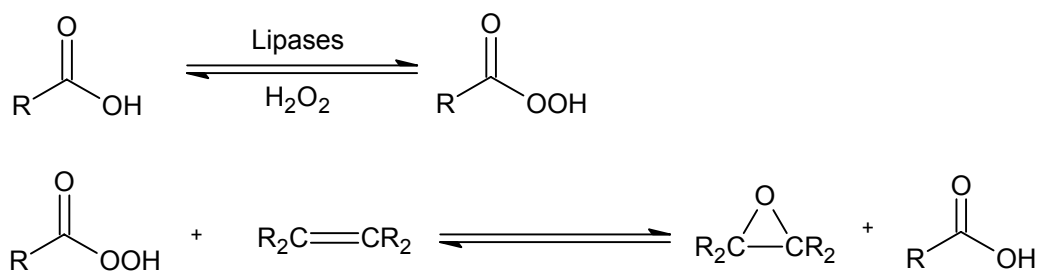


Figura 27. Epoxidação quimio-enzimática de alcenos.

Os primeiros trabalhos envolvendo produção enzimática de peróxi-ácidos foram descritos por Bjorkling e col. no começo dos anos 90.⁷⁸ Outros pesquisadores como Klaas e Warwel utilizaram lipases imobilizadas em filmes poliméricos e resina aniônica (Novozym 435), respectivamente na síntese de peróxi-ácidos.⁷⁹ (Figura 28)

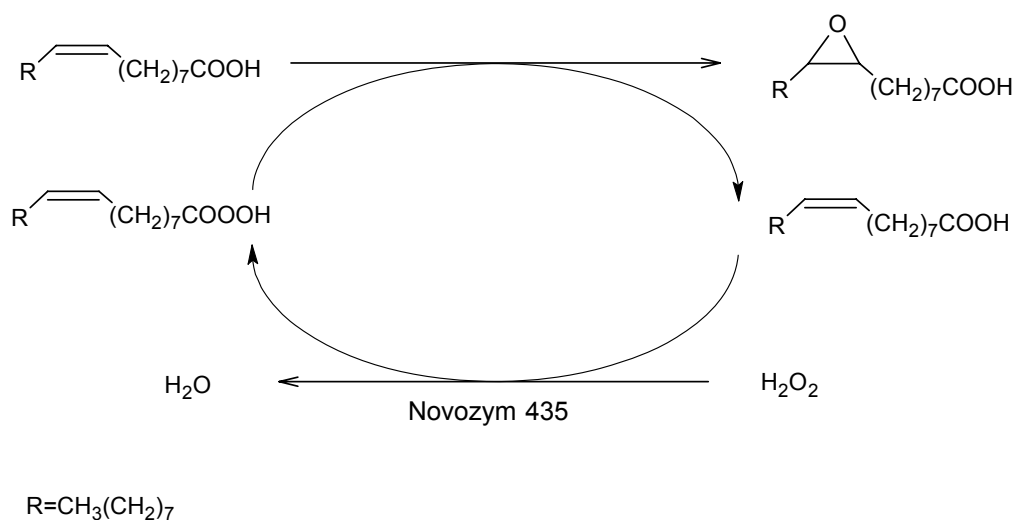


Figura 28. Epoxidação quimio-enzimática do ácido oleico.

Skouridou e col., utilizaram a Novozym 435 (lipase de *Candida antarctica*) para a preparação do ácido peroctanóico e utilização *in situ* na epoxidação do α -pineno (**32**).⁸⁰ (Figura 29)

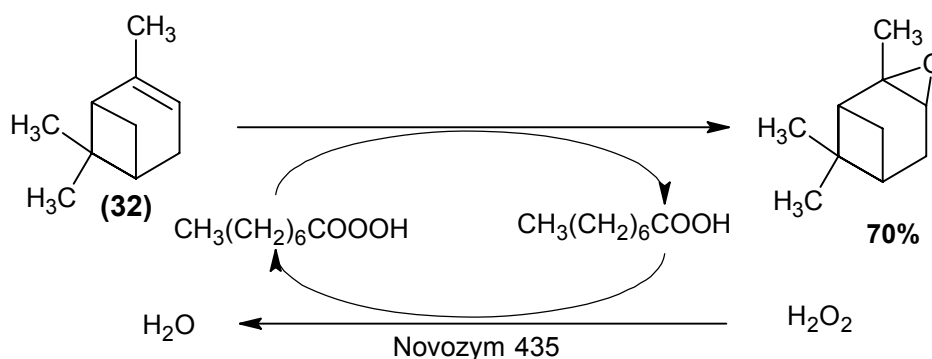
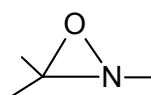


Figura 29. Epoxidação do α -pineno, mediada pela lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435).

1.7. Oxaziridinas

Oxaziridinas ou oxaziranos (**33**), são uma classe de compostos que possuem um anel de três membros C-O-N e constituem uma classe de heterociclos bastante empregados em síntese orgânica.^{81, 82, 83}



(33)

As primeiras oxaziridinas foram reportadas na literatura em meados da década de 50.⁸⁴⁻⁸⁶ São compostos bastante reativos e instáveis devido ao anel de três membros formados por C-O-N, o qual confere tensão conformacional e angular, além das ligações entre os átomos do anel.

As oxaziridinas podem ser obtidas através da oxidação de iminas que consiste na inserção de um oxigênio nas ligações C=N, formando o anel C-O-N (**33**).

Existem na literatura muitos trabalhos relacionados a síntese destes compostos. Kraiem e col. utilizaram tricloro-acetonitrila e peróxido de hidrogênio em temperatura ambiente na oxidação de alquil-iminas (**34**) obtendo a oxaziridina (**35**) com rendimento de 98%.⁸⁷ (Figura 30)

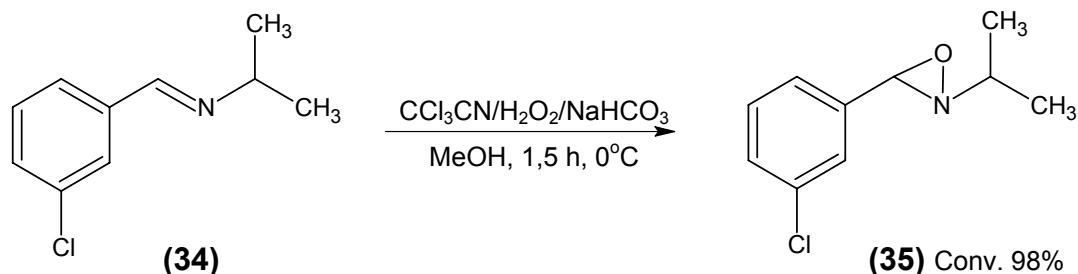


Figura 30. Síntese de oxaziridinas via tricloro-acetonitrila e peróxido de hidrogênio.

Mohajer e col. relataram a utilização do Oxone[®] (monoperoxissulfato de tetrabutylamônio) (**36**) na oxidação das aldiiminas (**37**) e (**38**).⁸⁸ (Figura 31)

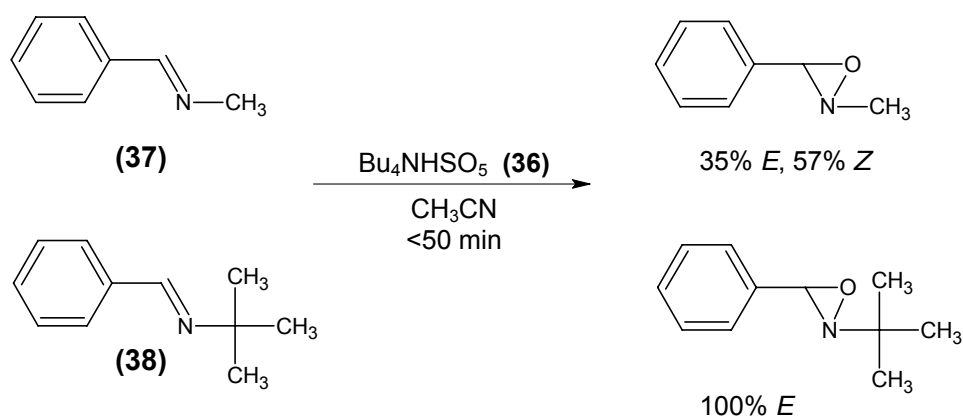


Figura 31. Oxigenação de iminas com Oxone[®].

Trabalhos recentes têm demonstrado o uso de oxaziridinas em síntese orgânica. Destaca-se o trabalho de Fontecave e col. que estudou a oxidação enantiosseletiva de sulfetos (**39**) na presença de ZnCl_2 com a formação de um sal de diazônio intermediário, obtendo-se rendimento de 45% em (*S*)-(**40**) e ee de 32%.⁸⁹ (Figura 32)

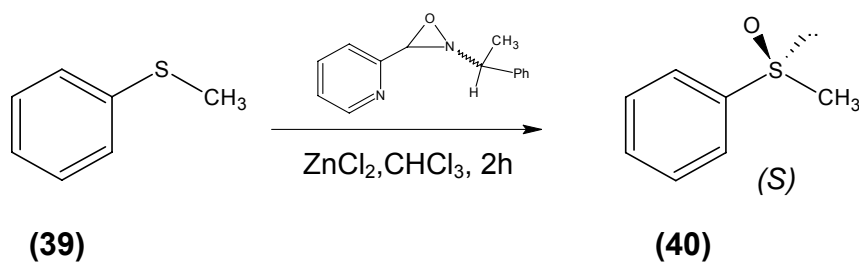


Figura 32. Oxidação de sulfetos mediada por oxaziridinas.

As oxaziridinas também podem ser usadas em reações de aminação. Armstrong e col. utilizaram a oxaziridina **(41)** na aminação de enolatos **(42)**, obtendo-se **(43)** com rendimento de 36%.⁹⁰ (**Figura 33**)

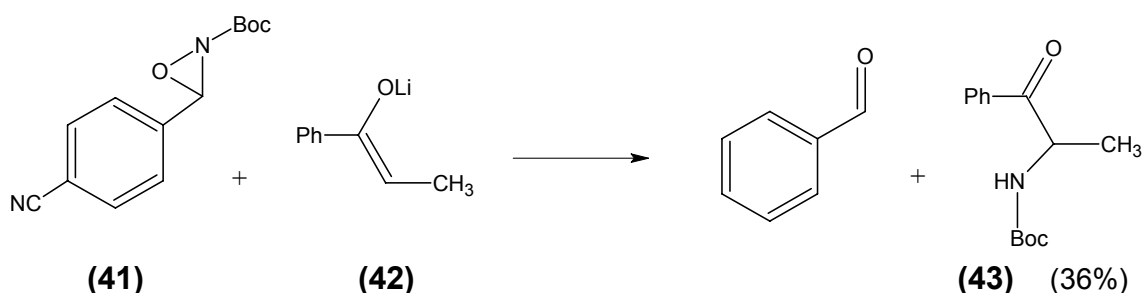


Figura 33. Reação de aminação utilizando oxaziridinas.

Para avaliar e prever a influencia de grupos substituintes em uma determinada reação, pode-se utilizar das correlações lineares de energia livre, também conhecidas como análises de correlação.

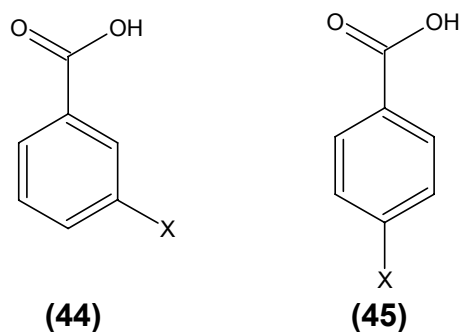
1.8. Relações lineares de energia-livre (Análises de correlação).

A relação entre estrutura e atividade de um composto químico tem sido bastante estudada nos últimos anos na química orgânica para a predição e até confirmação de mecanismos reacionais.⁹¹ Conseqüentemente, os químicos podem prever o que acontece numa reação quando se substitui um hidrogênio por um grupo metila, por exemplo, ou um cloro por um flúor em um composto onde pode observar um aumento ou diminuição na velocidade da reação.^{92,93}

Tais mudanças, como a eletronegatividade dos substituintes em um substrato ou a habilidade de ionização do solvente implicam em mudanças na velocidade da reação ou na posição do equilíbrio químico.⁹⁴ A análise de correlação surgiu como uma ferramenta capaz de medir essas variações de

comportamento em uma reação, o que facilita a quantificação dessas previsões.⁹⁴ A análise de correlação mais comum está relacionada aos substituintes do anel aromático. Os grupos substituintes do anel são usualmente correlacionados à velocidade de reação ou constantes de equilíbrio, indicando a tendência da reação.⁹¹

Hammett introduziu a primeira relação linear de energia livre para a elucidação de mecanismos de reação na ionização de derivados substituídos do ácido benzóico* **(44)** e **(45)**, relacionando a influência de uma substituinte X no valor da constante de acidez (K_a). O substituinte X é fisicamente separado do local de ionização, mas a influência eletrônica é transmitida através do sistema de elétrons π da molécula.⁹⁵



A relação entre K_a e o efeito do grupo substituinte foi determinada através da **Eq.1**;

$$\log \frac{k}{k_0} = \sigma \rho \quad \text{Eq. 1}$$

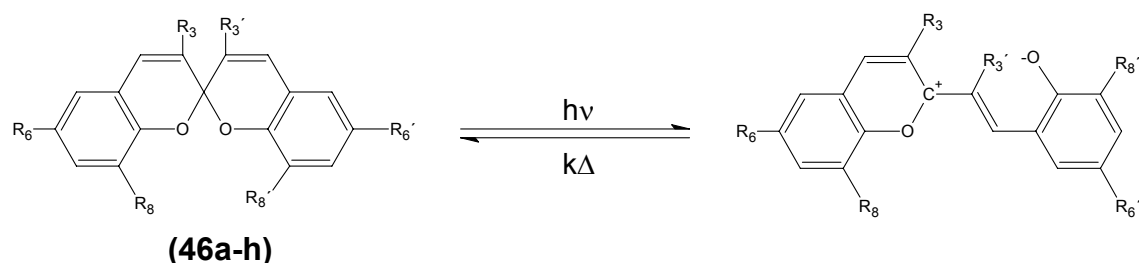
onde k_0 é a constante de equilíbrio quando $X = H$, k é a constante de ionização para cada grupo X, ρ é constante sob várias condições e mede a

* *Orto* substituintes não estão incluídos pela sua proximidade com o local de ionização, introduzindo efeitos que não presentes em substituições *para* e *meta*. O *efeito orto* promove efeitos estéreos, eletrônicos, ligações de hidrogênio e até interações intramoleculares.

suscetibilidade de uma reação a efeitos eletrônicos. Quando ρ apresenta valores positivos indica que reação é facilitada por grupos eletro-retiradores, valores negativos indicam que a reação é favorecida por grupos eletro-doadores (ou doadores de elétrons). A constante σ (sigma) descreve as propriedades doadoras ou receptoras de elétrons de um substituinte. A **Eq. 1** é conhecido como “*Equação de Hammett*”.⁹⁶

A Equação de Hammett pode ser aplicada em muitas medidas físicas, incluindo frequências de IV e deslocamentos de sinais em RMN.⁹⁷

Trabalhos recentes demonstram a aplicação das correlações de Hammett. Por exemplo, Lu e col. estudaram os efeitos dos grupos substituintes na velocidade de descoloração térmica de bis-benzopiropiranos (**46a-h**).⁹⁸



(46)	a	b	c	d	e	f	g	h
R _{3,3'}	H	H	H	H	H	H	Me	Me
R _{6,6'}	OMe	Me	H	F	Cl	NO ₂	OMe	Me
R _{8,8'}	H	H	H	H	H	H	H	H

Figura 34. Reação de descoloração térmica de bis-benzopiropiranos.

2. OBJETIVOS

2. 1. Objetivo geral

Utilizar lipases de diferentes fontes em sistema bifásico como biocatalisadores em reações de peridrólise de ácidos carboxílicos para formação de seus respectivos perácidos, e a utilização destes na epoxidação *in situ* de compostos que contenham duplas ligações C=C e C=N. Como biocatalisadores, serão utilizadas as lipases de *Cândida antarctica* (Novozym 435), *Pseudomonas* sp (LPS) e *Rhizopus orizae* (LRO).

2. 2. Objetivos específicos

- **Preparar epóxidos derivados do cicloexeno.**

Serão avaliados:

- A influência do solvente orgânico e de Líquidos iônicos no meio reacional;
- O efeito do comprimento da cadeia alquílica do doador acila (ácido carboxílico ou éster) bem como sua concentração;
- A reutilização da lipase Novozym 435.

- **Preparar epóxidos derivados do cinamato de etila.**

Serão avaliados:

- A conversão em epóxidos em função de lipases de diversas procedências;
- O efeito do solvente orgânico;
- O efeito dos grupos substituintes nos cinamatos de etila.

- **.Preparar oxaziridinas derivadas da N-benziliden-anilina via enzimática.**

Serão avaliados:

- A formação de oxaziridinas utilizando a lipase Novozym 435 como biocatalisador;
- A influência de alguns grupos substituintes e do meio reacional;
- A decomposição das iminas no meio reacional.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Equipamentos utilizados nas reações e caracterização dos reagentes e produtos.

As reações foram realizadas com o auxílio de um banho termostatizado MQBTZ99-20 (Microquímica) e quatro agitadores magnéticos (Microquímica – MQAMA-301) e um agitador tipo Dubnoff (Technal-TE053).

Os reagentes e produtos foram caracterizados por técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear (RMN) e de infra vermelho (IV).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono (RMN- ^1H e ^{13}C) foram obtidos em um espectrômetro Bruker (200MHz) e Varian (400MHz), utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$ ppm). O solvente utilizado foi o CDCl_3 .

A caracterização e quantificação dos produtos foram realizadas através da comparação das integrais dos sinais característicos dos reagentes de partida e do produto formado. (Vide Seções 3.4.4, 3.4.5 e 3.4.6.)

As análises de infra vermelho (IV) foram feitas em um espectrofotômetro Perkin Elmer FTIR 16PC, e a caracterização através da comparação dos sinais com padrões da literatura.^{99, 100}

As análises de cromatografia gasosa foram realizadas em um cromatógrafo a gás GC-14B Shimadzu com coluna capilar Shimadzu (CBP-5-M25-025m). Os parâmetros utilizados nas análises estão apresentados na **Tabela 2**.

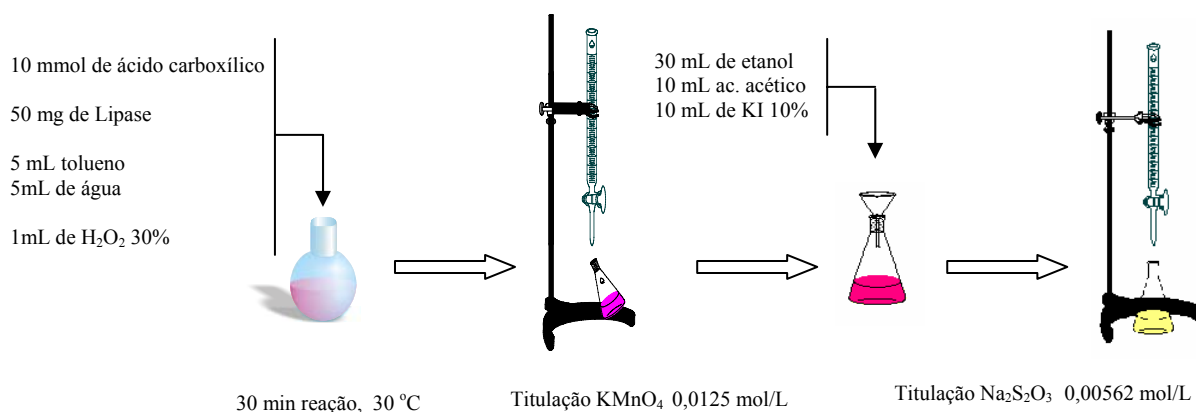
Tabela 2. Parâmetros das análises por cromatografia gasosa.

