

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA**

Thiago Bergler Bitencourt

**UTILIZAÇÃO DE LIPASES NA FORMAÇÃO QUÍMIO-  
ENZIMÁTICA DE N-ALQUILOXAZIRIDINAS E EPÓXIDOS**

Florianópolis  
2010



Thiago Bergler Bitencourt

**UTILIZAÇÃO DE LIPASES NA FORMAÇÃO QUÍMIO-  
ENZIMÁTICA DE N-ALQUILOXAZIRIDINAS E EPÓXIDOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do título de Doutor em Química.

Florianópolis  
2010



B624 Bitencourt, Thiago Bergler  
Utilização de lipases na formação químico-enzimática de  
N-alquiloxaziridinas e epóxidos [tese] / Thiago Bergler  
Bitencourt ; orientadora, Maria da Graça Nascimento. -  
Florianópolis, SC, 2010.  
1 v.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.  
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Lipase. 3. Compostos de Epóxi. 4.  
Oxaziridinas. I. Nascimento, Maria da Graça. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

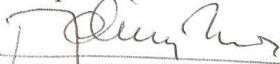


Thiago Bergler Bitencourt

**UTILIZAÇÃO DE LIPASES NA FORMAÇÃO QUÍMIO-  
ENZIMÁTICA DE N-ALQUILOXAZIRIDINAS E EPÓXIDOS**

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Doutor em Química no Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 19 de maio de 2010.

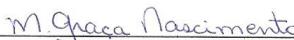


Prof. Dr. Ademir Neves  
Coordenador do Programa

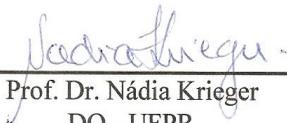
**BANCA EXAMINADORA**



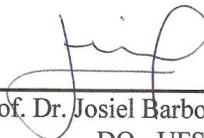
Prof. Dr. Leandro H. de Andrade  
IQ - USP



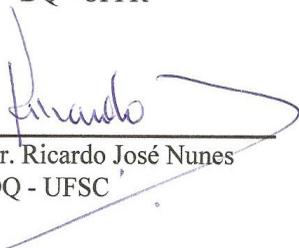
Prof. Dra. Maria da Graça Nascimento  
Orientador



Prof. Dr. Nádia Krieger  
DQ - UFPR



Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos  
DQ - UFSC



Prof. Dr. Ricardo José Nunes  
DQ - UFSC



Prof. Dr. Antônio Luiz Braga  
DQ - UFSC



## AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial a minha orientadora, Profa. Maria da Graça Nascimento que além de orientadora, sempre foi uma pessoa conselheira, amiga e batalhadora pelo bom funcionamento do Laboratório. Obrigado pela amizade, paciência, incentivo, total orientação e confiança em meus trabalhos, e pelas oportunidades que me proporcionou. Minha eterna gratidão.

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

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

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

Ao CNPq, CAPES, e INCT-Catálise 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 (em especial, Prof. Marcus M. Sá e Antônio Carlos Youssef), que contribuíram e me ajudaram muito na minha formação.

Ao doutorando Edmar Martendal pelas análises de CG-EM.

A doutoranda Melina Heller e ao Prof. Gustavo Micke pelos trabalhos envolvendo eletroforese capilar.

Ao Prof. David Gonzalez, pelo fornecimento dos substratos e orientação nos trabalhos realizados na UdelaR.

A doutoranda Viviana Heguaburu que me acolheu em sua casa durante minha estada em Montevidéu- (UY) para realização do trabalho.

A Amano e a Novozymes, pelo fornecimento das enzimas.

Aos amigos e parceiros do Laboratório de Biocatálise, (Damiani, Marcelo, Rosana, Isabel, Aline, Vanessa, Patrícia, Flávia, Cristiane, Simone, Kamila, André e Geovani), pelo carinho, amizade e bate-papos no laboratório.

Aos meu amigos conquistados durante a minha vida acadêmica, Sandro, Luciano Silva, Luciano “Gaúcho” Fernandes, Luka, Tula, Marcelo “Bigode” Quint, Paulo Taube, Cristian Soldi, Arlindo, Gilson pelos bate-papos químicos.

A todos os meus amigos.

Aos amigos conquistados na minha carreira acadêmica.

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

## RESUMO

Neste trabalho, foram utilizadas lipases em reações de epoxidação químico-enzimática de compostos que contêm ligações duplas carbono-carbono e carbono-nitrogênio. Foi estudada a epoxidação de terpenos ((-)-carvona,  $\square$ -cariofileno), cinamato de etila, derivados de ciclohexadienodienóis e a oxidação de uma série de N-benzilidenalquilaminas. Como biocatalisadores foram utilizadas as lipases de *Candida antarctica* (CALB), *Pseudomonas* sp. (LPS) e de *Rhizopus oryzae* (LRO). Foram investigados alguns parâmetros experimentais que influenciam nestas reações à temperatura ambiente (~25°C) ou à 30 °C. Em uma primeira etapa, foram avaliados o efeito do doador peróxido (uréia peróxido de hidrogênio e peróxido de hidrogênio aquoso) e da agitação na formação da (*E,Z*)-2-etilhexil-3-feniloxaziridinas (**118**, **119**). Os resultados mostraram que a conversão em produtos foi dependente do doador peróxido e da agitação (com a orbital-0-90%). Foi investigado o uso de solventes orgânicos, e a acetonitrila foi a mais eficiente obtendo-se os produtos **118,119** com 91% em 3 h. Com o uso de líquidos iônicos (LIs) derivados do 1-butil-3-metilimidazol no meio reacional, observou-se melhoras na seletividade e conversão aos produtos **118,119** tanto em função do tipo dos LIs bem como dos solventes orgânicos. A influência do doador acila foi avaliada em função do tipo e quantidade usada (0-6 mmols). Foram utilizados os ácidos propanóico (C3), malônico (C3), butanóico(C4), hexanóico (C6), benzóico (C6), octanóico (C8), decanóico (C10), láurico (C12), mirístico (C14) e palmítico (C16) e acetato de etila como doadores acila. Os resultados mostraram que as maiores conversões em (*E,Z*)-2-etilhexil-3-feniloxaziridinas foram com os ácidos de cadeias alquílicas maiores que seis carbonos (60-97%). Um comportamento similar foi observado para a epoxidação do cicloexeno. Grupos alquílicos ou arílicos ligados ao nitrogênio da imina alteraram a seletividade (razão *E/Z*) na formação das oxaziridinas, e grupos ligados ao anel aromático influenciaram na conversão aos produtos. Grupos mais volumosos ligados ao nitrogênio formaram preferencialmente o isômero *E*. Na oxidação da N-benziliden-*terc*-butilamina obteve-se 100% do isômero *E* (>99% em 3 h). A epoxidação regioselectiva do  $\square$ -cariofileno foi estudada em função do doador peróxido (UPH ou PHA). O uso de UPH favoreceu a formação do mono-epóxido, e com PHA obteve-se o di-epóxido com rendimentos de 83% e 79%, respectivamente. A epoxidação da (-)-carvona foi estudada usando a LPS imobilizada em diferentes suportes poliméricos. As maiores conversões em óxido de carvona foram de 62, 59% e 57% em 24h, ao utilizar a LPS imobilizada em filmes

de amidos de inhame, cará e de álcool polivinílico (PVA), respectivamente. A epoxidação químico-enzimática de cicloexadienodienóis formados a partir do bromo-benzeno e tolueno, foi eficiente obtendo-se os derivados epoxidados com conversões de 25-80% à temperatura ambiente. A epoxidação do cinamato de etila foi realizada em sistema bifásico (solvente orgânico: tampão fosfato em pH = 9,0 com a adição de bicarbonato de sódio), e o produto foi obtido com 21% em 96 h. Estudou-se também a oxidação da cicloexanona para a formação da correspondente lactona ( $\epsilon$ -caprolactona) *via* oxidação de Baeyer-Villiger usando dez metodologias diferentes. O método químico-enzimático foi eficiente obtendo-se a  $\epsilon$ -caprolactona com conversões de 36 à 68% em 24 h. Foram detectados a formação de outros compostos a partir de 24 h de reação, que provavelmente são provenientes da hidrólise e/ou acetilação enzimática da lactona. Os resultados obtidos mostraram que o método químico-enzimático é bastante eficiente quando comparado com as metodologias tradicionais, e que pode ser empregado na oxidação de diversos compostos orgânicos. A formação de subprodutos foi dependente do tipo do doador acila e dos peróxidos empregados. Outros fatores que influenciaram nestas reações são as procedências das lipases, meio reacional, pH e estruturas do doador acila e dos substratos.