Parâmetros	
Temperatura Inicial	50 °C
Temperatura Final	250 °C
Taxa de Aquecimento	10 °C/min
Injetor: split 200	280 °C
Detector: FID	290 °C
Pressão do gás carreador (H_2)	75kPa
Volume da Amostra	1 μL

A conversão em produtos foi obtida através da razão das áreas dos picos do reagente e produto. (Vide Secção 3.4.6)

A quantificação dos perácidos formados pelas lipases, foi determinada através de titulação iodométrica, na ausência dos substratos:^{101, 102}

O método consistiu nas seguintes etapas, e estão apresentadas no **Esquema 2**.



Esquema 2. Método de quantificação de perácidos.

As reações envolvidas na titulação são:

$2 \text{MnO}_4^- + 6 \text{H}^+ + 5 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{Mn}^{2+} + 8 \text{H}_2\text{O} + 10 \text{O}_2$ (determinação de H₂O₂ residual na reação)

$\text{RCOOO}^- + 2 \text{H}^+ + 2 \text{I}^- \rightarrow \text{I}_2 + \text{RCOO}^- + \text{H}_2\text{O}$ (adição de KI na solução resultante)

$2 \text{S}_2\text{O}_3^{2-} + \text{I}_2 \rightarrow \text{S}_4\text{O}_6^{2-} + 2 \text{I}^-$ (determinação indireta da quantidade de perácidos)

As concentrações dos reagentes estão especificadas no **Esquema 2**.

3.2. Sistema bifásico

O sistema bifásico foi o método utilizado neste trabalho para a “imobilização” das lipases.

Para a sua preparação foi utilizado um balão de fundo redondo ou erlenmeyer de 125 mL, 5 mL de água ou tampão fosfato de potássio pH 9,0, 6mL de solvente orgânico e 1mL de líquido iônico (sistema trifásico), 1mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30%, quantidades variadas de lipases (50-150mg) livres (LPS e LRO) ou imobilizada em resina aniônica (Novozym 435), e 1-5mmol de substratos contendo as ligações duplas C=C ou C=N. O sistema foi mantido a temperatura constante de 30⁰C ou ambiente, em banho termostaticado conforme mostrado na **Figura 35**.

Alíquotas das reações foram retiradas em tempos pré-determinados e analisadas por RMN-¹H e/ou CG.

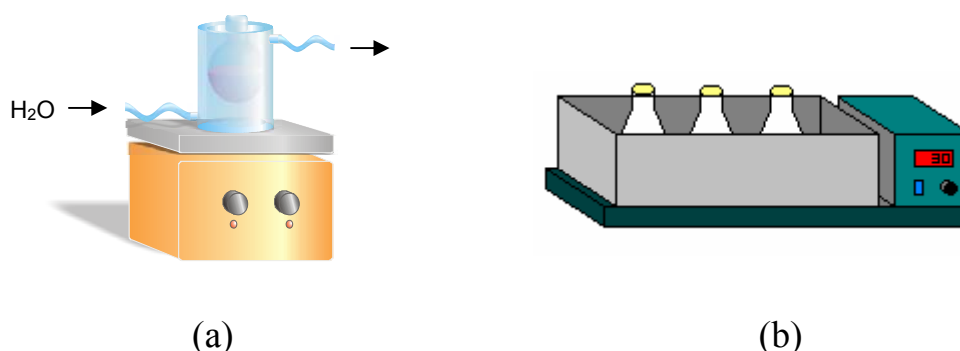


Figura 35. Representação gráfica de um sistema bifásico sob agitação magnética (a) e sob agitação do tipo Dubnoff (b).

3.3. Reagentes, solventes e lipases utilizadas.

Os reagentes, utilizados neste trabalho foram:

- ✓ Aldrich: benzaldeído, anilina, 4-metóxi anilina, 2,4-dimetóxi anilina, ácido malônico, ácido octanóico, ácido hexanóico, ácido decanóico, tetrametil silano (TMS), clorofórmio deuterado ($CDCl_3$),

- ✓ Merck: tolueno, xileno; ácido benzóico, cloreto de sódio, dihidrogeno fosfato de potássio,
- ✓ Vetec: peróxido de hidrogênio 30%, ácido láurico, ácido propiônico, ácido butírico, bicarbonato de sódio, ácido octanóico, iodeto de potássio, tiosulfato de sódio, carbonato de sódio,
- ✓ Grupo Química: acetato de etila, etanol, ácido acético, hexano, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio,
- ✓ Reagen: cicloexanol, ácido sulfúrico, ácido fosfórico; éter etílico, heptano
- ✓ Nuclear: clorofórmio; diclorometano, tetracloreto de carbono,
- ✓ Quimidrol: permanganato de potássio,
- ✓ Os ácidos cinâmicos *para* e *meta* substituídos foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Áurea Echevarria do DQ-UFRRJ – RJ.
- ✓ O líquido iônico 1-butil-3-metil-imidazólio tetrafluorborato ([BMIm][BF₄]) foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Jairton Dupont do IQ-UFRGS- RS.¹⁰³
- ✓ O tampão fosfato de potássio pH 9,0 foi preparado a partir de dihidrogeno fosfato de potássio (Merck) e hidróxido de sódio (Grupo Química).¹⁰⁴
- ✓ O cicloexeno foi preparado conforme descrito na seção 3.4.1.
- ✓ Os ésteres etílicos derivados do ácido cinâmicos foram preparados conforme descrito na seção 3.4.2.
- ✓ As iminas derivadas da N-Benziliden-anilina foram preparadas conforme descrito na seção 3.4.3.

Tabela 3. Lipases utilizadas.

Lipases	Nome Comercial	Atividade (u/g)*
<i>Pseudomonas</i> sp.	LPS ^a	30000
<i>Rhizopus orizae</i>	LRO ^a	150000
<i>Candida antarctica</i>	Novozym 435 ^b	10000

(a)Amano Pharmaceuticals CO. (b) Novozymes

*Quantidade de enzima que libera um μmol de ácido graxo por minuto.

3.4. Métodos experimentais

3.4.1. Preparação do cicloexeno¹⁰⁵

Para a preparação do cicloexeno, utilizou-se 10g (100mmol) de cicloexanol (**47**) e 3mL (44mmol) de ácido fosfórico concentrado em um balão de fundo redondo de 100mL e alguns fragmentos de porcelana foram adicionados ao balão para um maior controle da ebulição dos reagentes. O balão foi ajustado a um sistema de destilação fracionada e a temperatura controlada para no máximo 90°C. A destilação foi interrompida quando ainda restava apenas um pouco de resíduo a ser destilado.

O destilado foi transferido para um funil de separação e saturado com solução de cloreto de sódio. Adicionou-se 2mL de carbonato de sódio a 5%. O cicloexeno bruto foi colocado em um erlenmeyer, e a este foi adicionado cloreto de sódio anidro. A mistura foi filtrada e o cicloexeno (**48**) foi destilado novamente. (**Figura 36**)

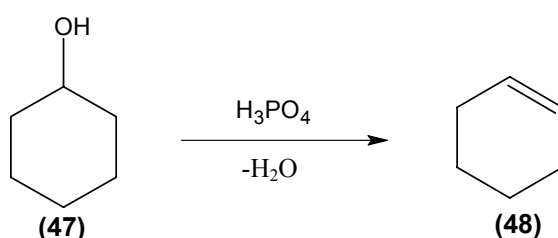
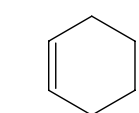


Figura 36. Reação de formação do cicloexeno via desidratação do cicloexanol.

cicloexeno (**48**)

rendimento: 75% (10,3mL)



C_6H_{10}

M.M = 82,1

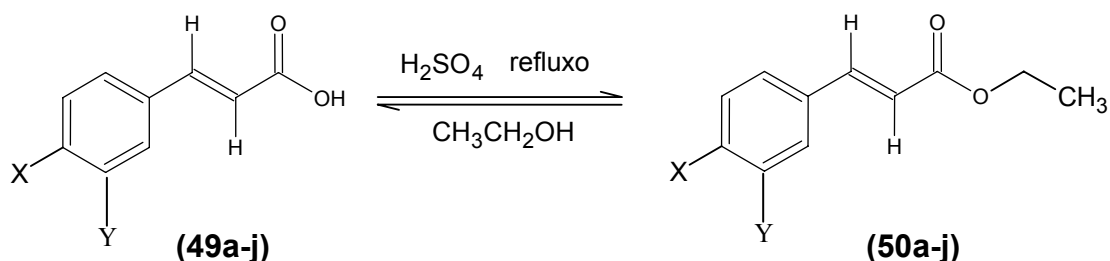
P_{eb} = 81-83 °C **P_{lit}** = 83°C

RMN-¹H (200MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,63(m, 4H); 1,90 (m, 4H); 5,6 (2H).

IV cm⁻¹: 3063, 1603, 810, 1351,1359

3.4.2. Preparação dos ésteres etílicos a partir dos derivados do ácido cinâmico *para* e *meta* substituídos.¹⁰⁶

Para a preparação dos ésteres etílicos derivados dos ácidos cinâmicos (**49a-j**) foram adicionados em balão de fundo redondo, 2mmol dos derivados do ácido cinâmico e de seus derivados *para* ou *meta* substituídos, 15mL de etanol absoluto com 0,1mL de H₂SO₄ concentrado. A mistura foi refluxada em tempos pré determinados. A formação dos ésteres foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando hexano e acetato de etila (9:1) ou acetato de etila como eluente. Ao final da reação, a mistura foi resfriada e transferida para um funil de separação. Adicionou-se 20mL de uma solução saturada de bicarbonato de sódio e diclorometano. As fases foram separadas, sendo que a orgânica foi concentrada no rota-evaporador. Os ésteres obtidos (**50a-j**) foram pesados, calculado o rendimento e analisados por técnicas espectroscópicas de IV, RMN-¹H e ¹³C, e CG.



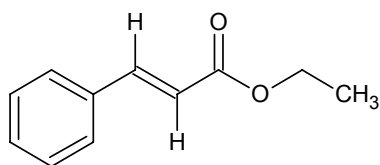
	Massa (mg) ^(a)		Massa (mg) ^(a)
49a X = H, Y = H	(300,0)	49f X = F, Y = H	(330,0)
49b X = OCH ₃ , Y = H	(356,8)	49g X = Cl, Y = H	(365,1)
49c X = OH, Y = H	(318,0)	49h X = CH ₃ , Y = H	(324,4)
49d X = CN, Y = H	(345,2)	49i X = H, Y = NO ₂	(370,2)
49e X = NO ₂ , Y = H	(380,0)	49j X = H, Y = F	(328,1)

^(a) massa de substrato utilizado para obtenção do correspondente éster.

Figura 37. Reação de esterificação dos derivados do ácido cinâmico *para* e *meta* substituídos.

cinamato de etila (50a)

rendimento: 65% (231,8 mg)



$C_{11}H_{12}O_2$
M.M. = 176,212

IV (filme) cm^{-1} : óleo, 2980, 2932, 1711, 1636, 1609, 1262, 813

RMN – 1H (200MHz): δ (ppm) 7,69(d, $J = 16$ Hz, 1H) 6,44(d, $J = 15,9$ Hz, 1H) 4,26(q, 2H) 1,34(t, 3H), 6,3-7,63 (m, 5H)

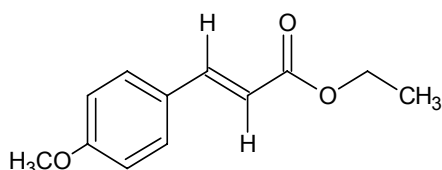
RMN- ^{13}C : δ (ppm) 165,9, 143,9, 133,8, 129,9, 128,5, 127,8, 117,9, 59,7, 14,1,

CG: t.r.= 12,494 min

Rf = 0,59 (hexano:acet. etila 9:1 v/v)

4-metóxi-cinamato de etila (50b)

rendimento: 56% (231,3 mg)



$C_{12}H_{14}O_3$
M.M. = 206,238

IV (filme) cm^{-1} : óleo, 3050, 2954, 1732, 1658, 1590, 1181, 840

RMN – 1H (200MHz): δ (ppm) 7,62(d, $J = 15,9$ Hz, 1H), 6,39 (d, $J = 16$ Hz, 1H), 4,10(q, 2H), 1,30(t, 3H), 7,28(d, 2H), 7,45(d, 2H), 3,76 (s, 3H)

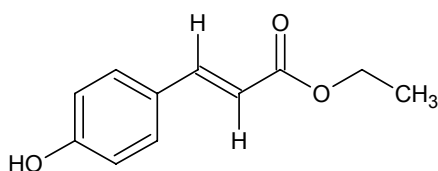
RMN- ^{13}C : δ (ppm) 167,0, 144,5, 138,2, 135,4, 131,9, 125,0, 116,1, 60,2, 55,40, 16,3.

CG: t.r.= 14,200 min

Rf = 0,64 (hexano:acet. etila 9:1 v/v)

4-hidróxi-cinamato de etila (50c)

rendimento: 45% (167,5 mg)



$C_{11}H_{12}O_3$
M.M. = 192,238

IV(filme) cm^{-1} : óleo, 3012, 2950, 1728, 1640, 1621, 1118, 790

RMN – 1H (200MHz): δ (ppm) 7,60(d, $J = 16,2$ Hz, 1H), 6,35 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H), 4,00(q, 2H), 1,30(t, 3H), 6,88(d, $J = 8,80$ Hz, 2H), 7,50(d, $J = 8,98$ Hz 2H),

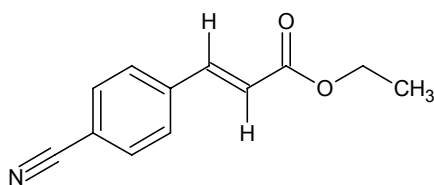
RMN- ^{13}C : δ (ppm) 206,5, 167,9, 159,6, 144,1, 130,1, 125,2, 115,7, 56,0, 18,5,.

CG: t.r.= 14,780 min

Rf = 0,60 (acet. etila)

4-ciano-cinamato de etila (50d)

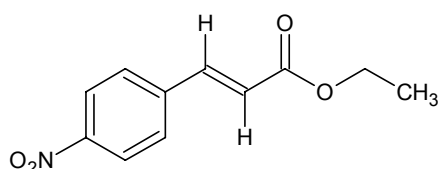
rendimento: 75% (300,8 mg)

 $C_{11}H_{11}NO_2$

M.M. = 201,221

IV cm^{-1} : 2980, 2710, 2250, 1728, 1580, 1180, 875**RMN - 1H (200MHz)**: δ (ppm) 7,70(d, $J = 15,75Hz$, 1H), 6,51 (d, $J = 15,6Hz$, 1H), 4,30(q, 2H), 1,35(t, 3H), 7,58(d, $J = 8,1Hz$, 2H), 7,66(d, $J = 8,3Hz$ 2H),**RMN- ^{13}C** : δ (ppm) 166,2, 142,7, 140,2, 136,7, 133,2, 128,9, 123,9, 120,0, 61,2, 18,5.**CG: t.r.**= 13,825 min**Rf** = 0, 58 (hexano:acet. etila 9:1 v/v)**4-nitro-cinamato de etila (50e)**

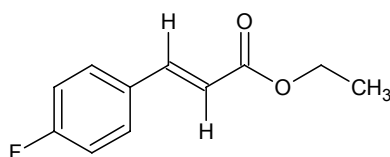
rendimento: 80% (348,1 mg)

 $C_{11}H_{11}NO_4$

M.M. = 221,209

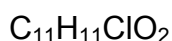
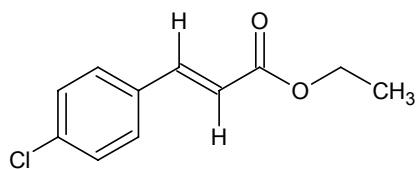
IV cm^{-1} : 2960, 2920, 1720, 1608, 1590, 1271, 890**RMN - 1H (200MHz)**: δ (ppm) 7,71(d, $J = 16,0Hz$, 1H), 6,66 (d, $J = 15,95Hz$, 1H), 4,28(q, 2H), 1,33(t, 3H), 7,66(d, $J = 8,4Hz$, 2H), 8,25(d, $J = 8,55Hz$ 2H),**RMN- ^{13}C** : δ (ppm) 165,0, 158,6, 145,1, 141,6, 128,6, 124,1, 122,6, 60,9, 14,2.**CG: t.r.**= 15,125 min**Rf** = 0,67 (hexano:acet. etila 9:1 v/v)**4-flúor-cinamato de etila (50f)**

rendimento: 66% (254,5 mg)

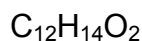
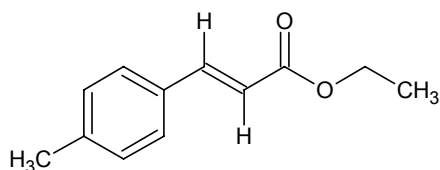
 $C_{11}H_{11}FO_2$

M.M. = 194,202

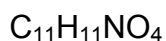
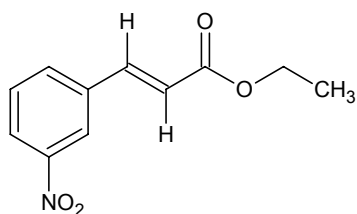
IV(Filme) cm^{-1} : 2930, 2870, 1732, 1600, 1650, 1271, 850**RMN - 1H (200MHz)**: δ (ppm) 7,65(d, $J = 15,8Hz$, 1H), 6,36 (d, $J = 15,7Hz$, 1H), 4,26(q, 2H), 1,33(t, 3H), 7,05(m, 5H)**RMN- ^{13}C** : δ (ppm) 166,7, 166,2, 161,2, 143,1, 130,6, 129,7, 117,9, 60,4, 14,2,**CG: t.r.**= 14,328 min**Rf** = 0,67 (hexano:acet. etila 9:1 v/v)

4-cloro-cinamato de etila (50g)**rendimento: 70% (294,7 mg)**

M.M. = 210,657

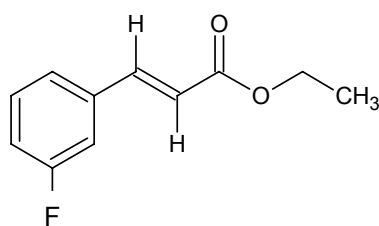
IV cm^{-1} : 3000, 2770, 1742, 1596, 1650, 1161, 790**RMN - ^1H (200MHz)**: δ (ppm) 7,65(d, $J = 15,7\text{Hz}$, 1H), 6,40 (d, $J = 15,7\text{Hz}$, 1H), 4,26(q, 2H), 1,32(t, 3H), 7,30(d, 2H), 7,40(d, 2H),
RMN- ^{13}C : δ (ppm) 166,7, 143,1, 136,1, 132,9, 129,1, 118,8, 60,6, 14,3.**CG: t.r.**= 14,995 min**Rf** = 0,60 (hexano:acet. etila 9:1 v/v)**4-metil-cinamato de etila (50h)****rendimento: 58% (220,4 mg)**

M.M. = 190,238

IV cm^{-1} : 2950, 2910, 1721, 1610, 1602, 1071, 810**RMN - ^1H (200MHz)**: δ (ppm) 7,64(d, $J = 16,0\text{Hz}$, 1H), 6,42 (d, $J = 15,9\text{Hz}$, 1H), 4,25(q, 2H), 1,36(t, 3H), 7,18(d, 2H), 7,35(d, 2H), 2,1(s, 3H)**RMN- ^{13}C** : δ (ppm) 166,8, 144,3, 140,3, 131,5, 129,3, 127,8, 116,9, 60,1, 21,1, 14,1.**CG: t.r.**= 13,284 min**Rf** = 0,54 (hexano:acet. etila 9:1 v/v)**3-nitro-Cinamato de Etila (50i)****rendimento: 72% (305,0 mg)**

M.M. = 221,209

IV cm^{-1} : 2960, 2826, 1715, 1628, 1591, 1372, 825**RMN - ^1H (200MHz)**: δ (ppm) 7,65(d, $J = 16\text{Hz}$, 1H), 6,50 (d, $J = 16,1\text{Hz}$, 1H), 3,52(q, 2H), 1,09(t, 3H), 7,15(d, 2H), 7,58(d, 2H),**RMN- ^{13}C** : δ (ppm) 164,9, 141,5, 129,8, 122,1, 121,1, 57,6, 13,9,**CG: t.r.**= 14,002 min**Rf** = 0,67 (hexano:acet. etila 9:1 v/v)

3-flúor-cinamato de etila (50j)
rendimento: 72% (305,4 mg)

 $C_{11}H_{11}NO_4$

M.M. = 221,209

 $IV\text{ cm}^{-1}$: 2860, 2650, 1712, 1628, 1602, 1311, 898

 $RMN - ^1H$ (200MHz): δ (ppm) 7,64(d, 1H), 6,43 (d 1H), 4,24(q, 2H), 1,29(t, 3H), 7,39-7,60(m, 4H)

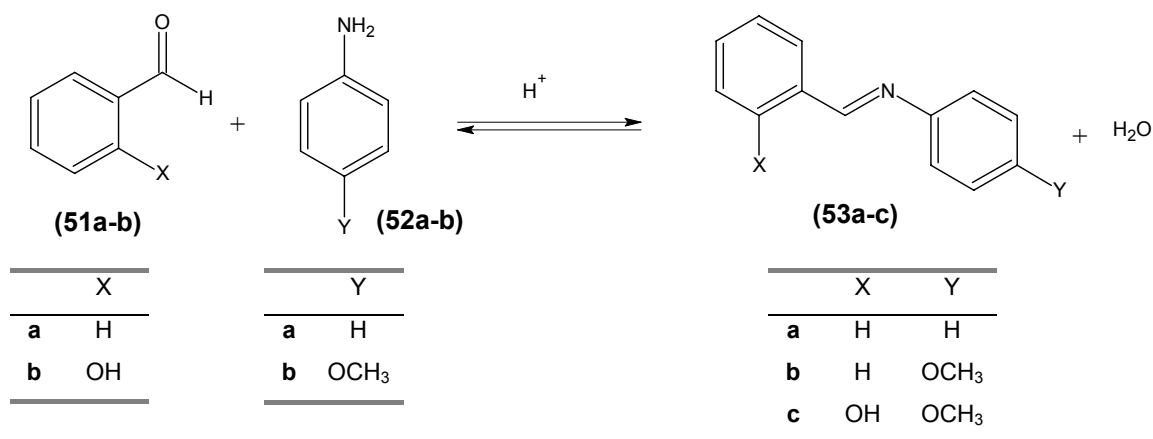
 $RMN - ^{13}C$: δ (ppm) 167,0, 160,4, 143,1, 140,3, 136,6, 123,9, 116,8, 60,4, 14,2.

CG: t.r. = 14,326 min

Rf = 0,64 (hexano:acet. etila 9:1 v/v)

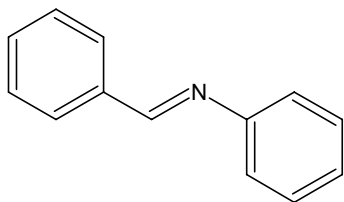
3.4.3. Preparação de iminas (bases de schiff).^{106, 107}

Em um balão de fundo redondo foram adicionados quantidades equimolares de benzaldeído (**51a**) ou *o*-hidróxibenzaldeído (**51b**) e anilina (9mmol) (**52a**) ou *p*-metóxianilina (**52b**) em 20mL de etanol absoluto. A solução foi acidificada com ácido acético glacial (3 gotas) e refluxada até que todo reagente tivesse sido consumido. A formação das iminas foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando hexano e acetato de etila (9:1) como eluente. Após o refluxo, a mistura foi resfriada e o etanol evaporado em rota-evaporador. O sólido obtido foi recristalizado com etanol absoluto a frio. Os produtos (**53a-c**) foram pesados, calculado o rendimento e caracterizados por IV, e RMN-¹H e ¹³C.(Figura 38)


Figura 38. Preparação de Iminas.

N-benzilidenanilina (53a)

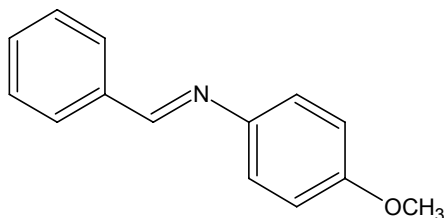
rendimento: 85% (1,39 g)

 $C_{13}H_{11}N$

M.M. = 181,233

Pf = 51-52°C, Pf_{lit} = 51°C**IV cm⁻¹**: 3076,2980, 1627, 1521, 1367, 988, 871, 652, 520.**RMN – ¹H**: δ(ppm) 8,72 (s, 1H), 7,38-7,79 (m, 10H)**RMN- ¹³C**: δ(ppm) 121,6, 126,6, 129,4, 129,5, 129,9, 132,0, 132,9, 150,53, 150,34.**CG: t.r.**= 12,210 min**R.f** = 0,40 (hexano:acet. etila 9:1 v/v)**N-benziliden-*p*-metóxi anilina (53b)**

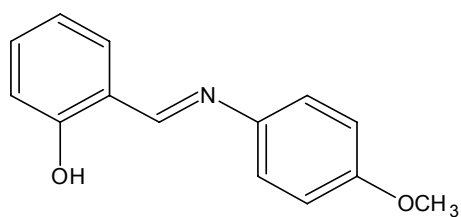
rendimento: 72% (1,40g)

 $C_{14}H_{13}NO$

M.M. = 211,259

Pf = 71-73°C, Pf_{lit} = 71°C**IV cm⁻¹**: 3066, 2959, 2940, 1623, 1628, 1441, 1364, 1178, 975, 543.**RMN – ¹H**: δ(ppm) 8,48 (s, 1H), 7,90-6,89 (m, 9H), 3,37 (s, 3 H).**RMN- ¹³C**: δ(ppm) 158,43, 158,18, 144,93, 133,5, 131,9, 128,0, 121,9, 114,60, 53,39.**CG: t.r.**= 14,394 min**R.f** = 0,48(hexano:acet. etila 9:1 v/v)***o*-hidróxi-N-benziliden-*p*-metóxi anilina (53c)**

rendimento: 64% (1,31g)

 $C_{14}H_{12}NO_2$

M.M. = 227,259

Pf = 83°C**IV cm⁻¹**: 3442, 2957, 2911, 1611, 1452, 1163, 1112, 975, 822, 730, 552.**RMN – ¹H**: δ(ppm) 8,45 (s, 1H), 7,95-6,95 (m, 8H), 3,91 (s, 3 H).**CG: t.r.**= 20,318 min**R.f** = 0,59 (hexano:acet. etila 9:1 v/v)

3.4.4. Procedimento geral para as reações de epoxidação químio-enzimática do cicloexeno em sistema bifásico.

Em um balão de fundo de redondo, com o sistema descrito na Seção 3.3, adicionaram-se diferentes tipos e quantidades variadas de doadores acila (Seção 4.1 e 4.2), 1 mL de H₂O₂ (30%), 50mg de lipase e 5 mmols do cicloexeno. O sistema foi colocado em um reator termostaticado e mantido sob agitação e temperatura constante de 30°C. Alíquotas da reação foram retiradas periodicamente e analisadas por RMN-¹H, para a determinação da porcentagem de conversão.

A conversão em epóxido do cicloexeno, foi determinada através de comparação das integrais dos singletos dos hidrogênios ligados ao carbono da dupla ligação do cicloexeno (**48**) centradas em 5,6 ppm e em 3,1 ppm referente aos do epóxido (**54**), respectivamente. (**Figura 39**)

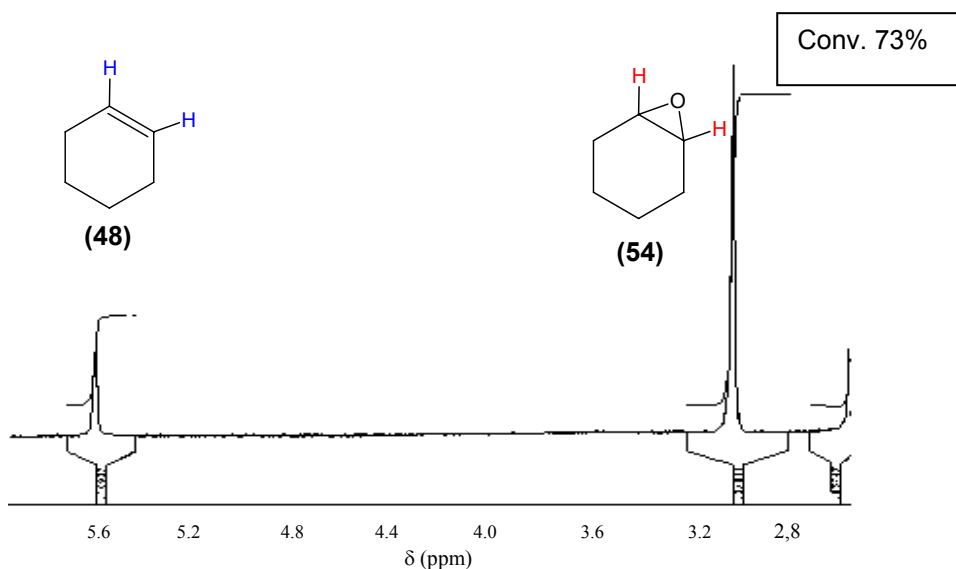


Figura 39. Espectro de RMN- ¹H, de uma alíquota da fase orgânica da reação de epoxidação químio-enzimática do cicloexeno. [Novozym 435- 50mg, 30°C, 6 h, tolueno, (CDCl₃ , 200MHz).]

3.4.5. Procedimento para a epoxidação nucleofílica via-enzimática dos derivados do cinamato de etila.

Em um erlenmeyer de 125mL foram adicionados 1mmol dos substratos **(50a-j)**, juntamente com 1mL de H₂O₂ (30%) e 10mmol de ácido octanóico. Como biocatalisadores foram utilizados 150mg da Novozym 435, LPS e LRO, em sistema bifásico tampão fosfato de potássio pH 9,0/NaHCO₃ e solvente orgânico (a ser especificado). A reação foi realizada a 30°C, com agitação do tipo Dubnoff.

A conversão aos produtos formados, foi determinada após um período de 4 dias por RMN-¹H através de comparação das integrais dos dubletos referentes aos hidrogênios ligados ao carbono da dupla ligação do éster cinâmico, centradas em 6,60 e 8,13 ppm e em 3,58 e 4,20 ppm, referentes aos hidrogênios do epóxido **(55)**. (**Figura 40**)

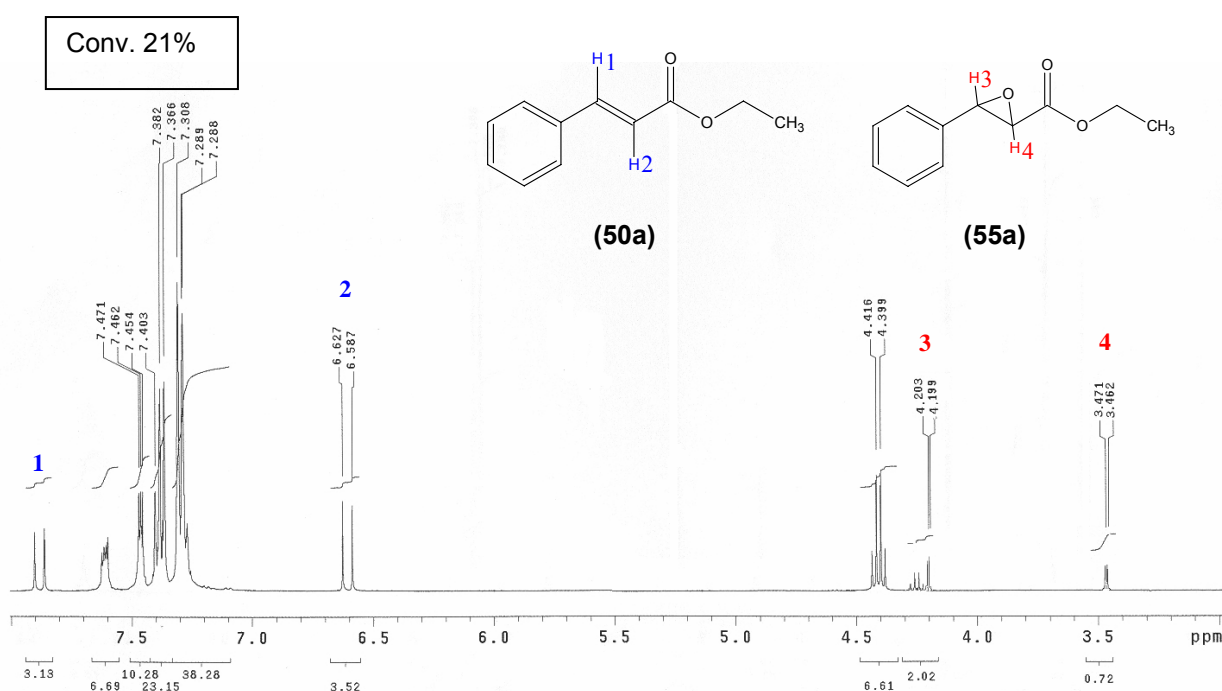


Figura 40. Espectro de RMN-¹H, de uma alíquota da fase orgânica da reação de epoxidação quimio-enzimática do cinamato de etila. [Novozym435 (150mg), 30°C, 96 h, tolueno, (CDCl₃, 400MHz).]

3.4.6. Procedimento para a oxidação químico-enzimática das iminas (formação de oxaziridinas).

Com o intuito de minimizar a hidrólise das iminas, o sistema reacional foi realizado utilizando apenas solvente orgânico (CH_2Cl_2). Foram usados 1mmol dos substratos (**53a-c**), juntamente com 1mL de H_2O_2 (30%) à uma taxa de adição de 0,1mL/h e 10mmol de ácido octanóico, e 100mg de Novozym 435. O sistema foi mantido a temperatura ambiente (25°C) e agitação magnética constante.

Para o cálculo de conversão em oxaziridinas (**56a-c**), alíquotas foram retiradas em tempos pré determinados e analisados por CG e RMN- ^1H , conforme representado na **Figuras 41 e 42**, para a oxidação da N-benzilidenanilina (**53a**) e N-benzilidem-*p*-metóxi-anilina (**53b**) respectivamente.

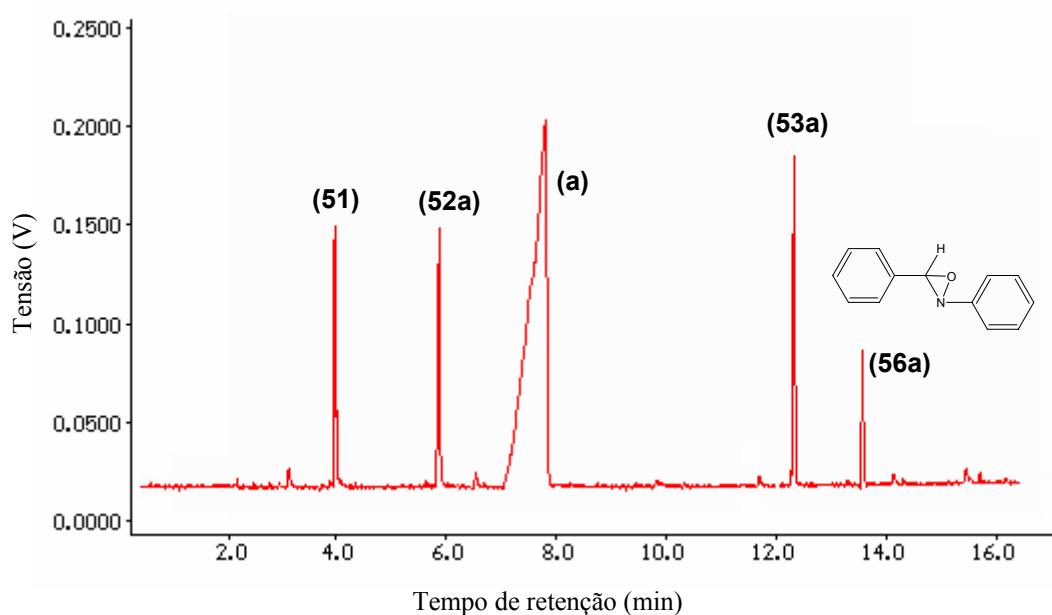


Figura 41. Cromatograma da reação de oxidação químico-enzimática da N-benzilidenanilina (1mmol – **53a**). [Novozym 435 (100mg), ácido octanóico (a) 10mmol, 25°C , 1 h, CH_2Cl_2 .]

No espectro de RMN- ^1H , (**Figura 42**), a quantificação dos produtos formados foi realizada através da comparação das integrais dos sinais referentes ao hidrogênio da imina em 8,35 ppm, e da oxaziridina em 4,6 ppm.