**Palavras-chave:** lipases, oxaziridinas, epóxidos

## ABSTRACT

In this work, lipases were used in the chemo-enzymatic epoxidation reactions of compounds containing carbon-carbon and carbon-nitrogen double bonds. For these studies, the epoxidation of terpenes such as (-)-carvone and  $\beta$ -caryophyllene, cyclohexadienedienols derivatives and ethyl cinnamate was studied, as well as the oxidation of a series of N-benziliden-alkylamines. Lipases from *Candida antarctica* (CALB), *Pseudomonas* sp. (LPS) and *Rhizopus oryzae* (LRO) were used as biocatalysts. Some experimental parameters which influence these reactions at room temperature ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ) or at  $30^\circ\text{C}$  were investigated. Firstly, the effects of peroxide donors (urea hydrogen peroxide (UHP) and aqueous hydrogen peroxide (AHP)) and agitation in the formation of (*E,Z*)-2-phenyl-3-ethylhexyloxaziridines (**118,119**) were evaluated. The results showed that the conversion into products **118,119** was dependent on the peroxide donor and the agitation type (using orbital shaker, 0-90%). The use of organic solvents was investigated and acetonitrile showed to be the most efficient, forming the products **118,119** in 91% in 3 h. The use of 1-butyl-3-methylimidazolium-type ionic liquids (ILs) in the reaction medium, influenced on the conversion degrees and selectivity (*E/Z* ratio) of the formed products, and were dependent on the ILs-type and organic solvent. The influence of acyl donors was also evaluated according to their structure and amount (0-6.0 mmoles). Propanoic (C3), malonic (C3), butanoic acid (C4), hexanoic (C6), benzoic (C6), octanoic (C8), decanoic (C10), lauric (C12), myristic (C14) and palmitic acids (C16) and ethyl acetate were used as acyl donors. The results showed that the highest conversions degrees of (*E,Z*)-2-phenyl-3-ethylhexyloxaziridine were obtained using fatty acids with more than six carbons (60-97%). A similar behavior was observed for the epoxidation of cyclohexene. Alkyl or aryl groups linked to nitrogen of imine, influenced the isomer *E/Z* ratio on the formation of oxaziridines, and groups linked to the aromatic ring influenced on the conversion degrees. Bulky groups linked to nitrogen lead preferentially to the formation of *E*-isomer. The oxidation of N-benziliden-*tert*-butylamine formed 100% of the corresponding *E* isomer ( $> 99\%$  in 3 h). The regioselective epoxidation of  $\beta$ -caryophyllene was studied as a function of peroxide donor (UHP or AHP). The use of UHP only favoured the formation of the mono-epoxies and with AHP the di-epoxide was obtained, in 83% and 79% yields, respectively.

The epoxidation of (-)-carvone was studied using immobilized LPS in different polymeric materials. The highest conversion degrees into carvone oxide were of 62, 59 and 57% in 24h using LPS immobilized in starch films of cocoyam, yam and in poly-vinylalcohol (PVA), respectively. The epoxidation of cyclohexadienedienols derivatives of toluene and bromo-benzene was also studied. The chemo-enzymatic epoxidation was effective forming the corresponding products in 25-80% at r.t. The chemo-enzymatic methodology was also applied to the epoxidation of ethyl cinnamate, an  $\alpha,\beta$ -unsaturated compound. The reactions were performed in a two-phase system of organic solvent:phosphate buffer at pH = 9.0 with the addition of sodium bicarbonate. The product, ethyl cinnamate oxide, was obtained in 21% in 96 h. The oxidation of cyclohexanone to form the corresponding lactone ( $\epsilon$ -caprolactone) *via* Baeyer-Villiger oxidation, was also studied using ten different methodologies. The chemo-enzymatic method was effective forming the  $\epsilon$ -caprolactone with conversion degrees of 36 to 68% in 24 h. The formation of other products in 24 h of reaction was detected; probably they were derived from the enzymatic hydrolysis and/or lactone acetylation. The results herein obtained showed that the chemo-enzymatic method is very efficient when compared with traditional methodologies, and can be used in the oxidation of various organic compounds. The formation of sub-products was dependent on the acyl donor and peroxides. The lipases sources, reaction media, pH and acyl donors and substrates structures may also influence on these reactions.

Keywords: lipases, oxaziridines, epoxides

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> LIGAÇÃO DE AMINOÁCIDOS PARA A FORMAÇÃO DE UM PEPTÍDEO. <sup>8</sup> .....	35
<b>FIGURA 2.</b> REPRESENTAÇÕES GRÁFICAS DAS ESTRUTURAS (A) PRIMÁRIA, (B) SECUNDÁRIA, (C) TERCIÁRIA, E (D) QUATERNÁRIA DE UMA ENZIMA. <sup>10</sup> .....	35
<b>FIGURA 3.</b> EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO NA VELOCIDADE INICIAL DA REAÇÃO CATALISADA POR ENZIMAS. (A) GRÁFICO DA VELOCIDADE INICIAL VERSUS CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO. (B) RELAÇÃO DE LINEWEAVER-BURK. <sup>9</sup> .....	37
<b>FIGURA 4.</b> REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL E DA CAVIDADE DO SÍTIO ATIVO DA PEPSINA, PRESENTE NO SUCO PANCREÁTICO (ADAPTADO DE REF. 20).....	38
<b>FIGURA 5.</b> PUBLICAÇÕES ANUAIS ENVOLVENDO BIOTRANSFORMAÇÕES DE COMPOSTOS ORGÂNICOS. <sup>29</sup> .....	41
<b>FIGURA 6.</b> UTILIZAÇÃO RELATIVA DAS ENZIMAS EM BIOTRANSFORMAÇÕES. <sup>8,30</sup> ....	42
<b>FIGURA 7.</b> REPRESENTAÇÕES ESQUEMÁTICAS DA LIPASE PANCREÁTICA HUMANA POR (A) ESTRUTURA CONFORMACIONAL TRIDIMENSIONAL E (B) DENSIDADE ELETRÔNICA, OBTIDA POR CRISTALOGRAFIA DE RAIOS-X. <sup>52</sup> .....	44
<b>FIGURA 8.</b> RESOLUÇÃO CINÉTICA DE DERIVADOS DE 5,6-DIIDRO-1,10-FENANTROLINA (8) CATALISADAS PELA LPS EM ACETATO DE VINILA. ....	46
<b>FIGURA 9.</b> PRODUÇÃO DE BIODIESEL ATRAVÉS DE INTERESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA COM ACETATO DE METILA.....	47
<b>FIGURA 10.</b> ESTERIFICAÇÃO REGIOSSELETIVA DA HIDROCORTISONA <b>11</b> . <sup>57</sup> .....	47
<b>FIGURA 11.</b> APLICAÇÃO DA LCR NA SÍNTESE ENANTIOSELETIVA DE ÁCIDOS HOMOTARTÁRICOS ( <b>16</b> ).....	48
<b>FIGURA 12.</b> ROTAS SINTÉTICAS DE OBTENÇÃO DO <b>21</b> A PARTIR DA 4-ISOPROPILACETOFENONA ( <b>17</b> ). ....	48

<b>FIGURA 13.</b> PERIDRÓLISE DO FENILACETATO DE ETILA.....	49
<b>FIGURA 14.</b> PREPARAÇÃO ENZIMÁTICA DE PERÁCIDOS CATALISADOS PELA LIPASE CALB.....	49
<b>FIGURA 15.</b> ESTERIFICAÇÃO E EPOXIDAÇÃO SIMULTÂNEA DO ÁCIDO OLÉICO ( <b>26</b> ) PARA PRODUÇÃO DE EPOXIESTEARATOS DE ALQUILA ( <b>27</b> ) MEDIADA PELA CALB. <sup>65</sup> .....	50
<b>FIGURA 16.</b> REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE ALGUNS MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS. <sup>72</sup> .....	52
<b>FIGURA 17.</b> DIFERENTES MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE LACASES UTILIZANDO PEI COMO SUPORTE. <sup>73</sup> .....	53
<b>FIGURA 18.</b> MICROENCAPSULAMENTO DE ENZIMAS EM MULTI-CAMADAS.....	54
<b>FIGURA 19.</b> REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA PARA A IMOBILIZAÇÃO DE LCR EM MISTURAS DE POLÍMEROS PVA/PTFE. ....	55
<b>FIGURA 20.</b> BIOTRANSFORMAÇÃO DE NAFTALENO ( <b>28</b> ) CATALISADA PELA NDO EM SISTEMA BIFÁSICO ÁGUA/DODECANO. ....	56
<b>FIGURA 21.</b> ESTRUTURA GERAL DE ALGUNS LÍQUIDOS IÔNICOS BASEADOS NOS CÁTIONS DO ( <b>30</b> ) ALQUIL-PIRIDÍNIO, ( <b>31</b> ) DIALQUIL-IMIDAZÓLIO, ( <b>32</b> ) DIALQUIL-PIRROLIDÍNICO E ( <b>33</b> ) ALQUIL-NAFTILPIRIDÍNIO.....	56
<b>FIGURA 22.</b> HIDRÓLISE ENANTIOSELETIVA DE PALMITATOS DERIVADOS 1-HALO-2-OCTILA 34 E 35 EM LIS E EM T-BUTANOL. [LTL = LIPASE DE T. LANUGINOSUS, LRO = LIPASE DE R. ORYZAE, CALB = LIPASE DE C. ANTARCTICA]. ....	58
<b>FIGURA 23.</b> APLICAÇÃO DO [BMIm][PF <sub>6</sub> ] NA DESACETILAÇÃO REGIOSSELETIVA DE <b>41</b> .....	59
<b>FIGURA 24.</b> USOS DE PERÁCIDOS EM PROCESSOS DE SÍNTESE ORGÂNICA.....	60
<b>FIGURA 25.</b> PROCESSO INDUSTRIAL DE EPOXIDAÇÃO DO ETENO, POR OXIDAÇÃO CATALÍTICA. ....	61

<b>FIGURA 26.</b> REATIVIDADE RELATIVA DAS LIGAÇÕES DUPLAS FRENTE A OXIDAÇÃO COM PERÁCIDOS. ....	62
<b>FIGURA 27.</b> EPOXIDAÇÃO DE ESTIRENO ( <b>52</b> ), EM (A) TOLUENO E (B) ÉTER ETÍLICO.	63
<b>FIGURA 28.</b> EPOXIDAÇÃO NUCLEOFÍLICA CATALISADA POR M-CPBA EM MEIO ALCALINO. ....	63
<b>FIGURA 29.</b> REAÇÕES TÍPICAS CATALISADAS PELAS OXIGENASES: (A) HIDROXILAÇÃO POR MONOXIGENASE, (B) EPOXIDAÇÃO POR MONOXIGENASE, (C) OXIDAÇÃO DE BAEYER-VILLIGER, (D) DIOXIGENAÇÃO POR DIOXIGENASE. <sup>102</sup> .....	64
<b>FIGURA 30.</b> BIOCONVERSÃO DA CIS-JASMONA ( <b>57</b> ) EM (7S,8R)-EPOXIJASMONA (–)- <b>58</b> CATALISADA POR CÉLULAS DE <i>T. CUTANEUM</i> .....	65
<b>FIGURA 31.</b> EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DE DERIVADOS DE ESTIRENO UTILIZANDO ÁCIDOS QUIRAIS NA PRESENÇA DA LPS-G6 E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. <sup>96</sup> .....	66
<b>FIGURA 32.</b> UTILIZAÇÃO DE EPÓXIDOS NA PREPARAÇÃO DE OXAZINAS. ....	67
<b>FIGURA 33.</b> OXAZIRIDINAS USADAS COMO N,O-TRANSFERIDORES. ....	68
<b>FIGURA 34.</b> COMPOSTOS QUE PODEM SER PREPARADOS A PARTIR DE OXAZIRIDINAS. <sup>109</sup> .....	68
<b>FIGURA 35.</b> OXIDAÇÃO DE SULFETOS MEDIADA POR OXAZIRIDINAS. ....	69
<b>FIGURA 36.</b> PREPARAÇÃO DE ISOXAZOLIDINAS <b>74</b> .....	69
<b>FIGURA 37.</b> SÍNTESE DE OXAZIRIDINAS VIA TRICLORO-ACETONITRILA E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. ....	70
<b>FIGURA 38.</b> OXIDAÇÃO DE IMINAS COM OXONA ( <b>79</b> ). ....	70
<b>FIGURA 39.</b> CROMATOGRAMA DE UMA ALÍQUOTA DA REAÇÃO DE EPOXIDAÇÃO DO $\beta$ -CARIOFILENO EM 16H. [CONDIÇÕES REACIONAIS: DICLOROMETANO, (5ML), CALB (25 MG), UPH (5 MMOL), T.A., 16H, 150 RPM]. ....	78

<b>FIGURA 40.</b> APARELHO DE ELETROFORESE CAPILAR UTILIZADO NAS DETERMINAÇÕES DE PERÁCIDOS.....	79
<b>FIGURA 41.</b> PREPARAÇÃO DE PERÁCIDOS CATALISADA POR LIPASES.....	80
<b>FIGURA 42.</b> VARIAÇÃO DA ÁREA DO PICO DOS ÁCIDOS CARBOXÍLICOS NO ELETROFEROGRAMA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO (PPM) DOS ÁCIDOS (□) ACÉTICO, (●) PROPANÓICO, (▣) BUTANÓICO E (▢) HEXANÓICO OBTIDOS POR ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA. [ACETONITRILA (1: 9 v/v) TBS (20 MMOLL- PH 9,30, CTAB (0,2 MMOLL <sup>-1</sup> ), 50 MBAR, 5S, 30 KV, 25°C]. .....	82
<b>FIGURA 43.</b> PREPARAÇÃO DE N-ALQUILIMINAS DERIVADAS DE BENZALDEÍDOS AROMÁTICOS. ....	83
<b>FIGURA 44.</b> REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS SISTEMAS REACIONAIS SOB AGITAÇÃO (A) MAGNÉTICA, (B) TIPO DUBNOFF E (C) ORBITAL (TAMBÉM CHAMADA DE CIRCULAR).....	86
<b>FIGURA 45.</b> EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DA (-)-CARVONA.....	87
<b>FIGURA 46.</b> ESPECTRO DE RMN- <sup>1</sup> H, DE UMA ALÍQUOTA DA FASE ORGÂNICA DA REAÇÃO DE EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DO CICLOEXENO. [CICLOEXENO, (2 MMOL), CALB (50 MG), TOLUENO (10 ML), ÁCIDO OCTANÓICO (1 MMOL), PHA (2 MMOL), 30°C, 6 H, (CDCL <sub>3</sub> , 200 MHZ).] .....	88
<b>FIGURA 47.</b> PREPARAÇÃO DO CINAMATO DE ETILA E DO CORRESPONDENTE EPÓXIDO. ....	89
<b>FIGURA 48.</b> ESPECTRO DE RMN- <sup>1</sup> H, DE UMA ALÍQUOTA DA FASE ORGÂNICA DA REAÇÃO DE EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DO CINAMATO DE ETILA. [(1MMOL) DE <b>106</b> , CALB (150MG), TOLUENO (10 ML), PHA (10 MMOL), ÁCIDO OCTANÓICO (10 MMOL), 30°C, 96 H, (CDCL <sub>3</sub> , 400 MHZ).] .....	90
<b>FIGURA 49.</b> PREPARAÇÃO DE ▢-CAPROLACTONA ( <b>111</b> ) POR OXIDAÇÃO COM M-CPBA. ....	92