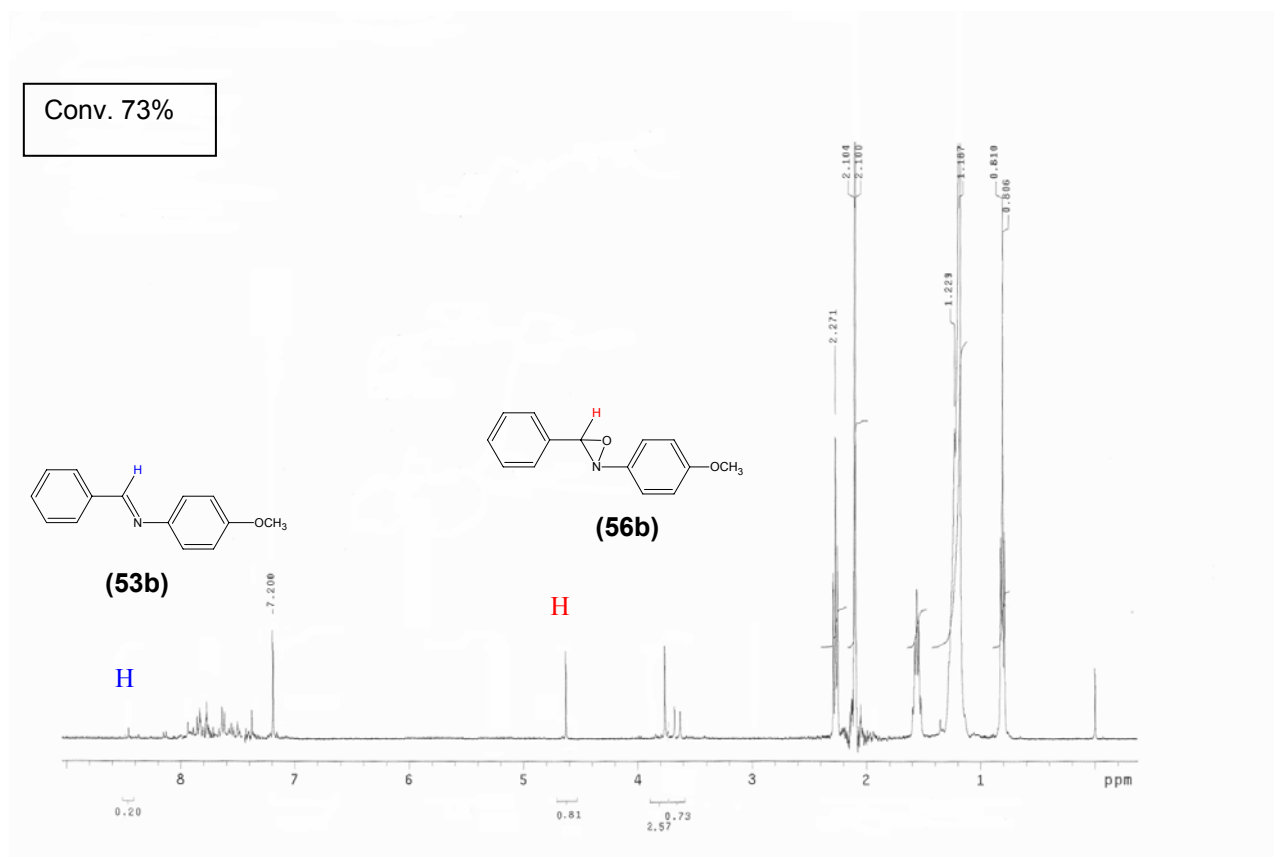
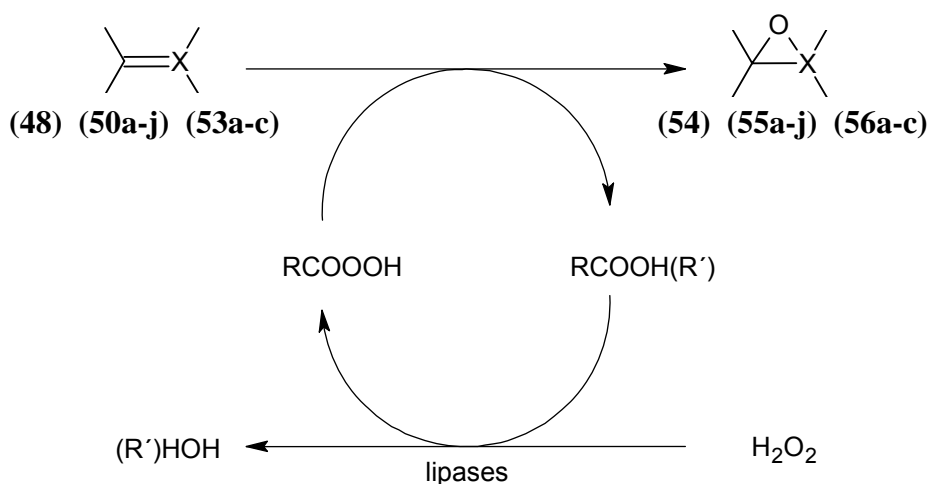


Figura 42. Espectro de RMN- ^1H , da fase orgânica da reação de oxidação químico-enzimática da N-Benziliden-*p*-metóxi anilina (**53b**). [Novozym 435 (100mg), 25°C, 24h, CH_2Cl_2 (CDCl_3 , 400MHz).]

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, será avaliado a utilização de lipases em reações de peridrólise de ácidos carboxílicos ou éster etílico para formação de seus respectivos perácidos, e a utilização destes na epoxidação *in situ* de compostos que contenham duplas ligações C=C e C=N.

As reações serão realizadas em sistema bi e trifásico, e em solvente orgânico puro (**Esquema 3**).



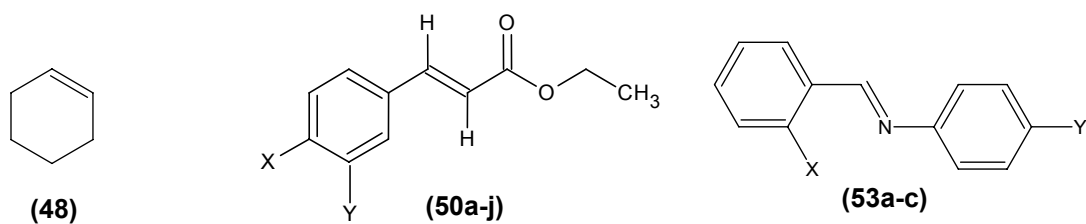
X = C, N

R = CH₃-, CH₃CH₂-, CH₃(CH₂)₄-, CH₃(CH₂)₆-, CH₃(CH₂)₈-, CH₃(CH₂)₁₀-, CH₃(CH₂)₁₄-

R' = CH₃CH₂-

lipases = Novozym 435, LPS e LRO

- **(54)** epóxidos a partir do cicloexeno;
- **(55a-j)** epóxidos derivados de cinamatos de etila;
- **(56a-c)** oxaziridinas a partir de iminas.



Esquema 3. Reações de oxidação estudadas neste trabalho.

4.1. Epoxidação químio-enzimática do cicloexeno em sistema bifásico.

Os estudos iniciais relacionados a obtenção de epóxidos via químio-enzimática, envolveram a otimização do método e a busca das melhores condições experimentais principalmente para a obtenção do epóxido do cicloexeno.

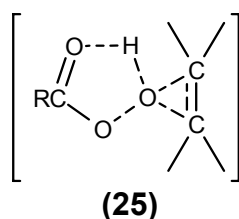
O primeiro parâmetro a ser estudado foi a escolha do biocatalisador. Os resultados demonstraram que utilizando as lipases de *Pseudomonas sp.*(LPS), *Rhizopus orizae*, (LRO) e *Candida antarctica* (Novozym 435) as conversões em epóxido de cicloexeno foram de 53, 84, e 99% respectivamente.⁴⁵ Foi também verificado que a Novozym 435 é estável até 50 °C, estando de acordo com a sua ficha técnica.¹⁰⁸

Não foram realizados estudos acima de 50°C devido a problemas de decomposição do peróxido de hidrogênio, evaporação do solvente e substrato.

Dando continuidade a estes estudos, outros parâmetros experimentais foram avaliados e comparados com os resultados obtidos anteriormente. Fêz-se a avaliação do solvente orgânico no meio reacional; bem como da estrutura do doador acila e de sua concentração.

4.1.1. Influência do solvente orgânico no meio reacional.

Os sistemas estudados aqui envolvem a etapa de peridrólise biocatalítica seguida pela epoxidação com o perácido gerado. Portanto, a escolha do solvente é relativamente importante na eficiência das etapas. Na primeira etapa o melhor solvente orgânico deve ter log P entre 2,0 e 4,0¹⁰⁹ para favorecer a peridrólise enzimática e na segunda etapa, o solvente deve favorecer a estabilização do estado de transição **(25)**.⁵³ **(Figura 21)**



Neste experimento, foi verificada a influência do solvente para a obtenção químico-enzimática do epóxido do cicloexeno. Como doador acila foi utilizado o ácido octanóico e como biocatalisador as lipases Novozym 435, LPS e LRO.

As conversões em epóxidos utilizando estes sistemas estão demonstrados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Epoxidação químico-enzimática do cicloexeno em diferentes sistemas bifásicos.^(a)

solvente orgânico	log P	conversão (%)		
		<i>Pseudomonas cepacia</i> (LPS)	<i>Rhizopus orizae</i> (LRO)	<i>Candida antarctica</i> (Novozym 435)
éter etílico	0,85	28	22	30
dicloro metano	0,93	20 / 41 ^b	37	99
clorofórmio	2,0	50	37	65
tolueno	2,5	53	84	99
tetracloro de carbono	3,0	12	57	99
xileno	3,1	40	80	84
hexano	3,5	23	43	32
heptano	4,0	21	42	44

(a) as reações foram realizadas com 5mmol de cicloexeno, 10mmol de ácido octanóico, 1mL de peróxido de hidrogênio 30%, 50 mg de cada lipase, sistema bifásico água/solvente orgânico à 30°C por 24h .

(b) sistema trifásico de água/diclorometano/[BMIm][BF₄].

Na maioria dos experimentos, a conversão em epóxido foi dependente da polaridade do solvente orgânico utilizado (expresso na Tabela pelos valores de $\log P$) e do tipo de lipase.

A **Tabela 4**, mostra que as melhores conversões foram obtidas em sistema bifásico água/tolueno levando em consideração o tipo de lipase. Estes resultados estão concordantes com estudos prévios.¹¹⁰ Altas conversões em óxido de cicloexeno foram também obtidas com o sistema bifásico água/xileno, sendo de 40%, 80% e 84% usando LPS, LRO e a Novozym 435, respectivamente. Quando foi utilizado clorofórmio como solvente orgânico, as conversões em epóxidos foram de 50% e 65%, respectivamente usando LPS e CALB, e 37% usando a LRO. Utilizando a Novozym 435 em tetracloreto de carbono, hexano e heptano as conversões foram de 99%, 32% e 44%, respectivamente. Quando a LRO foi utilizada nestes solventes, o correspondente epóxido foi obtido com conversões consideráveis, sendo de 57%, 43% e 42%, respectivamente. Estes dois últimos resultados são bastante próximos aos obtidos com a Novozym 435, demonstrando que a LRO também é uma enzima eficiente nestas condições de reação.

Utilizando a LPS, baixas conversões em óxido de cicloexeno foram obtidas, sendo de 12-53%. Entretanto, foi observado um aumento na conversão em epóxido com o uso da adição de líquido iônico 1-butil-3-metilimidazólio tetrafluorborato ([BMIm][BF₄]) em sistema trifásico de água/dicloro metano/líquido iônico. A conversão aumentou de 20 para 41%. Este resultado está de acordo com o reportado na literatura por Lau e col. para a transesterificação do butanoato de etila e na aminólise do octanoato de etila, onde foram verificados aumentos na velocidade de reação e na conversão aos produtos.¹¹¹

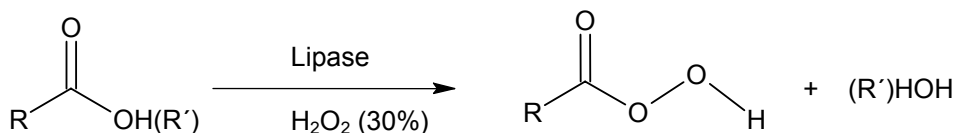
Como observado, a escolha do solvente é um dos fatores que influenciam a reação de epoxidação químico-enzimática. Os resultados obtidos estão coerentes com o mecanismo proposto na **Figura 21**, pois a polaridade do solvente é importante para favorecer as duas etapas da reação.

A partir destes dados, o tolueno e diclorometano foram selecionados para serem utilizados em estudos posteriores por favorecerem a conversão em epóxidos de cicloexeno.

4.1.2. Influência do doador acila na formação do perácido.

Outro parâmetro de importância relevante é o tipo e a quantidade de doador acila utilizado no meio reacional, pois é bem reportado na literatura que as lipases são bastante específicas isto é, atuam em substratos de estruturas bastante similares.^{5,6,8,18,19}

Portanto, neste experimento será avaliado a formação de perácido via-enzimática em função do tipo de doador acila. (**Figura 43**)



R = C₆H₅-, (CO₂H)₂CH-, CH₃-, CH₃(CH₂)₄-, CH₃(CH₂)₆-, CH₃(CH₂)₈-, CH₃(CH₂)₁₀-, CH₃(CH₂)₁₄-
 R' = CH₃CH₂-

Figura 43. Preparação de perácidos via-enzimática.

A quantificação dos perácidos gerados foi feita por titulação iodométrica.^{101, 102} Este estudo foi feito com a Novozym 435 à 30°C em sistema bifásico e em solvente puro. Os resultados estão demonstrados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Formação de perácidos em função do tipo de doador acila.^(a)

ent.	doador acila	conversão (%)	
		sistema bifásico	tolueno
1	ácido benzóico	<3	n.d. ^(b)
2	ácido malônico	<3	n.d. ^(b)
3	ácido acético	5	n.d. ^(b)
4	ácido hexanóico	15	8
5	ácido octanóico	32	20
6	ácido decanóico	27	18
7	ácido dodecanóico	29	15
8	ácido hexadecanóico	25	18
9	acetato de etila	12	10

(a) as reações foram realizadas com 10mmol de ácido carboxílico, 1mL de peróxido de hidrogênio 30%, 50 mg de Novozym 435, sistema bifásico água/tolueno 10mL (1:1 v/v) ou tolueno puro (10mL) à 30°C por 30 min.

(b) n.d. = não detectado

Analisando os dados da **Tabela 5**, pode-se verificar que em geral, as maiores conversões foram obtidas quando utilizou-se o sistema bifásico. As conversões em perácidos foram maiores com os ácidos de cadeias maiores e lineares (15-32%).

Os resultados acima descritos estão em concordância com trabalho de Klaas e col. que demonstraram que as lipases atuam com mais eficiência em ácidos de cadeias lineares na síntese de perácidos devido a um melhor encaixe do sítio ativo da enzima com o substrato.¹¹²

Utilizando tolueno como solvente, as conversões em perácidos foram menores. Está bem documentado que as enzimas são proteínas globulares e necessitam de uma microcamada aquosa para a manutenção de sua conformação nativa.^{50,52} Sendo assim, a exposição direta ao solvente orgânico pode ter desnaturado a enzima e diminuído assim a sua atividade catalítica.

Outro fator a ser considerado é a estrutura do doador acila. Com os ácidos acético, malônico e benzóico as conversões em perácidos foram de <5% em sistema bifásico e não houve formação em solvente orgânico puro.

A baixa conversão em perácido obtida com o ácido acético pode estar relacionada ao seu alto grau de toxidez para as lipases.^{5,19}

Aumentando o tamanho da cadeia alquílica do doador acila, em geral o perácido formou em maior porcentagem. Pôde-se também verificar neste experimento a importância do sistema bifásico para a manutenção da atividade catalítica das lipases e a afinidade do biocatalisador com o doador acila.

4.1.3. Influência da cadeia do doador acila na epoxidação químio-enzimática do cicloexeno.

A seguir, foi verificada a influência do tipo de doador acila para a obtenção químio-enzimática do epóxido do cicloexeno. Foram utilizados como doadores acila os ácidos propanóico, butanóico, hexanóico, octanóico, decanóico e láurico e como biocatalisadores a Novozym 435, LPS e LRO.

As conversões em epóxidos utilizando estes sistemas estão demonstradas na **Figura 44**.

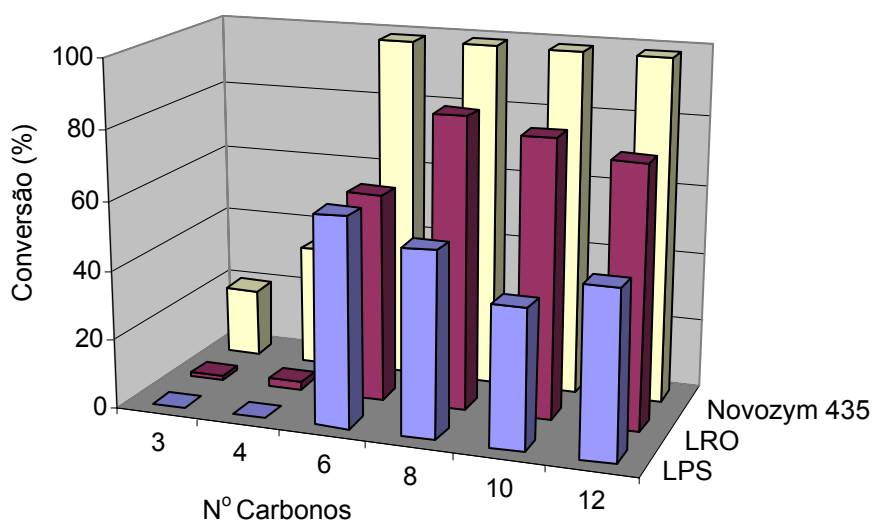


Figura 44. Conversão em epóxido (%) do cicloexeno em função do doador acila (10mmol). [Novozym435, LPS e LRO, H₂O₂(30%, 1mL), 30°C, 24h, tolueno].

Pode-se observar na **Figura 44**, que as conversões em epóxidos foram menores com ácidos carboxílicos de cadeias menores (ácidos propanóico e butanóico) em ambos sistemas. Utilizando ácidos de cadeias maiores, as conversões em epóxidos foram maiores. Utilizando a LPS, a maior conversão foi obtida com o ácido hexanóico (60%). Com a Novozym 435, as conversões em epóxidos foram quantitativas com os ácidos hexanóico, octanóico, decanóico e láurico (>99%). Utilizando a LRO, a maior conversão em epóxido foi com o ácido octanóico como doador acila, sendo de 84%.

Esses resultados podem estar relacionados com a conformação do sítio catalítico das lipases que se diferenciam muito de uma lipase para outra, fazendo com que as conversões em epóxidos variem consideravelmente e também da quantidade do peróxi-ácido formado na primeira etapa da reação, que é necessário para a epoxidação do cicloexeno. (**Tabela 5**, p. 49).

Um outro fator que pode ter contribuído para tal diferença na conversão em epóxido, é a maneira como foram empregadas as lipases. A Novozym 435, apresenta maior resistência a desnaturação e perda de atividade por estar imobilizada em resina aniônica, enquanto que a LPS e a LRO foram utilizadas na forma livre. A desnaturação pode ocorrer tanto pelo solvente orgânico bem como pelo oxidante (H_2O_2). Como já mencionado, em geral, as reações biocatalisadas são bastante influenciadas pelo meio reacional.

4.1.4. Influência da concentração de doador acila no meio reacional.

Foi verificada a influência da quantidade de ácido carboxílico (doador acila) utilizado em função da conversão em epóxido do cicloexeno (%). Este estudo foi feito com as lipases LPS(50mg) e Novozym 435(50mg) e LRO(50mg), com o ácido octanóico, e utilizando tolueno com solvente.

Os resultados estão demonstrados na **Figura 45**.

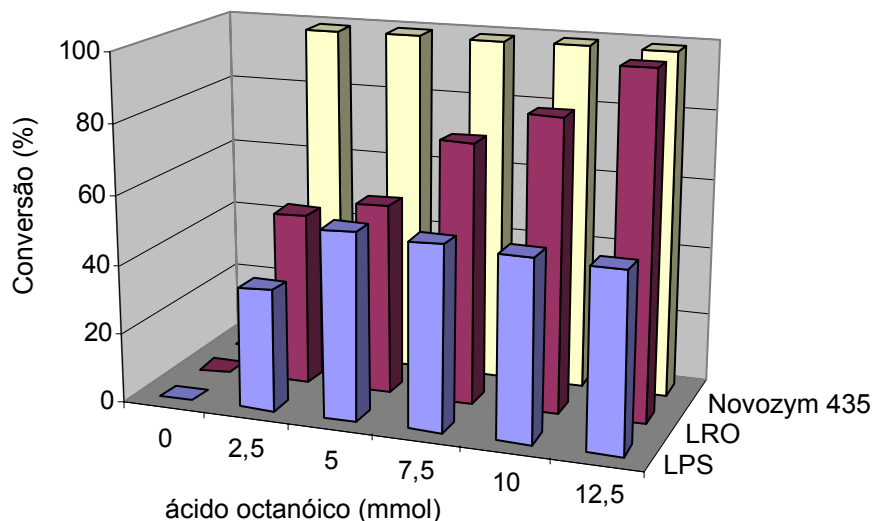


Figura 45. Variação da conversão em epóxido de cicloexeno em função da quantidade de ácido octanóico. [Novozym435, LPS e LRO, H₂O₂(30%, 1mL), 30°C, 24h, tolueno].