FIGURA 50. PREPARAÇÃO DO COMPOSTO <b>113</b> , COM PROTEÇÃO COM DMP. ....	95
<b>FIGURA 51.</b> EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DE <b>112</b> E <b>113</b> . [*CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DESCRITAS NO TEXTO].....	95
<b>FIGURA 52.</b> EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DE <b>116</b> PARA A OBTENÇÃO DE <b>117</b> . [0,4MMOL DE <b>116</b> , CALB (50 MG), ACETONITRILA (15 ML), UPH (0,5 MMOL), ÁCIDO OCTANÓICO (0,2 MMOL), 24H]. ....	97
<b>FIGURA 53.</b> FORMAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DE N-ALQUILOXAZIRIDINAS. ....	98
<b>FIGURA 54.</b> EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DA (-)-CARVONA ( <b>101</b> ). [ <b>101</b> (2,5 MMOL), CALB (50 MG), ACN (10 ML), UPH (5 MMOL), ÁC. OCTANÓICO (2,5 MMOL), 12 H, T.A., 150 RPM].....	115
<b>FIGURA 55.</b> EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DOS COMPOSTOS <b>144</b> E <b>146</b> . [ <b>144</b> E <b>146</b> (2,5 MMOL), CALB (50 MG), PHA (5 MMOL), ÁCIDO OCTANÓICO (10 MMOL), DCM, 24 H, 30°C].....	115
<b>FIGURA 56.</b> ELETROFEROGRAMA DE UMA ALÍQUOTA DA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DO ÁCIDO PERACÉTICO ( <b>149</b> ) PARTIR DO ÁCIDO ACÉTICO ( <b>148</b> ) PELO MÉTODO ENZIMÁTICO. [ <b>148</b> (2,5 MMOL), CALB (25 MG), UPH (5 MMOL), TBS (20 MMOL), CTAB (0,2 MMOL), PH = 9,3]. ....	118
<b>FIGURA 57.</b> CONVERSÃO EM ÁCIDO PERHEXANÓICO ( <b>151</b> ) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO UTILIZANDO A CALB. [ <b>151</b> (2,5 MMOL), CALB (25 MG) ACETONITRILA (10 ML), UPH (5 MMOL) T.A., 12 H, 150 RPM. ....	120
<b>FIGURA 58.</b> VARIAÇÃO DA CONVERSÃO EM EPÓXIDO (%) DO CICLOEXENO ( <b>104</b> ) EM FUNÇÃO DO DOADOR ACILA. [ <b>103</b> (2 MMOL), DOADOR ACILA (1 MMOL), CALB, LPS E LRO (25 MG), PHA (1 ML), 30°C, 24 H, TOLUENO]. ....	121
<b>FIGURA 59.</b> CROMATOGRAMA DE UM ALÍQUOTA DE REAÇÃO NA OXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DE <b>85</b> , OBTENDO OS PRODUTOS <i>E</i> E <i>Z</i> . [ <b>85</b> (0,4 MMOL), CALB (25 MG), ACETONITRILA, T.A., 2 H, 150 RPM]. CONDIÇÕES DE ANÁLISE DESCRITAS NA SEÇÃO 3.2. P. 46].....	124

- FIGURA 60.** ESPECTRO DE RMN-<sup>1</sup>H, DA (*E*)-2-ETILHEXIL-3-FENILOXAZIRIDINA (**118**), OBTIDA PELO MÉTODO QUÍMIO-ENZIMÁTICO, [CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz]. ..... 125
- FIGURA 61.** ESPECTRO DE RMN-<sup>1</sup>H, DA (*Z*)-2-ETILHEXIL-3-FENILOXAZIRIDINA (**119**), OBTIDA PELO MÉTODO QUÍMIO-ENZIMÁTICO, [CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz]. ..... 125
- FIGURA 63.** EFEITO DO TIPO DE AGITAÇÃO NA FORMAÇÃO DA (*E,Z*)-2-ETILHEXIL-3-FENILOXAZIRINA (**118-119**), (■) COM UPH, E (■) COM PHA. [ACN (5 ML), CALB (25 MG), T.A., 1 H]..... 126
- FIGURA 62.** EFEITO DO TIPO DE AGITAÇÃO NA FORMAÇÃO DE ÓXIDO DE CICLOEXENO (**104**), (■) COM UPH, E (■) COM PHA. [DCM (5 ML), CALB (25 MG), T.A., 1 H] ..... 126
- FIGURA 64.** VARIAÇÃO DA CONVERSÃO EM OXAZIRIDINAS (%) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO UTILIZANDO (▲) UPH E (●) PHA COMO DOADORES PERÓXIDOS. [**85** (0,4 MMOL), CALB (25 MG), UPH E PHA (2,0 MMOL), ÁCIDO OCTANÓICO (1 MMOL), ACN (5 ML), T.A., 3 H E 150 RPM]..... 127
- FIGURA 65.** (□) VARIAÇÃO DA CONVERSÃO (%) E DA (●) VELOC. FORMAÇÃO x10<sup>3</sup> (MMOL.MIN-1) DE OXAZIRIDINAS **118** E **119** EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE DA CALB (UNIDADES) COM UPH COMO DOADOR PERÓXIDO. [**85** (0,4 MMOL), ACETONITRILA, T.A., 3H E 150 RPM].128
- FIGURA 66.** VARIAÇÃO DA VELOCIDADE DE FORMAÇÃO DE OXAZIRIDINAS EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO OCTANÓICO USANDO UPH COMO DOADOR PERÓXIDO. CONDIÇÕES REACIONAIS ESTÃO DESCRITAS NA **TABELA 12**..... 131
- FIGURA 67.** EFEITO DA ADIÇÃO DE LI COMO CO-SOLVENTE NA OXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DA N-BENZILIDEN-2-ETILHEXILAMINA, (■) [BMIM][PF<sub>6</sub>] E (●) [BMIM][BF<sub>4</sub>]. [**85** (0,4 MMOL) CALB (25 MG), DICLOROMETANO, T.A., 3 H E 150 RPM] ..... 134
- FIGURA 68.** VARIAÇÃO DA CONVERSÃO EM OXAZIRIDINAS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO COM (A) LPS E (B) CALB EM (▼) DCM:LI 10% v/v, (▲)