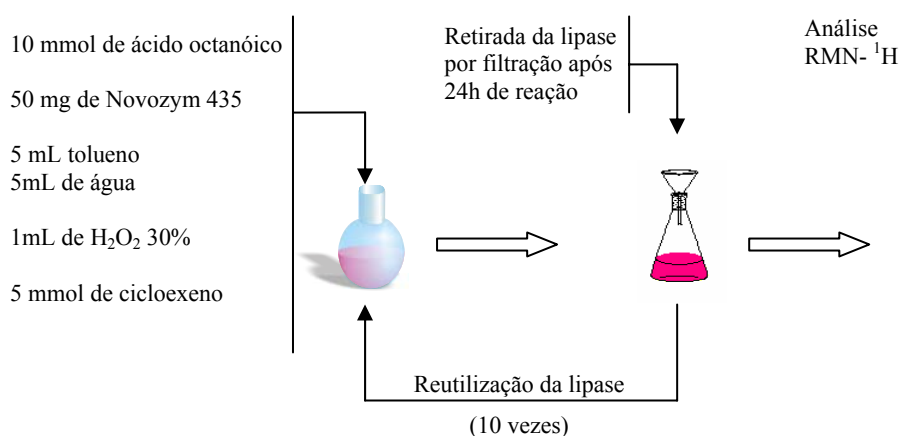
Como demonstrado na **Figura 45**, utilizando a Novozym 435, os epóxidos foram obtidos com rendimentos quantitativos (>99%), independente da quantidade de doador acila na faixa de 2,5-12,5 mmol. Utilizando a LRO, as conversões em epóxidos variaram de 50-99%. A conversão foi quantitativa com 12,5mmol de ácido. Utilizando a LPS, as conversões em epóxidos foram de 37-52%.

Estes resultados demonstram que a epoxidação químio-enzimática do cicloexeno é mais dependente da natureza da lipase que da concentração do doador acila. De acordo com o mecanismo desta reação, o doador acila é regenerado no final da etapa tornando o processo cíclico. (**Esquema 3**, p. 44)

4.1.5. Reutilização da lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435).

Conforme citado na seção 1.4.2., a importância principal do sistema bifásico é fornecer estabilidade às enzimas frente a solventes orgânicos e o peróxido de hidrogênio. Como desvantagem deste sistema, o biocatalisador nem sempre pode ser reutilizado.

Neste estudo, foi avaliada a eficiência da Novozym 435 em sucessivas reutilizações. Por já estar imobilizada em resina aniônica, é de fácil recuperação e baixa solubilidade em água. A reutilização foi feita baseada na reação de epoxidação do cicloexeno por períodos sucessivos de 24h, conforme esquematizado no **Esquema 4**.



Esquema 4. Procedimento de reutilização da Novozym 435 na epoxidação do cicloexeno.

Os resultados relativos a reutilização do biocatalisador estão descritos na **Figura 46**.

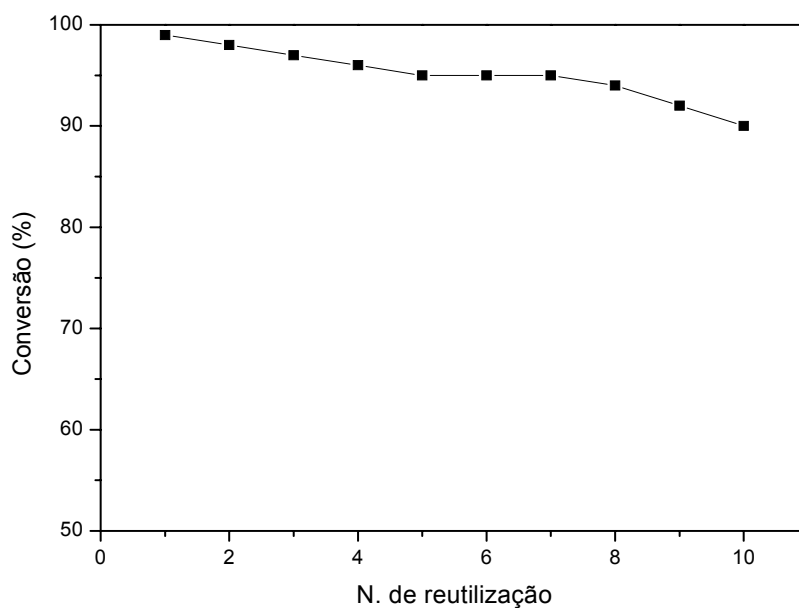


Figura 46. Conversão em óxido de cicloexeno em função da reutilização da Novozym 435 a cada 24 h de reação.

De acordo com os dados apresentados na **Figura 46**, verificou-se que a Novozym 435 pode ser reutilizada por 10 vezes sem diminuição significativa na conversão em epóxido, sendo de 90-99%. Estes resultados podem ser de grande importância, pois entre outros fatores, diminui o custo do processo.

Trabalhos recentes na literatura relataram a reutilização da Novozym 435. Du e col demonstraram que na produção de biodiesel, esta lipase pode ser reutilizada até 100 vezes à 40°C e 150 rpm, sem diminuição significativa da conversão em ésteres, sendo este um processo eficaz e de baixo custo.²⁷

4.2. Epoxidação nucleofílica via-enzimática de derivados do cinamato de etila.

A epoxidação dos derivados substituídos do cinamato de etila envolveu primeiramente a preparação e caracterização dos ésteres por espectroscopia de IV e RMN.

A análise de IV dos compostos (**50a-j**) demonstrou a presença de bandas características na região 1710-1745cm⁻¹ correspondentes aos estiramentos de carbonila de éster (C=O) e na região de 1600-1700cm⁻¹ atribuídas aos estiramentos (C=C) de anel aromático e de alcenos. (**Figura 48**) Outros sinais característicos para cada um dos compostos estão descritos no item 3.4.2. p.34-38.

A **Figura 47** mostra o espectro de IV do cinamato de etila.

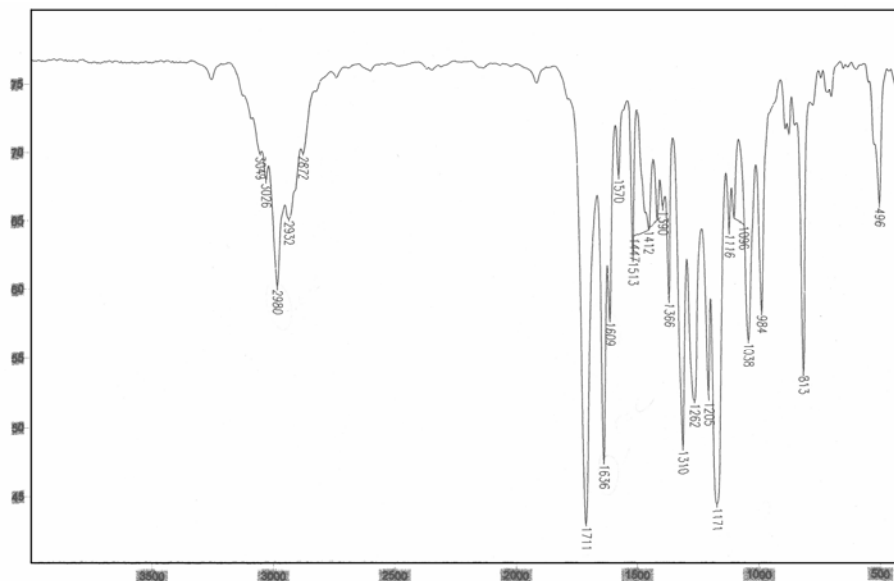


Figura 47. Espectro de infravermelho do cinamato de etila (**50a**).

Os espectros de RMN-¹H dos ésteres etílicos apresentaram tripletos em ~1,34ppm e quartetos em ~4,26 ppm, evidenciando a formação dos respectivos ésteres. Outros picos característicos para cada um dos compostos estão descritos detalhadamente no item 3.4.2., p. 34-38. A **Figura 48** mostra o espectro de RMN-¹H para o cinamato de etila.

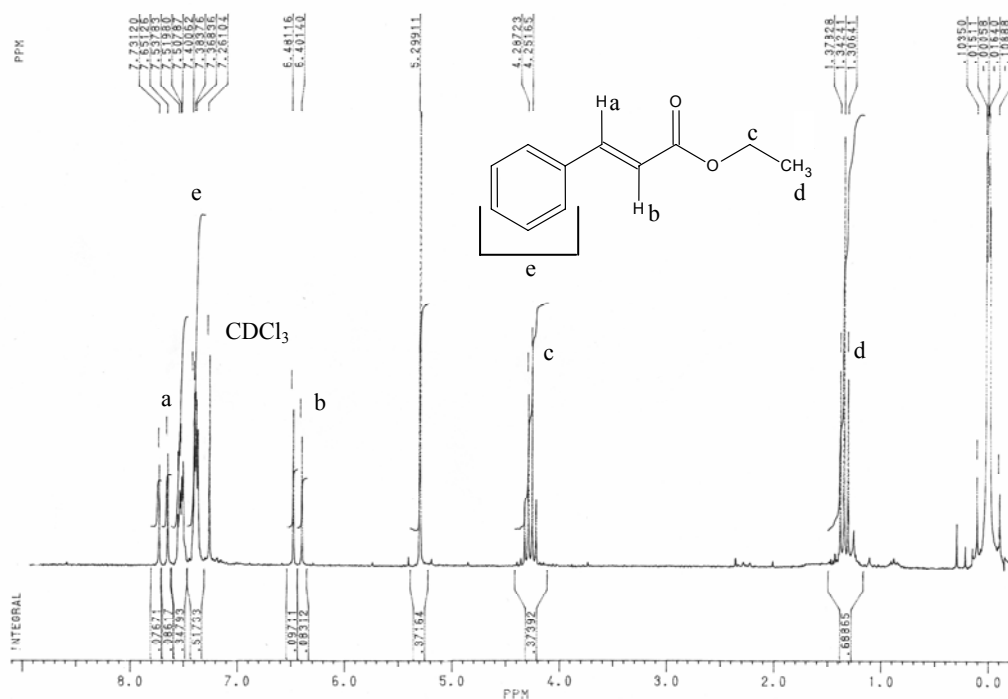


Figura 48. Espectro de RMN-¹H do cinamato de etila em CDCl₃, 200MHz.

Pela análise de RMN-¹³C dos ésteres pode-se observar sinais característicos em 59,0 ppm e 14,1ppm, referentes aos carbonos (d) e (e) respectivamente. (**Figura 49**).

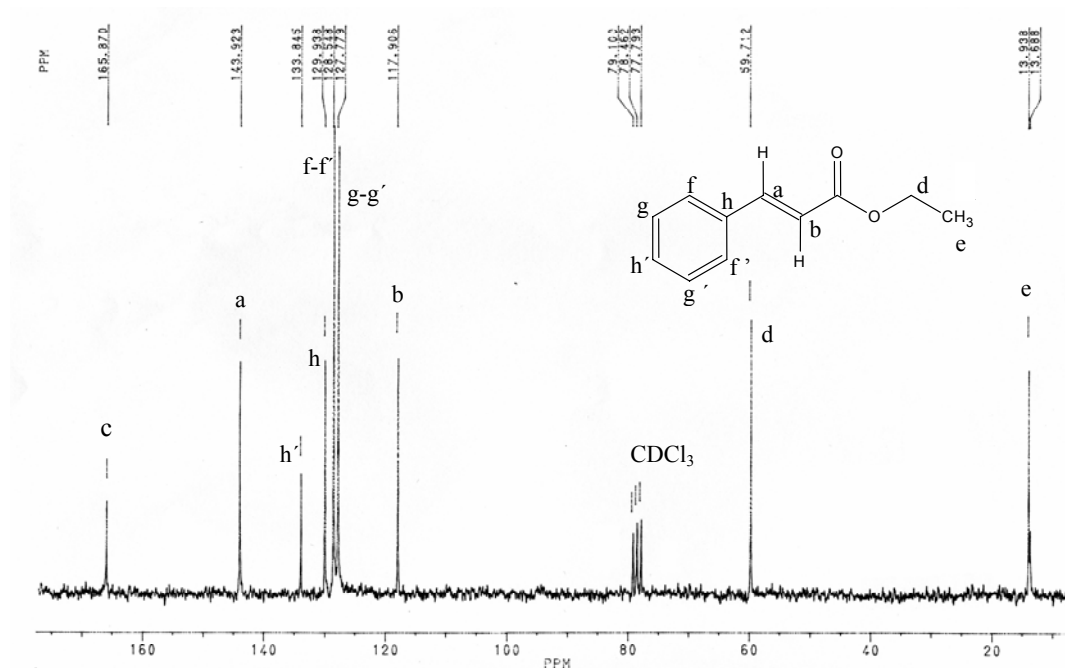


Figura 49. Espectro de RMN-¹³C do cinamato de etila em CDCl₃, 200MHz.

Os rendimentos em ésteres estão indicados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Rendimentos dos ésteres etílicos derivados do ácido cinâmico.

Ent.	(49a-j) massa (mg)	(50a-j) massa (mg)	Refluxo (h)	Rendimento (%) ^(a)
a	300,00	231,85	30	65
b	356,80	231,26	36	56
c	318,00	167,50	36	45
d	345,18	300,83	30	75
e	380,00	348,06	30	80
f	330,00	254,50	30	66
g	365,15	294,67	30	70
h	324,37	220,36	30	58
i	370,20	305,01	30	72
j	328,01	305,42	30	72

(a) determinado por massa (mg) de produto isolado.

Em seguida fez-se um gráfico dos rendimentos em éster (**50**) em função dos parâmetros σ dos substituintes. O resultado está demonstrado na **Figura 50**.

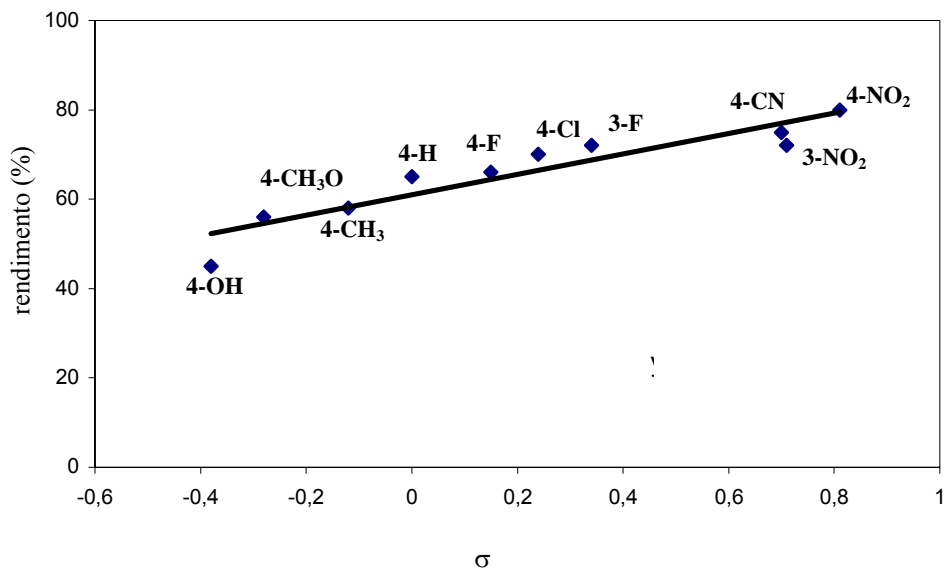
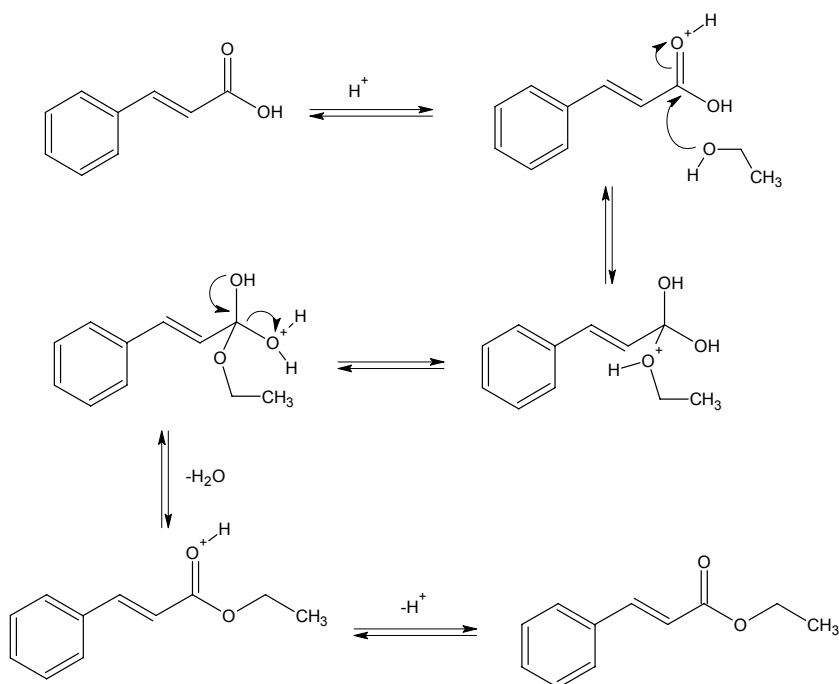


Figura 50. Variação do rendimento em éster etílico em função dos parâmetros σ dos substituintes. ($r = 0,8678$, $\rho = 22,861$).

Os resultados obtidos a partir da **Figura 50** demonstraram boa correlação entre os grupos substituintes e os rendimentos em éster ($\rho = 22,861$ e $r = 0,8678$). Grupos retiradores de elétrons tais como NO_2 e CN , diminuem a densidade eletrônica na carbonila, favorecendo o ataque nucleofílico do oxigênio do etanol e a formação dos ésteres. Este resultado é concordante com o mecanismo de esterificação descrito na literatura.⁶² (**Esquema 5**)



Esquema 5. Mecanismo de esterificação via-química.

Após a preparação e caracterização dos ésteres (item 3.4.2, p. 34-38), a etapa seguinte foi a epoxidação em diferentes sistemas para a determinação das melhores condições reacionais.

4.2.1. Epoxidação do cinamato de etila com diversas lipases.

Em uma primeira etapa foram realizadas as reações com dois sistemas bifásicos de água/solvente orgânico e água/tampão fosfato de potássio pH=9,0/solvente orgânico na presença de $NaHCO_3$ com a Novozym 435, LPS e LRO.

Os resultados obtidos para a epoxidação do cinamato de etila estão apresentados na **Tabela 7**.

Tabela 7. Epoxidação do cinamato de etila em diferentes sistemas reacionais.^(a)

lipase	conversão (%) ^(b)	
	sistema bifásico	
	água/tolueno	tampão fosfato de potássio pH=9,0/tolueno ^(c)
<i>Pseudomonas</i> sp.(LPS)	n.d. ^(d)	n.d. ^(d)
<i>Rhizopus orizae</i> (LRO)	n.d. ^(d)	n.d. ^(d)
<i>Candida antarctica</i> (Novozym 435)	n.d. ^(d)	21

(a) as reações foram realizadas com 1mmol de cinamato de etila, 10mmol de ácido octanóico, 1mL de peróxido de hidrogênio 30%, 150 mg de lipase, sistema bifásico água/tolueno à 30°C por 96h.

(b) determinada por RMN-¹H.

(c) adição de 300mg de NaHCO₃.

(d) n.d. - produto não detectado.

Em geral, a epoxidação de olefinas ricas em elétrons é bastante eficiente e o processo é bastante conhecido¹¹³ onde envolvendo o mecanismo concertado de adição eletrofílica do oxigênio do perácido à dupla ligação carbono-carbono.

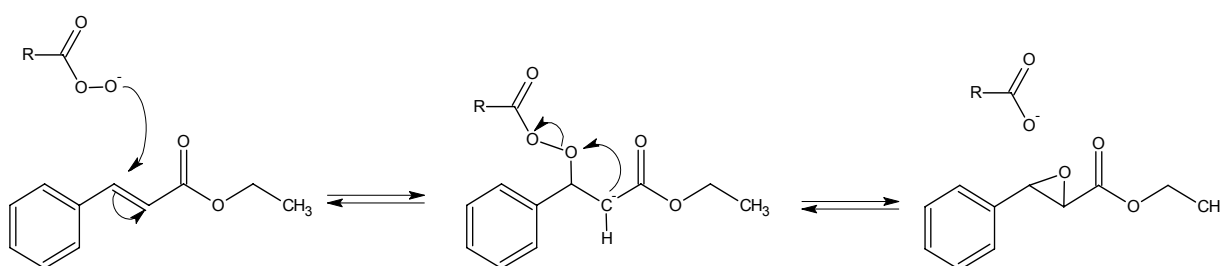
Entretanto, olefinas elétron-deficientes requerem na epoxidação um agente nucleofílico tal como HOO⁻¹¹⁴, t-BuOO⁻¹¹⁵ ou NaClO¹¹⁶ requerendo meios alcalinos para favorecerem a formação do produto epoxidado. Estas reações são denominadas de “epoxidação nucleofílica”.

Através da análise dos dados da **Tabela 7**, pode-se observar que utilizando o sistema bifásico água/tolueno não houve a formação do produto epoxidado. Isto provavelmente se deve a baixa reatividade da dupla ligação de alcenos α - β insaturados para esta reação conforme já discutido.¹¹⁷

Baseado nos trabalhos de Garcia Ruano e col,⁷⁴ no que se refere a importância do meio alcalino nestas reações, foi utilizado um sistema bifásico tampão fosfato de potássio pH=9,0 e tolueno na presença de NaHCO₃. Com a utilização deste sistema a conversão em epóxido foi de 21% com a Novozym

435. Utilizando a LPS e LRO neste sistema, não foi observada a formação de produto. Este resultado pode ser explicado pela exposição direta e prolongada ao pH mais alcalino (pH 9,0) e por estarem na sua forma livre, ao contrário da Novozym 435 que já está imobilizada.

A função do tampão fosfato e do NaHCO_3 é favorecer, após a formação do perácido pela enzima, a desprotonação do mesmo gerando um íon RCOOO^- que por sua vez se adiciona ao carbono da dupla resultando na formação de um carbânion, o qual ataca o oxigênio, ciclizando e formando um anel oxirano. **(Esquema 6)**



Esquema 6. Mecanismo de epoxidação nucleofílica.

A Novozym 435, de acordo com sua ficha técnica¹⁰⁷, apresenta grande estabilidade frente ao pH sendo este um dos fatores determinantes para a eficiência da reação com esta lipase.

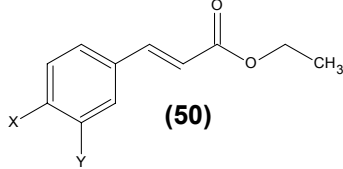
Ao término da reação não foi observado a formação de produtos de hidrólise do cinamato de etila. No espectro de RMN-¹H não foram detectados os sinais correspondentes aos hidrogênios do ácido cinâmico e etanol.

4.2.2. Efeito de grupos substituintes dos cinamatos de etila na epoxidação químico-enzimática.

Baseados nos resultados do item anterior, foram realizadas as reações com os ésteres substituídos do cinamato de etila (**50a-j**) em sistema bifásico solvente orgânico/tampão fosfato de potássio pH 9,0 na presença de NaHCO_3 .

Os resultados de conversão em epóxidos, estão demonstrados na **Tabela 8**.

Tabela 8. Epoxidação químico-enzimática dos derivados do cinamato de etila.^(a)

compostos (50)	 (50)		conversão (%) ^(b)	
	X	Y	tolueno	diclorometano
a	H	H	21	18
b	OCH ₃	H	13	11
c	OH	H	14	9
d	CN	H	32	30
e	NO ₂	H	40	32
f	F	H	19	21
g	Cl	H	21	23
h	CH ₃	H	27	26
i	H	NO ₂	34	35
j	H	F	36	19

(a) as reações foram realizadas com 1mmol de **(50a-j)**, 10mmol de ácido octanóico, 1mL de peróxido de hidrogênio 30%, 150 mg de lipase, sistema bifásico solvente/tampão fosfato de potássio pH 9,0 à 30°C por 96h.

(b) determinado por RMN-¹H.

Os resultados da **Tabela 8** demonstram que a conversão em epóxidos **(55a-j)** é dependente dos grupos substituintes do anel aromático e do solvente empregado.

A constante σ para cada grupo substituinte designa um valor que descreve as propriedades doadoras ou receptoras de elétrons desse substituintes, portanto ela é formada pelo somatório dos efeitos indutivo e mesomérico. **(Eq.2)**

$$\sigma = \sigma_i + \sigma_r \quad \text{Eq. 2}$$

Portanto, fazendo um gráfico das conversões em epóxidos, em função das constantes σ_i e σ_r ^{92,95} pode-se prever qual dos dois efeitos é mais importante para a formação do produto.

A **Figura 51** apresenta os resultados da conversão em epóxido para os diferentes ésteres em função de σ_i para as reações realizadas em tolueno e diclorometano.

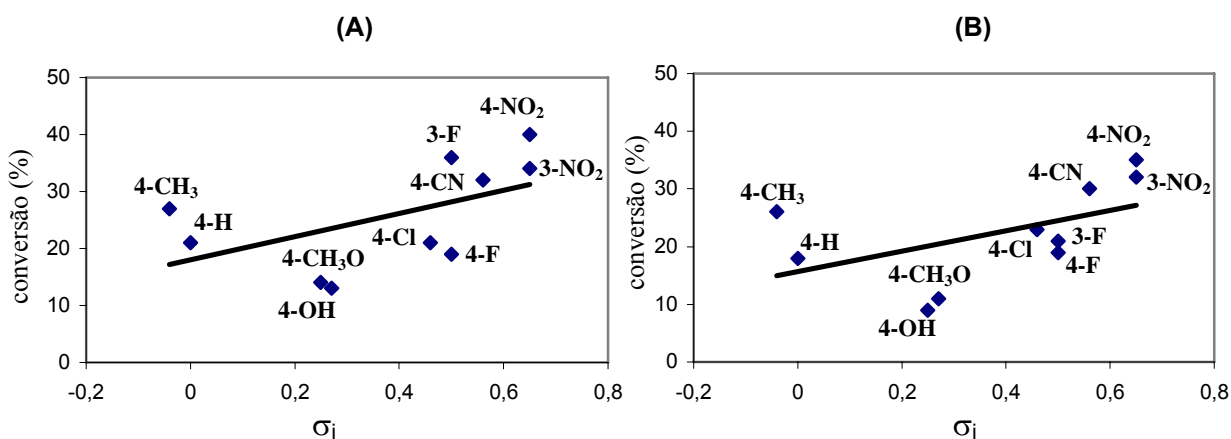


Figura 51. Conversões em epóxido (**55a-j**) em função das constantes de efeito indutivo (σ_i). [Novozym 435 (150mg), 96h, (A) tolueno e (B) diclorometano, 1mmol substrato, 30°C, 96h.]

A **Figura 52** apresenta os resultados da conversão em epóxido para os diferentes ésteres em função de σ_r para as reações realizadas em tolueno e diclorometano.

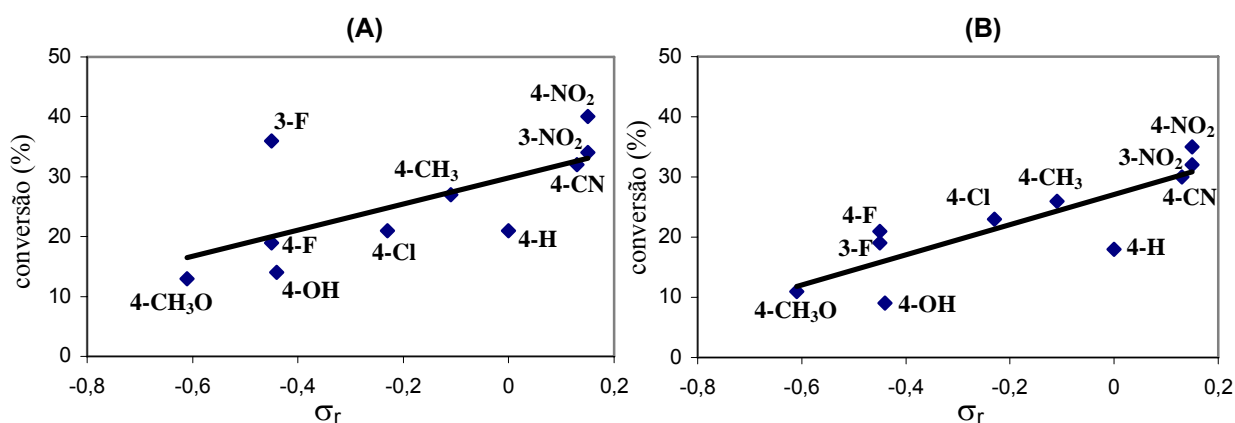


Figura 52. Conversões em epóxido (**55a-j**) em função das constantes de efeito mesomérico (σ_r). [Novozym 435 (150mg), (A) tolueno e (B) diclorometano, 1mmol substrato, 30°C, 96h.]

Ao correlacionar os valores de conversão com σ_i , obtiveram-se valores de ρ de 19,7 e 17,9 com $r = 0,2881$ e $r = 0,2667$ em tolueno e diclorometano respectivamente. Estes dados indicam que este efeito é menos efetivo nesta reação e portanto correlacionam pouco com as conversões em epóxidos. Os valores de ρ são maiores quando utiliza-se as constantes de efeito mesomérico, sendo $\rho = 21,8$ e $\rho = 25,0$ em tolueno e diclorometano, respectivamente. Estes resultados demonstram a predominância desse efeito, com uma média correlação ($r = 0,444$ em tolueno e $r = 0,7063$ em diclorometano).

Estes resultados evidenciam que, o efeito dos grupos substituintes dos cinamatos de etila é manifestado de forma mais efetiva pelas duplas ligações (efeitos de ressonância ou mesomérico), como está representado na **Figura 53**.

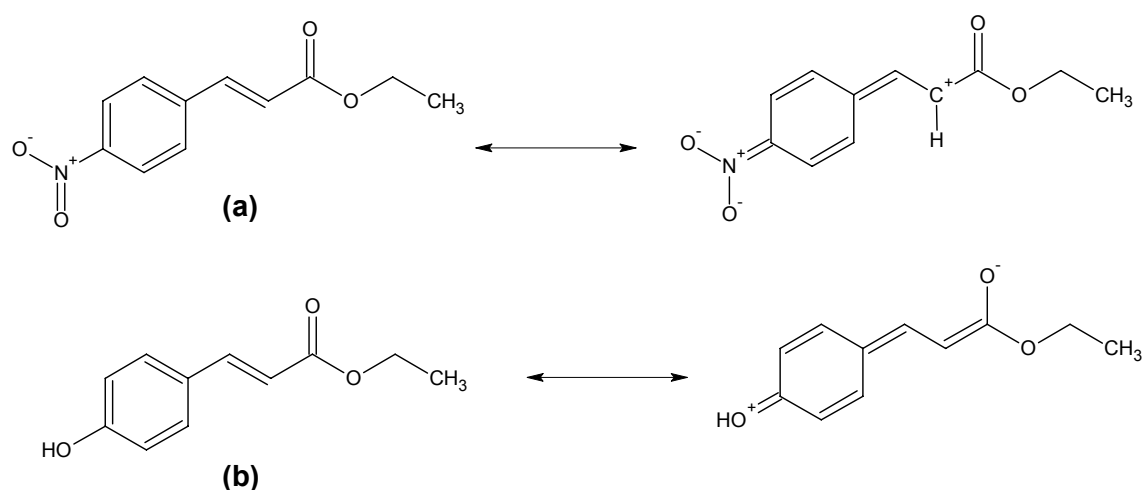


Figura 53. Formas ressonantes para o cinamato de etila com grupo retirador (a) e doador de elétrons (b).

Associando os efeitos indutivo e mesomérico, fêz-se um gráfico da conversão em epóxidos para os diversos cinamatos de etila em função das constantes de grupos substituintes (σ) em tolueno e diclorometano. Os resultados estão apresentados nas **Figuras 54 e 55**.

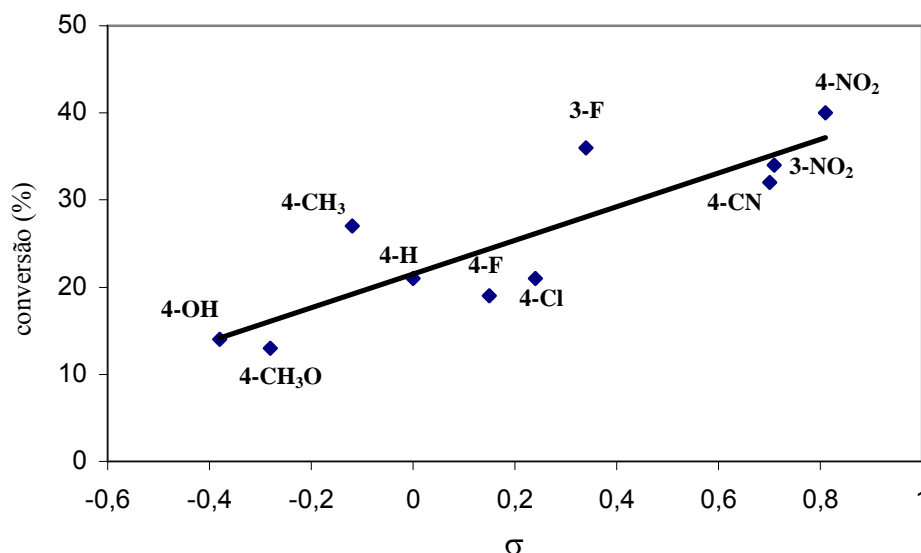


Figura 54. Conversões em epóxido (**55a-j**) em função das constantes de substituinte (σ). [Novozym 435 (150mg), 96h, 30°C, 1mL de H₂O₂, tolueno.]

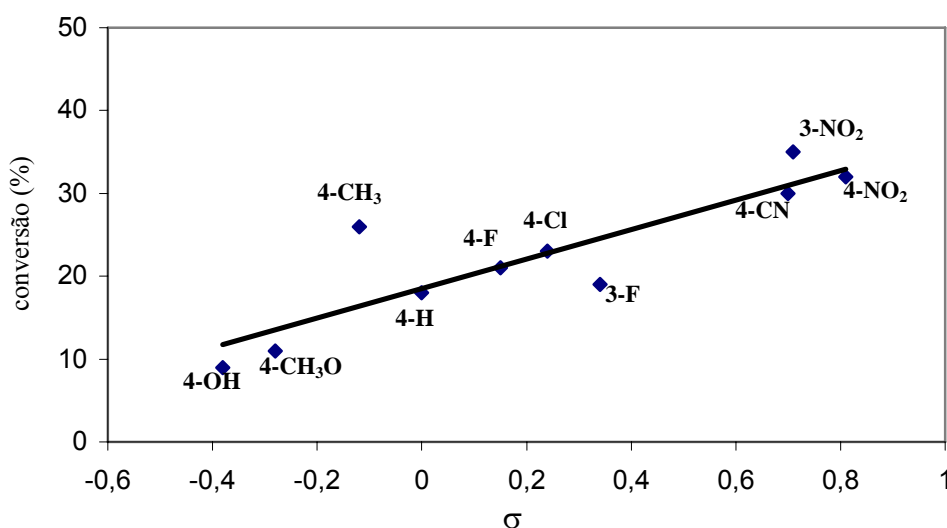


Figura 55. Conversões em epóxido (**55a-j**) em função das constantes de substituinte (σ). [Novozym 435 (150mg), 96h, 30°C, 1mL de H₂O₂, CH₂Cl₂]

Os resultados das **Figuras 54 e 55** demonstraram de modo geral, que os grupos retiradores de elétrons (valores de sigma positivos) favorecem a formação do epóxido, formando os produtos em maiores conversões.

Utilizando o tolueno como solvente (**Figura 54**), obteve-se ρ de 19,29, e correlação de $r = 0,7424$. Com diclorometano como solvente o valor de ρ foi de 17,78 e uma correlação de $r = 0,7675$. Tais valores sugerem que as reações conduzidas em tolueno são um pouco mais sensíveis as variações dos grupos

substituintes por apresentar um valor de ρ maior, mas com uma correlação entre as variáveis menor do que as realizadas em diclorometano.

Estes resultados confirmam o mecanismo proposto para a epoxidação nucleofílica, pois grupos retiradores de elétrons diminuem consideravelmente a densidade eletrônica na dupla ligação C=C, favorecendo o ataque nucleofílico do ânion peróxi-carboxilato, estando concordante com o mecanismo proposto e discutido na p. 60.

4.3. Formação de oxaziridinas via químio-enzimática.

Neste experimento foi avaliada a formação via-enzimática de oxaziridinas, utilizando a Novozym 435 como biocatalisador (**Figura 56**).

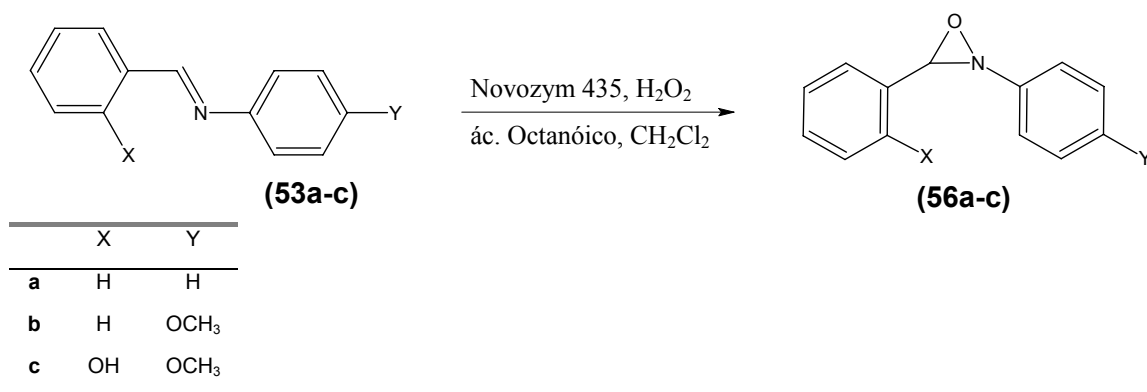


Figura 56. Oxidação de iminas via-enzimática.

Inicialmente foi estudada a reação de oxidação com a N-benzilidenanilina (**53a**). A **Figura 57** mostra a análise por CG para esta reação.