DCM, (●) ACN:LI 10% v/v, (■) ACN. [85 (0,4 MMOL), LI = [BMIM][PF<sub>6</sub>], ÁCIDO OCTANÓICO (1 MMOL), UPH (0,4 MMOL), LIPASES (25 MG), SOLVENTE (9 ML), LI (1 ML), T.A., 150 RPM)... 136

**FIGURA 69.** INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE LIS NA FORMAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DE N-ALQUILOXAZIRIDINAS **118** E **119** USANDO A CALB. REAÇÕES EM (■) N-HEXANO, (■) ÉTER ETÍLICO, (■) ETANOL, (■) ACETONITRILA, E (■) DICLOROMETANO EM MISTURAS COM [BMIM][SCN], [BMIM][Cl], [BMIM][BF<sub>4</sub>] ..... 138

**FIGURA 70.** VARIAÇÃO DA CONVERSÃO (%) EM OXAZIRIDINAS EM FUNÇÃO DO TEMPO REACIONAL, UTILIZANDO OS SUBSTRATOS **85**, **94**, **95**, **96**, E **97**. [IMINAS (0,4 MMOL), ACN (5 ML), UPH (0,4 MMOL), ÁCIDO OCTANÓICO (1 MMOL), CALB (25 MG), DETERMINADO POR CG]. 141

**FIGURA 71.** EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DO  $\beta$ -CARIOFIENO (**110**) [110 (2,5 MMOL), CALB (50 MG), PHA (5 MMOL), ÁCIDO OCTANÓICO (1 MMOL), 4 H, T.A, 150 RPM]..... 149

**FIGURA 72.** EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DO **110** UTILIZANDO DOIS DIFERENTES DOADORES PERÓXIDOS. [101 (2,5 MMOL), CALB (50 MG), ÁCIDO OCTANÓICO (1 MMOL), 24 H, T.A, DCM. EM (A) UPH (5 MMOL) E (B) PHA (5 MMOL)]. ..... 149

**FIGURA 73.** ESPECTRO DE RMN-<sup>1</sup>H AMPLIADO DE 0,0-5,5 PPM DO **108**. [110 (2,5 MMOL), UPH (5 MMOL) CALB (50 MG), T.A., ACETONITRILA, 24 H. (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHZ)]..... 150

**FIGURA 74.** ESPECTRO DE RMN-<sup>1</sup>H AMPLIADO DE 0,0-3,25 PPM DO **109**. [110 (2,5 MMOL), PHA (5 MMOL), CALB (50 MG), T.A., ACETONITRILA, 24 H. (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHZ)]. ..... 151

**FIGURA 75.** EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DA (-)-CARVONA. [101 (2,5 MMOL), LPS IMOBILIZADA (50 MG), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, (10 ML), PHA E UPH (5 MMOL), ÁCIDO OCTANÓICO (2,5 MMOL), T.A., 150 RPM] ..... 152

**FIGURA 76.** VARIAÇÃO DA CONVERSÃO EM 102 (%) EM FUNÇÃO DO TEMPO, UTILIZANDO A LPS IMOBILIZADA EM (●) AI, (⊛) AC, (▲) CS, (◀) PVA, (◆) G, (▼) K10, (■) NA FORMA LIVRE E (▶) CALB COMO

BIOCATALISADORES. [101 (2,5 MMOL), UPH (5 MMOL), ÁCIDO OCTANÓICO (2,5 MMOL), DCM (10 ML), CALB E LPS (50 MG), 72 H, T.A. 150 RPM].	153
<b>FIGURA 77.</b> ESPECTRO DE RMN- <sup>1</sup> H DE <b>114</b> OBTIDO PELO MÉTODO QUÍMIO-ENZIMÁTICO. [113 (2,7 MMOL), CALB (50 MG), T.A., ACETONITRILA, 12 H, (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHZ).]	156
<b>FIGURA 78.</b> EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DE <b>110</b> . [(A) <b>116</b> (0,4 MMOL), CALB (50 MG), ACETATO DE ETILA (15 ML), UPH (0,5 MMOL), 24 H, T.A. 150 RPM – 65%. (B) <b>116</b> (0,4 MMOL), CALB (50 MG), ACETONITRILA (15 ML), UPH (0,5 MMOL), ÁCIDO OCTANÓICO (0,2 MMOL), 24 H, T.A. 150 RPM – 80%].	157
<b>FIGURA 79.</b> ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DE RMN- <sup>1</sup> H REFERENTES AOS HIDROGÊNIOS DA LIGAÇÃO DUPLA DO COMPOSTO <b>116</b> E DO ANEL OXIRANO <b>117</b> .	158
<b>FIGURA 80.</b> ESPECTRO DE RMN- <sup>1</sup> H DO <b>116</b> . (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHZ).	158
<b>FIGURA 81.</b> ESPECTRO DE RMN- <sup>1</sup> H DO <b>117</b> OBTIDO PELO MÉTODO QUÍMIO-ENZIMÁTICO. [116 (0,4 MMOL), CALB (50 MG), ACETATO DE ETILA (15 ML), UPH (0,5 MMOL), 24 H, T.A., (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHZ).]	159
<b>FIGURA 82.</b> POTENCIAIS DERIVADOS DE CICLOEXADIENODIENÓIS PARA SEREM USADOS EM REAÇÕES DE EPOXIDAÇÃO.	159
<b>FIGURA 83.</b> EPOXIDAÇÃO NUCLEOFÍLICA QUÍMIO-ENZIMÁTICA DO CINAMATO DE ETILA <b>106</b> . [(A) <b>106</b> (1 MMOL), CALB, LPS OU LRO (150 MG), PHA OU UPH (5 MMOL), SISTEMA BIFÁSICO (15 ML), ÁC. OCTANÓICO (1 MMOL). CONDIÇÕES REACIONAIS DESCRITAS NA TABELA 18.	160
<b>FIGURA 84.</b> ESPECTROS DE MASSAS DOS COMPOSTOS OBTIDOS A PARTIR DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DE BAEYER-VILLIGER QUÍMIO-ENZIMÁTICA DA CICLOEXANONA ( <b>110</b> ). [CALB, ACN, ACETATO DE ETILA PHA (30%), 48H.]	165
<b>FIGURA 85.</b> OXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DA 2-HEXANONA ( <b>157</b> ). [157 (1 MMOL), CALB (50 MG) (A) PHA (2 MMOL), ÁCIDO OCTANÓICO (1 MMOL), DCM (10 ML) N.D. (B) PHA (2 MMOL), ACETATO DE ETILA	

(10 mL), (C)PHA (2 MMOL), ÁCIDO OCTANÓICO (1 MMOL),  
DCM.(10 ML) N.D. (D) PHA ( 2 MMOL), ACETATO DE ETILA (10 ML) -  
12%, 7 DIAS.]..... 165

**FIGURA 86.** ESPECTRO DE MASSAS DO PRODUTO **158** OBTIDO NA REAÇÃO DE  
OXIDAÇÃO DE **157** PELO MÉTODO QUIMIO-ENZIMÁTICO. .... 166