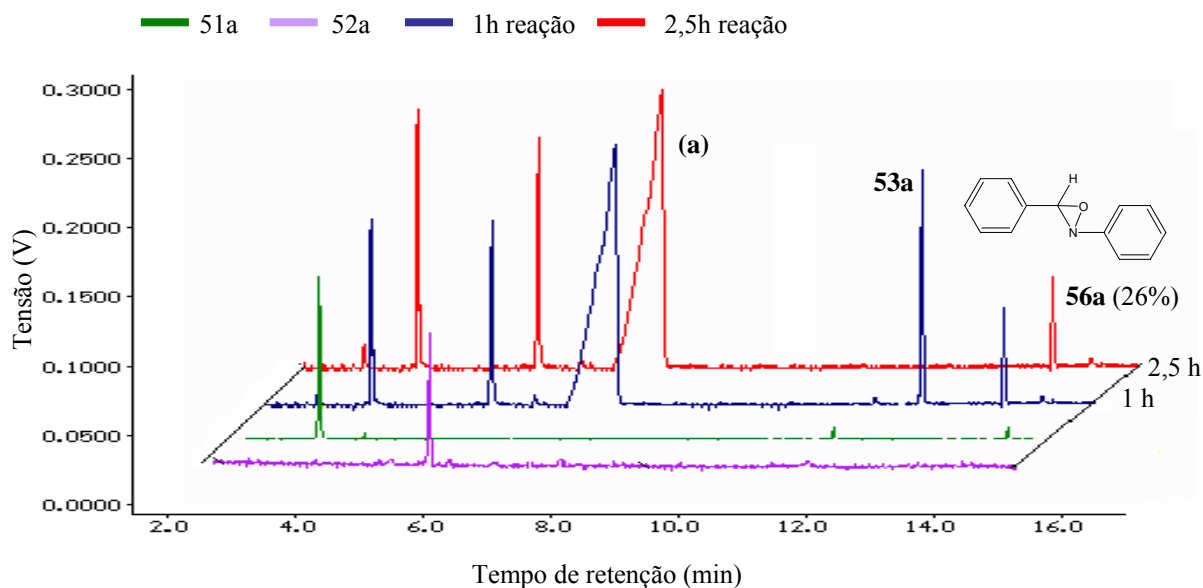


Figura 57. Cromatograma da reação de oxidação químico-enzimática da N-benzilidenanilina (1mmol – **53a**). [Novozym 435 (100mg), ácido octanóico (a) 10mmol, 25°C, 2,5 h, CH₂Cl₂]

A reação foi acompanhada por CG em outros tempos pré-determinados para a quantificação dos produtos formados.

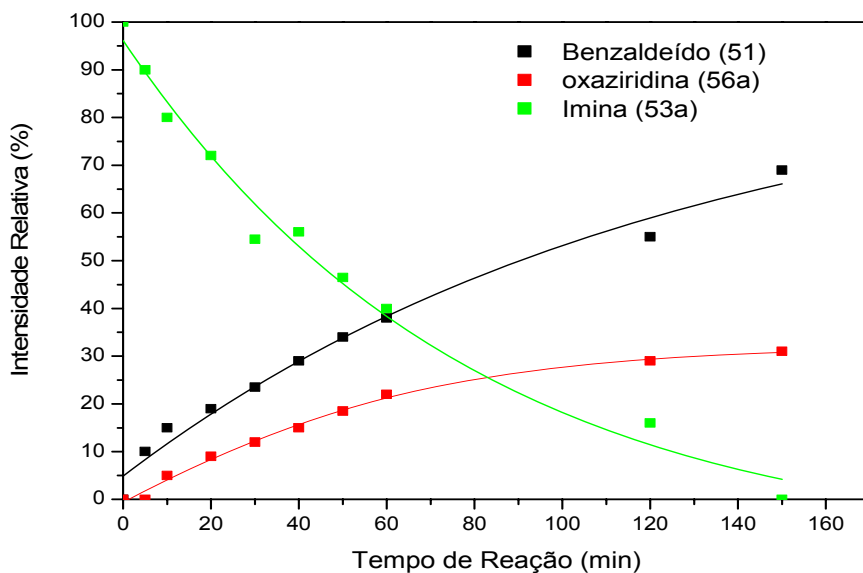
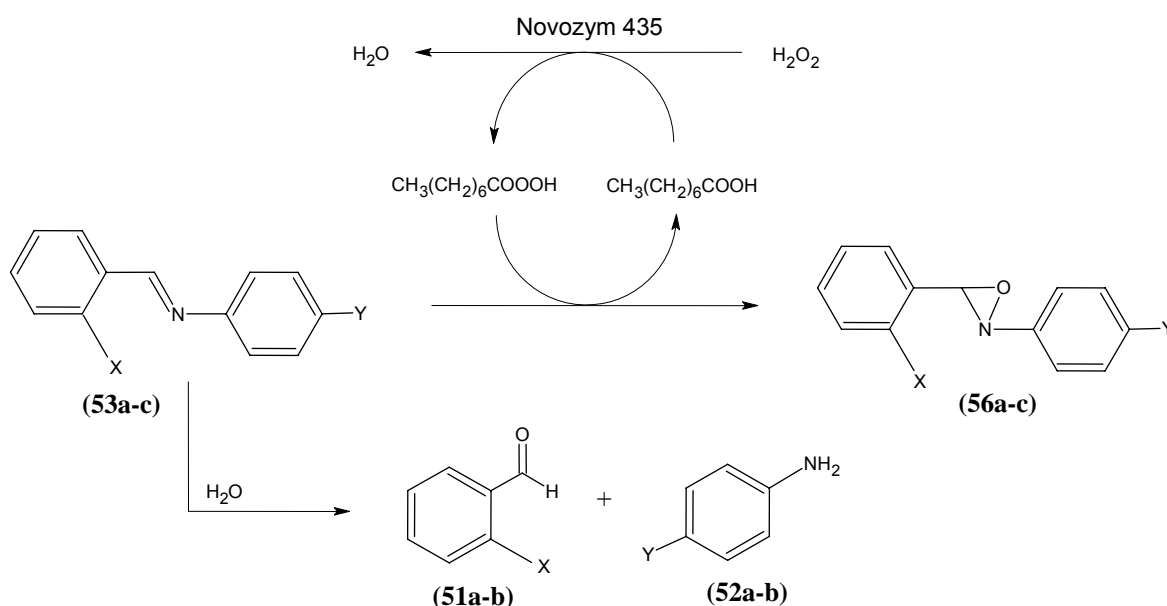


Figura 58. Conversão em oxaziridina (**56a**) em função do tempo de reação. [Novozym 435(100mg), H₂O₂(30%, 1mL), 25°C]

A **Figura 58** mostra o consumo da imina (**53a**) e a formação simultânea de benzaldeído (**51a**) e oxaziridina (**56a**) em 2,5h de reação. Após este tempo de reação, a imina foi totalmente consumida resultando na formação de 26% de oxaziridina e 74% de benzaldeído.

Os resultados obtidos demonstraram que, além da obtenção da oxaziridina (**56a**), também houve a formação de produtos de hidrólise (**51a**) e (**52a**) identificados por comparação dos tempos de retenção dos padrões, benzaldeído e anilina. A hidrólise da imina pode ter ocorrido devido a presença de água no meio reacional.

O **Esquema 7** mostra as reações paralelas que podem ocorrer neste meio.



Esquema 7. Reações de oxidação e hidrólise de N-benzilidenanilinas via químico-enzimática.

A partir destes resultados, fez-se a mesma reação com as iminas (**53b**) e (**53c**) que possuem grupos doadores de elétrons nos anéis aromáticos. Os resultados obtidos para a oxidação da imina (**53b**) estão demonstrados no cromatograma da **Figura 59**.

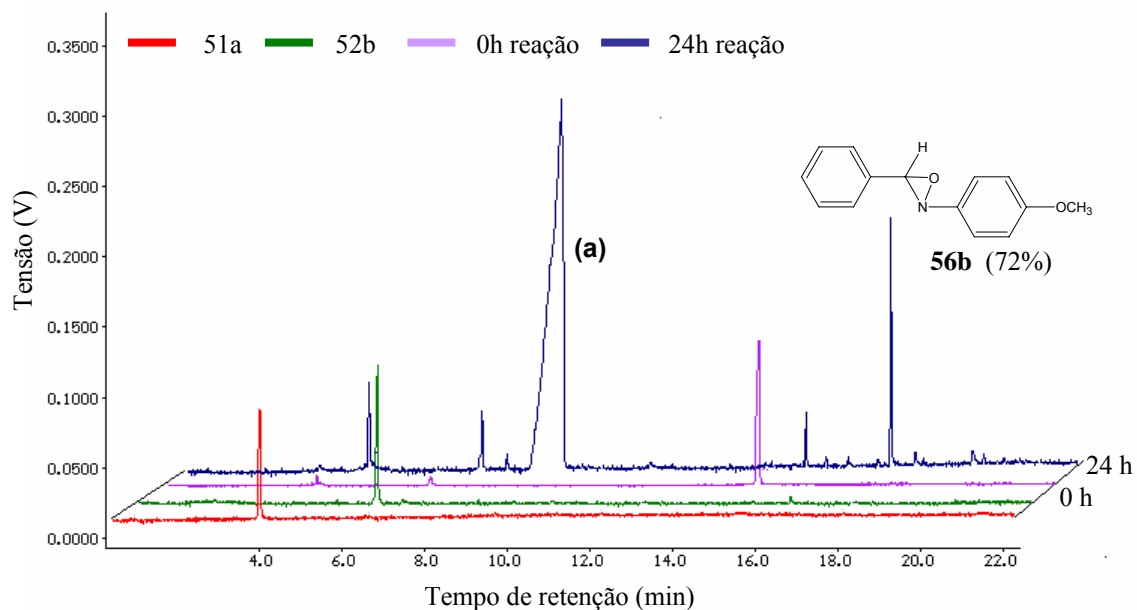


Figura 59. Cromatograma da reação de oxidação químico-enzimática da N-benziliden-p-metóxi anilina (1mmol - **53b**). [Novozym 435 (100mg), ácido octanóico (**a**) 10mmol, 25°C, 24 h, CH₂Cl₂]

Um estudo similar, em função do tempo, foi realizado com a imina (**53c**). Nas **Figuras 60 e 61** estão demonstrados os resultados para as reações de oxidação das iminas (**53b**) e (**53c**) via químico-enzimática, respectivamente.

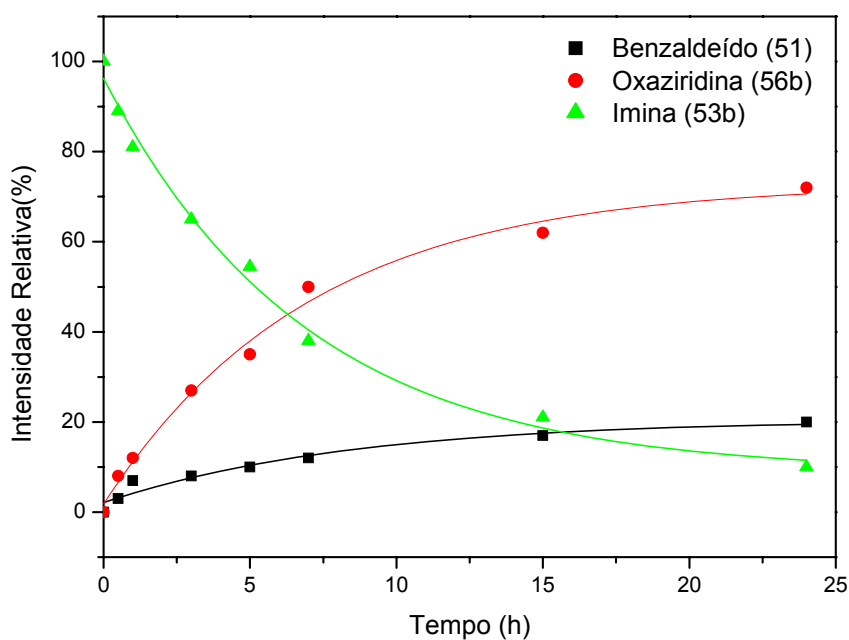


Figura 60. Conversão em oxaziridina (56b) em função do tempo de reação. [Novozyme 435(100mg), H₂O₂(30%, 1mL), 25°C]

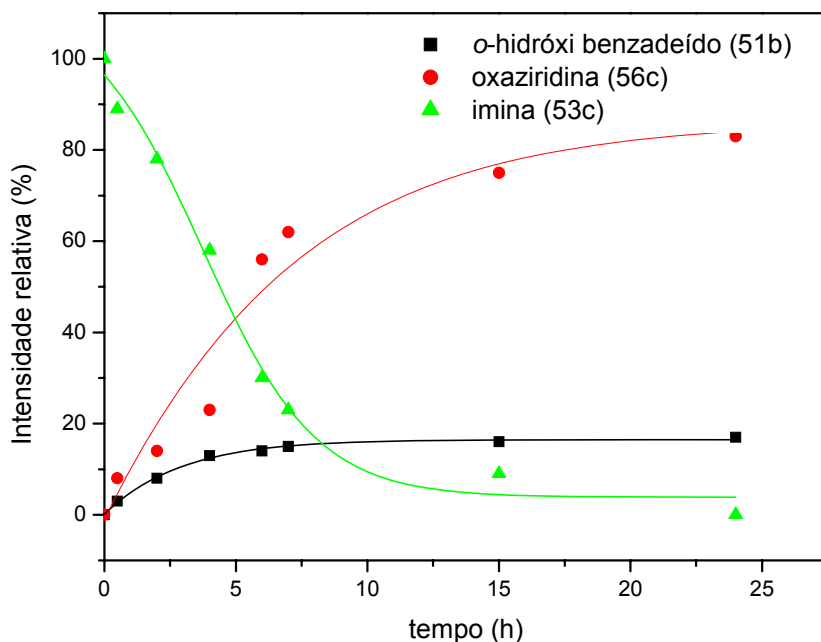


Figura 61. Conversão em oxaziridina (56c) em função do tempo de reação.
[Novozym 435(100mg), H₂O₂(30%, 1mL), 25°C]

Verificou-se que a formação da oxaziridina foi mais efetiva para os substratos **(56b)** e **(56c)**, que contém grupos doadores de elétrons (OCH₃ e OH) nas posições *para* do anel anilínico e *orto* no anel benzal. Estes aumentam a densidade eletrônica da C=N, favorecendo a oxidação e dificultando a hidrólise (ver **Esquema 7**).

Após 24h de reação obteve-se uma conversão de 72% em oxaziridina **(56b)** e apenas 18% de benzaldeído como sub-produto de hidrólise. Na oxidação de **(53c)** obteve-se 83% de conversão em oxaziridina e 17% de **(51b)**.

Estes resultados preliminares demonstraram que a formação da oxaziridina é bastante dependente do grupo substituinte no anel benzal e/ou anilínico.

5. CONCLUSÕES FINAIS

A partir dos resultados experimentais obtidos no presente trabalho permitiram obter as seguintes conclusões:

- Com relação à epoxidação químico-enzimática do cicloexeno:
 - Na epoxidação do cicloexeno, a conversão em epóxido foi dependente da polaridade do solvente utilizado e da fonte de lipase. As conversões variaram de 12-99%.
 - As melhores conversões foram obtidas em sistema bifásico água/tolueno com a Novozym 435 (>99%).
 - Com a utilização do líquido iônico 1-butil-3-metil-imidazólio tetrafluorborato em sistema trifásico de água/dicloro metano/[BMIm][BF₄], a conversão aumentou de 20 para 41% com a LPS.
 - As maiores conversões foram obtidas quando utilizou-se o sistema bifásico, estando de acordo com as análises iodométricas no que se refere à formação de perácidos.
 - As conversões em perácidos foram maiores com os ácidos carboxílicos de cadeias maiores e lineares (15-32%).
 - Utilizando a LPS, a maior conversão em epóxido foi obtida com o ácido hexanóico (60%).
 - Com a Novozym 435, as conversões em epóxidos foram quantitativas com os ácidos, hexanóico, octanóico, decanóico e láurico (>99%).
 - Utilizando a LRO, a maior conversão em epóxido foi com o ácido octanóico como doador acila, sendo de 84%.
 - Em sistema bifásico água/tolueno, a Novozym 435 pôde ser reutilizada até 10 vezes sem grandes diminuições na conversão em epóxido (90-99%).

- Com relação à epoxidação químico-enzimática dos derivados do ácido cinâmico substituídos;
 - O epóxido derivado do cinamato de etila foi obtido em sistema bifásico tolueno/tampão fosfato de potássio pH = 9,0 e NaHCO₃, em 96h de reação à 30°C, com a Novozym 435, obtendo-se o produto com 21% de conversão.
 - As conversões variaram de 9-40% dependendo do solvente e do grupo substituinte do anel aromático.
 - Grupos retiradores de elétrons (p. ex. CN, NO₂), favorecem a formação do epóxido (32-40%, respectivamente).
 - As análises de correlação apresentaram valores de ρ de 19,29, e $r = 0,7424$ em tolueno e ρ de 17,78 e $r = 0,7675$ em diclorometano, apoiando o mecanismo de “epoxidação nucleofílica”.
- Com relação à formação químico-enzimática de oxaziridinas:
 - De maneira geral, além da formação dos produtos, houve a formação de sub-produtos de hidrólise.
 - Com a N-benzilidenanilina (**56a**) como substrato, houve consumo total da imina resultando na formação de 26% de oxaziridina e 74% de benzaldeído em 2,5h de reação.
 - A formação de oxaziridina foi mais efetiva para os substratos (**56b**) e (**56c**). Em 24h de reação obteve-se uma conversão de 72% em oxaziridina (**56b**) e apenas 18% de benzaldeído como produto de hidrólise.
 - Na oxidação de (**53c**) obteve-se 83% de conversão em oxaziridina e 17% de (**51b**).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram a influência dos diversos parâmetros nas reações de oxidação químico-enzimática, tais como a fonte de lipase, solvente e o pH do meio.

Portanto, as reações biocatalisadas podem ser de grande utilidade e aplicação em síntese orgânica.

6. PERSPECTIVAS

A partir destes resultados, tem-se como continuidade do trabalho, os seguintes itens:

- Realizar um estudo mais aprofundado no que se refere a epoxidação químio-enzimática de compostos α,β -insaturados, por exemplo, derivados de chalconas, com maior reatividade.
- Avaliar nestas reações a influência de solventes orgânicos e a adição de líquidos iônicos,
- Avaliar outros sistemas reacionais com lipases de diferentes fontes e outros agentes oxidantes,
- Estudar outras reações de oxidação utilizando perácidos, tais como as de Baeyer-Villiger na formação de lactonas e oxidação de sulfetos à sulfóxidos,
- Estudar a oxidação de alquil-iminas na formação de oxaziridinas, com diferentes sistemas e lipases, no intuito de minimizar a formação de produtos de hidrólise.
- Estudar a formação de perácidos via-enzimática a partir de alquil-amidas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Van Arnum, S. D.; *J. Chem. Educ.*, 82, 11, 1689-1692, **2005**.
2. De Conti, R. M., Porto, A.L.M.; Rodrigues J. A., Moran, P.J.S.; Manfio, G.P.; Marsaioli, A.J.; *J. Mol. Catal. B:Enzym.* 11, 4-6, 233-236, **2001**.
3. de Paula, A.V.; Barboza, J.C.D.; de Castro, H.R.; *Quím. Nova*, 28 (5), 792-796, **2005**.
4. Nelson, D. L.; Cox, M. M.; Lehninger: *Principles of Biochemistry*, 3rd Ed. USA, Saunders Publishing College, **2000**.
5. Faber, K.; *Biotransformations in organic chemistry*, Springer-Verlag, New York, **1997**.
6. Murray, R. K.; Granner, D. K; Harper, *Bioquímica*, Atheneus SP, 6^a Ed. Cap. 7. **1990**.
7. Moran, P. J. S., Rodrigues, J. A. R. Joekes, I, Breneli, E. C. S., Leite, R. A. *Biocatalysis*, 9, 321-328, **1994**.
8. Voet, D.; Voet, J. G.; *Biochemistry* – 2nd Ed., John Wiley & Sons Inc. **1995**.
9. (a) Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E.; *The Protein Data Bank, Nucleic Acids Research*, 28, 235-242, 2000. (b) Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/>>. Acessado em: dezembro de 2005.
10. Jones, J. B.; *Tetrahedron*, 42, 3351, **1986**.
11. <http://bio.winona.msus.edu/bates/Bio241/enzymes.htm>, acessada em outubro em **2005**.
12. Kazlauskas, R. J.; *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 9, 2 , 195-201, **2005**.