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> CLASSES, SUBCLASSES E FUNÇÃO DAS ENZIMAS SEGUNDO A UIBBM. ...	39
<b>TABELA 2.</b> PREPARAÇÃO DE PERÁCIDOS CATALISADAS PELA CALB. <sup>(A)</sup> .....	50
<b>TABELA 3.</b> LIPASES UTILIZADAS NESTE TRABALHO. ....	76
<b>TABELA 4.</b> PARÂMETROS USADOS NAS ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA GASOSA. ..	77
<b>TABELA 5.</b> QUANTIDADES USADAS E CONDIÇÕES NECESSÁRIAS PARA A IMOBILIZAÇÃO DA LPS <sup>(A)</sup> EM DIFERENTES SUPORTES. ....	79
<b>TABELA 6.</b> DADOS ANALÍTICOS E ESPECTROSCÓPICOS DAS IMINAS <b>85-100</b> . ....	84
<b>TABELA 7.</b> CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS TESTADAS PARA A FORMAÇÃO DE <b>111</b> .....	93
<b>TABELA 8.</b> METODOLOGIAS QUÍMIO-ENZIMÁTICAS TESTADAS PARA A FORMAÇÃO DE $\beta$ -CAPROLACTONAS. ....	94
<b>TABELA 9.</b> CONVERSÃO (%) <sup>(A)</sup> EM PERÁCIDOS EM FUNÇÃO DO DOADOR ACILA. <sup>(B)</sup>	117
<b>TABELA 10.</b> CONVERSÃO DO ÁCIDO ACÉTICO EM ÁCIDO PERACÉTICO EM FUNÇÃO DA MASSA DA CALB. <sup>(A)</sup> .....	119
<b>TABELA 11.</b> CONVERSÃO (%) EM PERÁCIDOS POR ELETROFORESE CAPILAR. ....	119
<b>TABELA 12.</b> INFLUÊNCIA DO TAMANHO DA CADEIA ALQUÍLICA DO DOADOR ACILA NA FORMAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DAS OXAZIRIDINAS <b>118</b> E <b>119</b> . <sup>(A)</sup>	129
<b>TABELA 13.</b> EFEITO DO SOLVENTE E PROCEDÊNCIA DAS LIPASES NA FORMAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DAS N-OXAZIRIDINAS DERIVADAS DE <b>85</b> .....	132
<b>TABELA 14.</b> EFEITO DA ADIÇÃO DE [BMIM][X] <sup>(A)</sup> NA FORMAÇÃO DE (E)-2-N-BENZILIDEN-3-ETILHEXIL OXAZIRIDINA ( <b>118</b> ). ....	138
<b>TABELA 15.</b> OXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DE ALQUILIMINAS CATALISADA PELA CALB. <sup>(A)</sup> .....	142

<b>TABELA 16.</b> OXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DE ALQUILIMINAS DERIVADAS DA N-BENZILIDEN-2-ETILHEXILAMINA <b>85-93</b> CATALISADA PELA CALB. <sup>(A)</sup>	145
<b>TABELA 17.</b> OXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DE ALQUILIMINAS DERIVADAS DA N-BENZILIDEN-TERC-BUTILAMINA <b>97-100</b> CATALISADA PELA CALB. <sup>(A)</sup> .....	147
<b>TABELA 18.</b> EPOXIDAÇÃO DO CINAMATO DE ETILA EM DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS. <sup>(A)</sup> .....	161
<b>TABELA 19.</b> OXIDAÇÃO DE BAEYER-VILLIGER DA CICLOEXANONA EM DIFERENTES METODOLOGIAS. <sup>(A)</sup> .....	163

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

<b>ESQUEMA 1.</b> MECANISMO PROPOSTO PARA A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE UM ÉSTER. .....	45
<b>ESQUEMA 2.</b> OXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DE SISTEMAS INSATURADOS UTILIZANDO LIPASES. ....	114
<b>ESQUEMA 3.</b> FORMAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DE ( <i>E,Z</i> )-2-ETILHEXIL-3-FENIL OXAZIRIDINAS.....	123
<b>ESQUEMA 4.</b> AUTO-ISOMERIZAÇÃO DE UMA IMINA E POSTERIOR FORMAÇÃO DE OXAZIRIDINA. ....	143
<b>ESQUEMA 5.</b> AUTO-ISOMERIZAÇÃO DE OXAZIRIDINAS.....	144
<b>ESQUEMA 6.</b> MECANISMO DE OXIDAÇÃO DE IMINAS EM DUAS ETAPAS. ....	144
<b>ESQUEMA 7.</b> EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DE DERIVADOS DE CICLOEXADIENODIENÓIS. ....	155
<b>ESQUEMA 8.</b> MECANISMO DE EPOXIDAÇÃO NUCLEOFÍLICA. ....	162
<b>ESQUEMA 9.</b> OXIDAÇÃO DA CICLOEXANONA ( <b>110</b> ) SOB DIFERENTES METODOLOGIAS CONFORME JÁ DESCRITAS NA SEÇÃO 3.3.9. [(A) CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DESCRITAS NA TABELA 19. (B) CALB, EtOH, (C) CALB, EtOAc] .....	162



## SIGLAS E ABREVIATURAS

- % – percentual de conversão  
ADH – álcool desidrogenase  
ACN - acetonitrila  
Asp – ácido aspártico  
CALB – lipase de *Candida antarctica* B  
CCD – cromatografia de camada delgada  
CG – cromatografia gasosa  
CG- EM – cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas  
DCM - diclorometano  
DMP - dimetóxiopropanol  
DMSO – dimetilsulfóxido  
E - enantiosseletividade  
ee – excesso enantiomérico  
eq. – equivalente  
Glu – ácido glutâmico  
His – histidina  
IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry  
IV – infravermelho  
K – constante de equilíbrio  
KDa – quilo Daltons  
K<sub>M</sub> – constante de Michaelis-Menten  
LCC – lipase de *Candida cylindracea*  
LCR – lipase de *Candida rugosa*  
LCV - lipase de *Chromobacterium viscosum*  
LI – líquidos iônicos  
Log *P* - logaritmo do coeficiente de partição  
LPS – lipase de *Pseudomonas* sp  
LRO – lipase de *Rhizopus oryzae*  
LTL – lipase de *Thermomyces lanuginosus*  
MeOH - metanol  
*m*-CPBA – ácido *meta*-cloroperbenzóico  
M.M. – massa molar  
MTBE – éter metil terc-butílico  
n.d. - não houve detecção do produto  
NDO – naftaleno dioxigenase  
P<sub>eb</sub> – ponto de ebulição  
PEI – polietilenoimina  
PEO – poli(óxidoetileno)  
P<sub>f</sub> – ponto de fusão

pH - potencial hidrogeniônico  
PHA – peróxido de hidrogênio aquoso  
ppm – partes por milhão  
POS – poli(siloxana)  
PTFE politetraflúoretileno  
PVA – álcool polivinílico  
Rf – índice de retenção  
RMN – ressonância magnética nuclear  
RNA - ácido ribonucléico  
rpm – rotações por minuto  
Ser – serina  
sp. - espécie não determinada  
t.a. – temperatura ambiente  
t.r. – tempo de retenção  
THF – tetrahydrofurano  
TMS – tetrametilsilano  
UIBBM – União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular  
UHP – uréia peróxido de hidrogênio  
V<sub>máx</sub> – velocidade máxima  
v/v = volume/volume  
 $\alpha$  – alfa  
 $\beta$  - beta  
 $\rho$  – ro  
 $\sigma$  – sigma  
□□□□épsilon  
□□□□delta

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>33</b>
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	33
1.2. ENZIMAS E SUAS CARACTERÍSTICAS.....	34
1.3. CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS.....	38
1.4. APLICAÇÕES E USOS DE ENZIMAS. ....	40
1.5. LIPASES .....	43
1.6. APLICAÇÕES DE LIPASES .....	46
1.7. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS .....	51
1.8. APLICAÇÕES DE LÍQUIDOS IÔNICOS (LI) EM REAÇÕES BIOCATALISADAS.....	56
1.9. PERÓXI-ÁCIDOS.....	59
1.10. EPÓXIDOS .....	61
1.10.1. <i>Epoxidação por perácidos</i> .....	62
1.10.2. <i>Epoxidação catalisadas por enzimas</i> .....	64
1.10.3. <i>Epoxidação químio-enzimática de alcenos</i> . ....	65
1.11. OXAZIRIDINAS.....	67
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>73</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	73
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	73
2.2.1. <i>Preparação e caracterização dos perácidos</i> .....	73
2.2.2. <i>Preparação químio-enzimática de oxaziridinas, derivadas de Bases de Schiff</i> .....	73
2.2.3. <i>Preparação químio-enzimática de epóxidos e lactonas utilizando lipases de diferentes fontes, livres ou imobilizadas</i> .....	74
<b>3. EXPERIMENTAL.....</b>	<b>75</b>
3.1. REAGENTES, SOLVENTES E LIPASES UTILIZADAS.....	75
3.2. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	76
3.3. MÉTODOS EXPERIMENTAIS.....	79
3.3.1. <i>Imobilização da lipase de Pseudomonas sp. (LPS) em diferentes suportes</i> .....	79
3.3.2. <i>Determinação dos perácidos</i> .....	80
3.3.3. <i>Preparação e caracterização das iminas</i> .....	82
3.3.4. <i>Preparação de epóxidos e oxaziridinas pelo método químio-enzimático</i> .....	86
3.3.5. <i>Preparação do 2-metil-5-(2-metil-2-oxiranil) 2-cicloexen-1-ona (102)</i> .....	87
3.3.6. <i>Preparação do óxido de cicloexeno (104)</i> .....	88

3.3.7. Preparação do cinamato de etila (106) e do correspondente epóxido (107).....	89
3.3.8. Preparação químio-enzimática dos 4, 12, 12-trimetil-9-metileno-5-oxatriciclo[8.2.0.04,6] dodecano (108) e 4, 12, 12-trimetil-spiro [5-oxatriciclo [8.2.0.04,6] dodecano-9-2'-oxirano (109).....	91
3.3.9. Preparação da $\beta$ -caprolactona (111).....	92
3.3.10. Preparação de epóxidos derivados de cicloexadienodienóis (114 e 117).....	94
3.3.11. Preparação da N-alquiloxaziridinas derivadas de N-benzilidenalquilaminas. ....	98
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>113</b>
4.1. BREVE HISTÓRICO.....	113
4.2. FORMAÇÃO DE PERÁCIDOS POR MÉTODO ENZIMÁTICO E DETERMINAÇÃO POR TITULAÇÃO IODOMÉTRICA E ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA. ....	116
4.3. PREPARAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DE N-ALQUILOXAZIRIDINAS. ....	122
4.3.1. Influência do doador acila na formação de N-alquiloxaziridinas .....	129
4.3.2. Efeito do solvente e do biocatalisador na formação das N-alquiloxaziridinas.....	131
4.3.3. Influência da adição de diferentes líquidos iônicos (LIs) como co-solventes.....	133
4.3.4. Influência de grupos substituintes na conversão e seletividade em N-alquiloxaziridinas. ....	141
4.3.4.1. Influência de grupos ligados ao nitrogênio imínico. ....	141
4.3.4.2. Influência de grupos ligados ao anel aromático do benzaldeído. ....	145
4.4. EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DO $\beta$ -CARIOFILENO (110) .....	148
4.5. EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DA (-)-CARVONA (101). ....	152
4.6. EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DE DERIVADOS DE CICLOEXADIENODIENÓIS. ....	154
4.7. EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DO (E)-CINAMATO DE ETILA .....	160
4.8. OXIDAÇÃO DE BAEYER-VILLIGER UTILIZANDO A CALB .....	162
<b>5. CONCLUSÕES FINAIS .....</b>	<b>167</b>
<b>6. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>171</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>173</b>
<b>ANEXO A – RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C E IV DOS COMPOSTOS 118-133 .....</b>	<b>183</b>
<b>ANEXO B – PRODUÇÃO CIENTÍFICA 2006 - 2010 .....</b>	<b>211</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os pesquisadores, em particular os químicos, sempre foram movidos pelos desafios em laboratório; desde pequenos processos até grandes análises, têm se tornado uma constante no desenvolvimento de inúmeros trabalhos. Deste modo, a química constitui uma ciência de caráter multidisciplinar.<sup>1</sup>

Um dos objetivos que levou a um estudo aprofundado sobre determinados temas é a otimização de processos, sejam eles de fins sintéticos e/ou analíticos, objetivando sempre a maximização da eficiência e a conseqüente diminuição dos custos e poluição. Portanto, estes são desafios constantes para as mais variadas linhas de pesquisa.<sup>1,2</sup>

A química aliada à bioquímica fez “nascer uma área” que aumenta cada vez mais o interesse de pesquisadores do Brasil e que é a Biocatálise.<sup>2</sup>

Essa nova área usa microrganismos, ou enzimas isoladas, como catalisadores, em diferentes reações orgânicas. Muitas vezes a sua eficiência é comparada com os catalisadores convencionais.<sup>3,4</sup>

Portanto, surgem a cada ano novos desafios, tais como desenvolver biocatalisadores para cada processo, elucidar as estruturas dessas enzimas a fim de se determinar o mecanismo de atuação, a otimização dos processos e/ou catalogação de reações que são biocatalisadas.<sup>5</sup>

A biocatálise também vem tendo determinado destaque na indústria químico-farmacêutica, devido aos mais variados tipos de reações que as enzimas catalisam com uma eficiência extraordinária em comparação com os catalisadores convencionais.<sup>6</sup> Muitas pesquisas têm sido realizadas nesta área com o intuito de se encontrar métodos eficientes, de menor custo e que proporcionem a manutenção da integridade da enzima durante o processo, considerando que podem ser desnaturadas por solventes orgânicos, meio no qual é realizada a grande maioria das reações orgânica.<sup>3</sup>

A grande vantagem da utilização desses biocatalisadores se encontra nas condições suaves e seletivas nas quais as reações são realizadas, sendo estas bastante importantes 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.<sup>7,8</sup>

Apesar das inúmeras vantagens aqui destacadas, o uso para aplicações industriais ainda é um pouco limitado devido ao elevado custo de

alguns biocatalisadores, à instabilidade destes nas condições operacionais requeridas (elevadas temperaturas e agitação) e/ou na dificuldade de separação do mesmo dos substratos e produtos.<sup>7,8</sup>

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 testes de novos meios reacionais alternativos, que possibilite o uso de enzimas em processos de síntese é também de grande interesse. A versatilidade destes biocatalisadores tem sido recentemente explorada em síntese orgânica. Neste trabalho será explorado o uso e aplicações de lipases em reações de oxidação de compostos que contém as ligações C=C e C=N.

## 1.2. ENZIMAS E SUAS CARACTERÍSTICAS

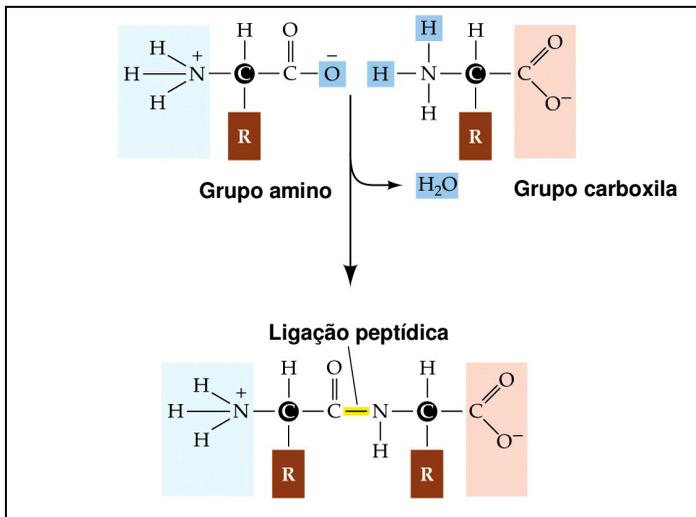
Enzimas são, em geral, biocatalisadores de origem protéica, com exceção de algumas moléculas de RNA, que são chamadas de ribozimas.<sup>8</sup>