13. University of London – International Union of Biochemistry and Molecular Biology. *Enzyme Nomenclature* (desenvolvida por G. P. Moss). Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Acesso em: outubro de **2005**.
14. Castrol, H. F.; Mendesl, A. A., Santos, J. C.; Aguiar, C. L.; *Quím. Nova*, 27 **1**, **2004**.
15. Faber, K.; Kroutil, W.; *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 9, (2): 181-187, **2005**.
16. Loughlin, W.; *Bioresour. Technol.* 74, 49-62, **2000**.
17. Cygler, M.; Grochulski, P.; Kazlauskas, K. J.; Scharag, j. D.; Bouthillien, F.; Rubin, B. Sereqi, A. N.; Gupta, A. K.; *J. Am. Chem. Soc.* 116, 3180-3186 – **1994**.
18. Wong & Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, 12, Ed. Pergamon. p. 22-25, **2002**.
19. Wooley, P., Petersen, S. B., *Lipases, their structure, biochemistry and application*, Univ. Cambridge, **1994**.
20. Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U. C.; *Biotechnol. Advances*, 19, 627-662, **2001**.
21. Gama, F. M.; Aires-Barros, M. R.; Cabral, J.; *Engenharia enzimática*, Ed. Lidel, Biotec, **2003**.
22. (a) Lima, V. M. G.; “*Produção e Purificação da Lipase de Bacillus megaterium CCOC-P2637 e sua Aplicação em Biocatálise em Solventes Orgânicos*”, Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica – UFPR, **2004**. (b) Lima, V. M. G., Krieger, N., Mitechell, D. A., Fontana, J. D.; *Biochem. Eng. J.*, 18 (1), 65-71, **2004**. (c) Lima, V. M. G., Krieger, N.,

- Mitechell, D. A., Fontana, J. D.; Baratti, J. C.; Filippis, I.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 31 (1-3), 53-61, **2004**.
23. *Biotimes* – Revista Bioindustrial Trimestral da Novozymes **2005**.
24. <http://www.pdb.org>, acessada em outubro de **2005**.
25. Haki, G. D.; Rakshit, S. K.; *Bioresour. Technol.*, 89, 17-34, **2003**.
26. Neto, P. R. C., Mazzuco, L. M. Nascimento, M. G., *Biotecnologia & Ciência e Desenvolvimento*, 19, 28-31, **2001**.
27. Du, W.; Xu, Y.; Liu, D.; Zeng, J.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 30, 3-4, **2004**.
28. Long, W. S.; Kamaruddin, A. H.; Bhatia S.; *Chem. Eng. Sci.*, 59, 22-23, **2004**.
29. Zanotto S. P. *Utilização de Enzimas e Microrganismos para Obtenção de Compostos Oticamente Ativos*, Tese de doutorado, UFSC, julho de **2003**.
30. Nascimento, M. G. Zanotto, S. P. Melegari, S. P. Fernandes, L. Sá, M. C. M.; *Tetrahedron: Asymm.*, 14, 7, 3111-3115, **2003**.
31. (a) Jaeger K. E.; Eggert T.; *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 4, 390-397, **2002**.
(b) Zhu, B.; Panek, J.S.; *Eur J Org Chem.*, 1, 1701–1714, **2001**.
32. Shi, H.; Zhang Z.; Wang, Y.; *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 238, 1-2, 1, 13-25, **2005**.
33. Klaas, M. R.; Steffens, K.; Patett, N., J. A., *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, 19-20, 499-505, **2002**.
34. Roberts, S. M. *Biocatalysts for fine Chemicals Synthesis*, John Wiley & Sons, Ltd. England, **1999**.
35. Karra-Chaabouni, M.; Pulvin, S.; Touraud, D.; Thomas, D., *Biotechnol. Lett.*, 18, 9, 1083, **1996**.

36. Burg-Garros, S.; Razafindramboa, N.; Paiva, A. A., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 11, 1471, **1997**.
37. Ghosh, S.; Bhattacharyya, D. K., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 5, 589, **1997**.
38. Kwon, D. Y.; Song, H. N.; Yoon, S. H., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 10, 1287, **1997**.
39. Basheer, S.; Snape, J. B.; Mogi, K.; Nakajima, M., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72, 2, 231, **1995**.
40. Linko, Y.Y.; Lämsä, M.; Huhtala, A.; Linko, P., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 12, 1411, **1994**.
41. Villeneuve, P., Muderrhwa, J. M., Graille, J., Haas M. J.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 9 (4-6), 113-148, **2000**.
42. Klibanov, A. M. , *Nature*, 409, 241-246, **2001**.
43. Sheldon, R. A.; Schoevaert. R.; Van Langen, L. M.; *Biocatal. Biotransform.*, 23 (3-4), 141-147, **2005**.
44. Rahman, M. B. A.; Yunus, N. M. M.; Hussein, M. Z.; Rahman, R.N.Z.R.A.; Salleh, A. B.; Basri, M.; *Biocatal. Biotransform.*, 23 (3-4), 233-239, **2005**.
45. Moreira, M. A., Bitencourt, T. B., Nascimento, M. G.; *Synth. Commun.*, 2107-2114, (5), **2005**.
46. Sinegani, A. A. S.; Emtiazib G.; Shariatmadaric H.; *J. Colloid Interface Sci.*, 290(1):39-44, **2005**.
47. Darder, M.; Aranda, P.; Hernández-Vélez, M.; Manovaa, E.; Ruiz-Hitzky, E.; *Thin Solid Films*, 495, 1-2, 321-326, **2005**.
48. Yadav, G. D.; Jadhav S. R.; *Microporous Mesoporous Mater.*, 86, 1-3, 215-222, **2005**.

49. Vecchia, R. D.; Nascimento, M. G.; Soldi, V.; *Quím. Nova*, 27, 4, 623-630, **2004**.
50. Vecchia, R. D.; Nascimento, M. G.; Soldi, V.; Sebrão, D.; *Process Biochem.*, 40 (8), 2677-2682, **2005**.
51. Den Hollander, J. L.; Zomerdijk, M.; Straathof, A. J. J.; Vand Der Wielen, L. A. M.; *Chem. Eng. Sci.* 57, 9, 1591-1598, **2002**.
52. (a) Klivanov, A. M.; Koskinen, A. M. P.; *Enzymatic reactions in organic media*, Blackie Acad., 1a. Ed. **1996**. (b) Tweddell, R.J.; Kermasha, S.; Combes, D.; Marty, A.; *Enzym. Microb. Technol.*, 22 (6), 439-445, **1998**.
53. Slayden, S. W.; Liebman, J. F.; Sawaki, Y; *The Chemistry of Hydroxyl, Ether and Peroxide Groups*. ED. Patai, S., Chichester: J. Wiley; 103-133, 587-656, **1993**.
54. Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; *Organic Chemistry*, 1^a Ed. Oxford University Press, **2001**.
55. Hunt, K. W.; Grieco, P. A.; *Org. Lett.*, 2, 12, 1711-1719, **2000**.
56. Treiber, A.; *J. Org. Chem.* 67, 7261-7266, **2002**.
57. Murahashi, S.; Oda, Y.; Komiya, N.; Naota, T.; *Tetrahedron Lett.* 35, 43, 7953-7956, **1994**.
58. Ricci, L.C.; Comasseto, J. V.; Andrade, L.H.; Capelari, M.; Cass, Q.B.; Porto A.L.M.; *Enzyme Microb. Technol.*, 36, (7), 937-946, **2005**.
59. Schirmann, J.P.; Delavarenne, S.Y., *Hydrogen Peroxide in Organic Chemistry*, (S.E.T.E. Lyon), **1979**.
60. Klaas, M. R.; Warwel, S., *J. Mol. Cat. A: Chem.*, 117, 311-319, **1997**.
61. Godfredsen, S. E.; Frykman, H.; Björkling, F.; *Tetrahedron*, 48 (22), 4587, **1992**.

62. Solomons, T. W., Graham, L., Whei, O.; *Química Orgânica /T. W. Graham Solomons*, 7.ed. Ed: LTC , Rio de Janeiro, **2002**.
63. Morrison, R. T., Boyd, R.N., *Química Orgânica*, 11^a ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, **1994**.
64. McCluskey, A.; Leitch, S.K.; Garner, J.; Caden, C. E.; Hill, T. A.; Odell, L. R.; Stewart, S. G.; *Tetrahedron Lett.*, 46 (47), 8229-8232, **2005**.
65. Yu, H. W.; Nakano, Y.; Fukuhara, T.; Hara, S.; *J. Fluorine Chem.*, 126 (6), 962-966, **2005**.
66. Skouridou, V.; Stamatis, H.; Kollis, F. N.; *Biocatal. Biotransform.*, 21, (6), 285-290, **2003**.
67. Yoo, D.; Kim, H.; Kim, Y. G.; *Synlett*, (11), 1707-1710, **2005**.
68. Ghadiri, M.; Farzaneh, F.; Ghandi, A.; *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 233, (1-2), 127-131, **2005**.
69. Coelho, F.; Porto, R. S.; Vasconcelos, M. L. A. A.; Ventura, E.; *Synthesis-Stuttgart*, 14, 2297-2306, **2005**.
70. Corey, E. J., Shibata, S.; Bakshi, R. K.; *J. Org. Chem.*, 53, 2861-2863, **1988**.
71. Concellon, J. M.; Bardales, E.; *J. Org. Chem*, 5, 9492-9295, **2003**.
72. Roberts, S. M.; Lauret, C.; *Aldrichim. Acta*, 35 (2), 47, **2002**.
73. Rodríguez, S.; Vidal, A.; Monroig, J. J.; Gonzalez, F. V.; *Tetrahedron Lett.*, 45, (28), 5359-5361, **2004**.
74. García Ruano, J. L.; Fajardo, C.; Fraile, A.; Martín, M. R.; *J. Org. Chem.*, 70, 4300-4306, **2005**.
75. Tong, K. H.; Wong, K.Y.; Chan, T. H.; *Org. Lett.*, 5, 3423-3425, **2003**.
76. Zhang, W.A.; Basak, Y. Kosugi, Y. Hoshino, H. Yamamoto, *Angew. Chem.*, 117, 4463-4465, **2005**.

77. Kino, R.; Daikai, K.; Kawanami, T.; Furuno, H.; Inanaga, J.; *Org. Biomol. Chem.*, 2, 1822-1824, **2004**.
78. Bjorkling, F., Godtfredsen, S. E.; Kirk, O.; *Trends Biotechnol.*, 9, 360-363, **1991**.
79. Klaas, M. R.; Warwel, S. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 1, 29-35, **1995**.
80. Skouridou, S., Kolisis, F.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 21, 67-69, **2003**.
81. Armstrong, A.; Atkin, M.A.; Swallow, S.; *Tetrahedron Lett.*, 13, 2247-2251, **2000**.
82. Anderson, D.R.; Woods, K.W.; Beak, P.; *Org. Lett.*, 1, 9, 1415-1417, **1999**.
83. [daecr1.harvard.edu/pdf/ smnr_2000-2001_Magomedov_Nabi.pdf](http://daecr1.harvard.edu/pdf/smnr_2000-2001_Magomedov_Nabi.pdf) acessado em janeiro de 2006.
84. Krimm, H.; British Patent 743,940, 1953; *Chem. Abstr.*, v 265, **1957**.
85. Emmons, W. D.; *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 608, **1956**.
86. Horner, L.; Jurgens, *E. Chem. Ber.*, 90, 2184, **1957**.
87. Kraiem, J.; Othman, R.B.; Hassine, B.B.; *C. R. Chimie*, 7 (10-11), 1119-1126, **2004**.
88. Mohajer, D.; Iranpoor, N.; Rezaeifard, A.; *Tetrahedron Lett.*, 45, 3, 631-634, **2004**.
89. Fontecave M.; Schoumacker, S.; Hamelin, O.; Téli, S.; Pécaut, J.; *J. Org. Chem.*, 70, 301, **2005**.
90. Armstrong, A.; Edmonds, I.D.; Swarbrick, M.E.; Treweeke, N.R.; *Tetrahedron*, 61, 35, 8423-8442, **2005**.
91. Carey, F.A.. *Organic Chemistry*, 3^a ed. McGraw Hill, 1996.
92. Hansch, C.; Leo, A.; Hoekman, D.; *Exploring QSAR: hydrophobic, electronic and steric constants*, ACS: Washington, 1995.

93. Lowry, T.; Richardson, K. S.; *Mechanism and theory in organic chemistry*, 3 Ed. Harper & How, New York, **1987**.
94. Maskill, H.; *Structure and reactivity in organic chemistry*, Ed. 1 Series Editors, Oxford Press. **2003**.
95. Hammett, L. P.; *J. Am. Chem. Soc.*, 59, 96, **1937**.
96. March, J.; *Advanced organic chemistry*, 3. Ed., John Wiley & Sons, **1985**.
97. Echevarria, A.; Miller, j.; Nascimento, M. G.; *Magn. reson. chem.*, 23, 10, **1985**.
98. Lu, N.T., Nguyen, V.N., Kumar, S.; McCurdy, A.; *J. Org. Chem.*, 70, 22, 9067-9070, **2005**.
99. <http://www.aist.go.jp>, *Advanced industrial science and technology*, Japan, acessado em março de 2005.
100. Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 6. Ed. Rio de Janeiro: LTC, .460, **2000**.
101. Pinkernell, U.; Karst. U.; Cammann, K.; *Anal. Chem.* 66, 2599-2602, **1994**.
102. Minning, S.; Weiss, A.; Bornscheuer, U. T.; Schmid, R. D.; *Anal. Chim. Acta*, 378, 293-298, **1999**.
103. Dupont, J.; Souza, R. F.; Suarez, P. A. Z.; *Chem. Rev.*, 102, 3667-3692, **2002**.
104. Morita, T.; Assumpção, R.M.V.; *Manual de soluções, reagentes e solventes*, 2^a Ed. Editora Edgard Blucher LTDA, 274, **1995**.
105. Fieser, M.; *Reagents for organic chemistry*, Vol. 17, John Wiley & Sons, p.61-64, 1994.

106. Bigelow, L. A.; Eatough, H.; *Organic synthesis*, Collective, Vol.1 John Wiley & Sons, Inc., New York-London, 80, **1967**.
107. Tabei, K.; Saiotu, E.; *Bull. Chem. Soc.*, 42, 2693, **1969**.
108. Ficha Técnica da Novozymes 2002 – www.novozymes.com, acessada em outubro de 2005.
109. Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C., *Biotechnol. Bioeng*, 30, 81-87, **1987**.
110. Moreira, M. A., Utilização de Lipases em Reações de Epoxidação Químico-Enzimática, Dissertação de Mestrado, **2003**, UFSC.
111. Lau, R.M.; van Rantwijk, F.; Seddon, K.R.; Sheldon, R.A.; *Org. Lett.*, 26(2) 4189-4191. , **2000**
112. Klaas, M. R.; Steffens, K.; Patett, N.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 19-20, 499-505, **2002**.
113. (a) Kim, C.; Traylor, T. G.; Perrin, C. L.; *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 9513-9516 . (b) Bach, R.; Glushkovtsev, M. N.; Gonzalez C.; *J. Am. Chem. Soc.* , 120, 9902-9910, **1998**.
114. (a) Bunton, C. A.; Minkoff, C.J.; *J. Chem. Soc.* 1949, 665-670. (b) Patai, S.; Rappoport, Z.; In the Chemistry of alkenes; Patai, S. Ed.; Wiley-Interscience: New York, 8, 512-517, **1964**.
115. Jackson, R. F. W.; Standen S. P.; Clegg, W. J., *J. Org. Chem.*, 61, 7212-7216, **1996**.
116. Reed, A. D.; Hegedus, L. S.; *J. Org. Chem.*, 60, 3787-3794, **1995**.
117. Wang, B.; Kang, Yang, L.; Suo, J.; *J. Mol. Catal. A: Chem.* 203, 29-36, **2003**.

8. Produção Científica 2004-2006.

Artigo publicado em periódico indexado

1.

BITENCOURT, T. B., MOREIRA, M. A., NASCIMENTO, M. G. Optimization of Chemo-Enzymatic Epoxidation of Cyclohexene Mediated by Lipases. Synth. Comm., v.35, p.2107 - 2114, 2005.

Trabalhados resumidos publicados em anais de evento

1.

BITENCOURT, T. B., SCHNEIDER, R. C. S., LARA, L. R. S., NASCIMENTO, M. G., NUNES, M. R., Epoxidação Químico-Enzimática dos Ésteres Metílicos do Óleo de Girassol em Sistema Bifásico In: III Workshop de Biocatálise/II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones, 2006, São Paulo SP.

2.

BITENCOURT, T. B., FERRAZ, A. M., NASCIMENTO, M. G., Lipases Imobilizadas em Filmes de Dextranas na Formação de Oleatos de Etila In: III Workshop de Biocatálise/II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones, 2006, São Paulo SP.

3.

BITENCOURT, T. B., NASCIMENTO, M. G., Utilização de Lipases na Formação Químico-Enzimática de Oxaziridinas In: III Workshop de Biocatálise/II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones, 2006, São Paulo SP. (apresentação oral)

4.

BITENCOURT, T. B., LARA, L. R. S., MARTINELLI, M., NASCIMENTO, M. G., SCHNEIDER, R. C. S., Avaliação de Métodos de Epoxidação de Óleos Vegetais e seus respectivos Ésteres Metílicos In: XI Seminário de Iniciação Científica e X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UNISC, 2005, Santa Cruz do Sul, RS.

5.

BITENCOURT, T. B., MOREIRA, M. A., NASCIMENTO, M. G., Epoxidação Químico-Enzimática do Eugenol e Isoeugenol In: 28 Reunião Anual da SBQ, 2005, Poços de Caldas, MG.

6.

BITENCOURT, T. B., MOREIRA, M. A., NASCIMENTO, M. G., Lipase catalyzed synthesis of peroxy-carboxylic acids and their use in oxidation reactions In: 11th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2005, Canela, RS.

7.

BITENCOURT, T. B., SCHNEIDER, R. C. S., NASCIMENTO, M. G., LARA, L. R. S. Produção de Ésteres Metílicos do Óleo de Girassol Epoxidado empregando o método Químio-Enzimático In: 13 Encontro de Química da Região Sul, 2005, Florianópolis, SC.

8.

BITENCOURT, T. B., NASCIMENTO, M. G., FERRAZ, A. M. Utilização de Filmes de Dextrana/Glicerol na imobilização de Lipases In: 13 Encontro de Química da Região Sul, 2005, Florianópolis SC.

9.

BITENCOURT, T. B., MOREIRA, M. A., NASCIMENTO, M. G. Lipase Catalyzed Perhydrolysis of Octanoic Acid and its use for Epoxidation of D-Limonene In: CLAFQO-8 - Conferência Latino-Americana de Físico-Química Orgânica, 2005, Florianópolis.

10.

BITENCOURT, T. B., WICKERT, L. R., MOREIRA, M. A., NASCIMENTO, M. G., SCHNEIDER, R. C. S., Epoxidação Enzimática dos Óleos de Linhaça e Rícino In: 27a RA SBQ/ XXVI Congresso Latino Americano de Química, 2004, Salvador - Ba.

11.

BITENCOURT, T. B., MOREIRA, M. A., NASCIMENTO, M. G., Epoxidação Químio-Enzimática do Cicloexeno mediada pela Lipase de *Rhizopus Orizae* In: Biocatalisis y Biotransformaciones, 2004, Montevideu.

12.

BITENCOURT, T. B., NASCIMENTO, M. G., MOREIRA, M. A., Influência do Doador Acila na Epoxidação Químio-Enzimática do Cicloexeno em Sistema Bifásico In: 27a RA SBQ/ XXVI Congresso Latino Americano de Química, 2004, Salvador - Ba.

13.

BITENCOURT, T. B., MOREIRA, M. A., NASCIMENTO, M. G., Influência do Solvente na Epoxidação Químio-Enzimática do Cicloexeno em Sistema Bifásico In: XII Encontro de Química Da Região Sul, 2004, Guarapuava - PR.