As enzimas produzidas pelos organismos vivos possuem funções catalíticas em inúmeras reações biológicas.<sup>8,9</sup> Como outras proteínas, são formadas por uma longa cadeia de aminoácidos, em média de 300 aminoácidos), ligados através de ligações peptídicas. (**Figura 1**)

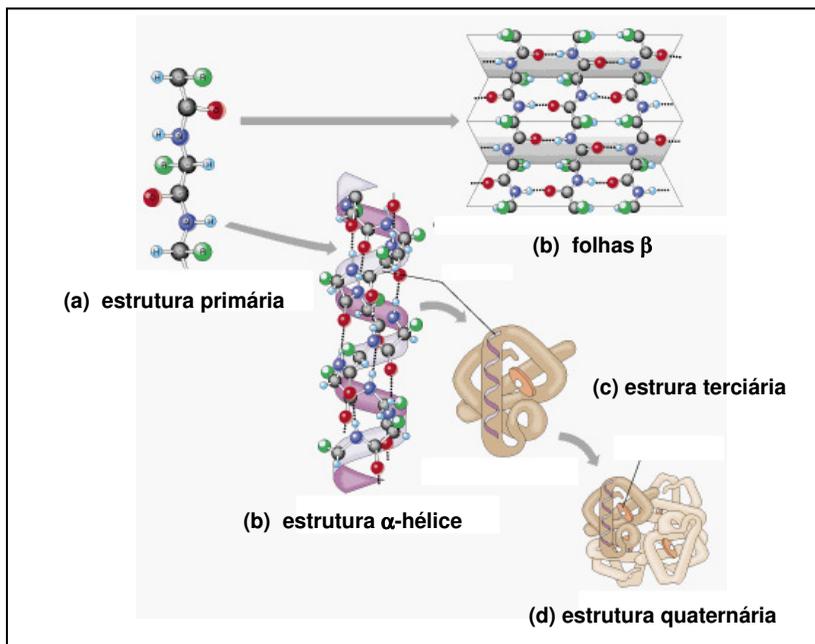
Em uma enzima, a seqüência exata de aminoácidos da cadeia protéica é chamada estrutura primária. A conformação tridimensional dessa seqüência é denominada estrutura secundária (**Figuras 2a e 2b**), a disposição espacial destas estruturas e suas interações intermoleculares são denominadas de estrutura terciária e quaternária, respectivamente. (**Figuras 2c e 2d**).<sup>9,10</sup>

---

\* As ribozimas foram descobertas em 1989 por Thomas Cech e Sidney Altman, o qual lhes rendeu o prêmio Nobel no mesmo ano.



**Figura 1.** Ligação de aminoácidos para a formação de um peptídeo.<sup>8</sup>



**Figura 2.** Representações gráficas das estruturas (a) primária, (b) secundária, (c) terciária, e (d) quaternária de uma enzima.<sup>10</sup>

Muitos processos no metabolismo em seres vivos são catalisados por enzimas constituindo a base das reações complexas e variadas que caracterizam os fenômenos vitais. Elas estão encontradas em todas as células vivas, e tem o papel do controle destas funções.<sup>11</sup>

Uma idéia que existia há muito tempo é de que as enzimas seriam catalisadores altamente específicos e que atuavam somente em um único tipo de substrato, caracterizando a quimiosseletividade.<sup>12</sup> Porém, atualmente, já existem relatados na literatura inúmeros trabalhos que demonstram as aplicações das enzimas nas mais variadas classes de reações.<sup>12-15</sup>

A especificidade é de extrema importância, pois diversos processos no metabolismo animal são controlados pelas enzimas e estes se realizam em condições favoráveis para o indivíduo sem liberação brusca de energia, em um meio de pH e concentração salina praticamente constantes.<sup>8,9</sup>

Uma reação catalisada por enzima apresenta, em geral, um aumento na velocidade de até  $10^{23}$  vezes quando comparada com as não catalisadas.<sup>8,15</sup>

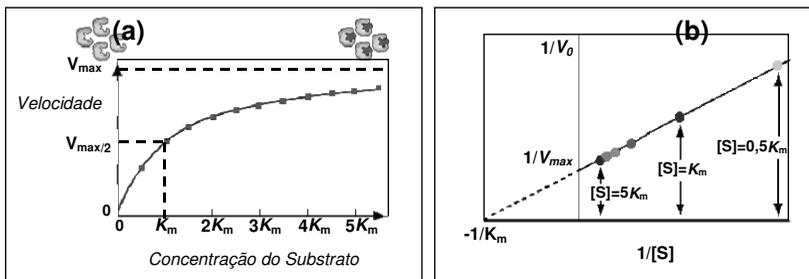
As enzimas utilizam de vários mecanismos para catalisar a conversão do substrato ao produto. Os mais comuns são a aproximação, catálise covalente, catálise ácido/base, catálise eletrostática, dessolvatação e torção. Todos os mecanismos atuam na estabilização da energia do estado de transição ou na desestabilização do estado fundamental.<sup>8,9</sup>

As enzimas aumentam a velocidade de determinadas reações no interior das células. Como nas diversas células se realizam inúmeras reações, deduz-se que existam milhares de enzimas. Esta atividade catalítica varia com diversos fatores, sendo o mais importante a própria concentração do substrato.<sup>9</sup>

A atividade da enzima aumenta com a concentração do substrato - [S] - até uma concentração de saturação, a partir da qual a velocidade da reação é máxima ( $V_{\text{máx}}$ ). A maioria das enzimas mostra o efeito de saturação, porém este varia amplamente em relação ao substrato [S] necessária para produzi-lo.<sup>9</sup>

O gráfico da velocidade da reação catalisada por enzimas *versus* concentração de substrato é uma hipérbole para as que obedecem à lei de Michaelis-Menten e permite determinar a concentração de substrato correspondente à metade de  $V_{\text{máx}}$ , denominada  $K_M$  (constante de Michaelis-Menten). Esta constante expressa a afinidade da enzima pelo substrato, ou seja, quanto menor o valor de  $K_M$  maior a afinidade da enzima pelo substrato. O gráfico do inverso da velocidade inicial em

função de  $1/[S]$  lineariza a curva, facilitando a determinação de  $K_M$  (relação de Lineweaver-Burk).<sup>9</sup> (Figura 3)



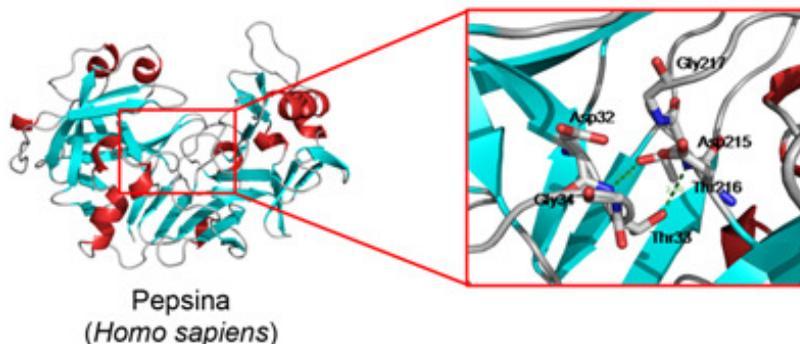
**Figura 3.** Efeito da concentração do substrato na velocidade inicial da reação catalisada por enzimas. (a) Gráfico da velocidade inicial versus concentração de substrato. (b) Relação de Lineweaver-Burk.<sup>9</sup>

As enzimas possuem especificidade na catálise de algumas reações devido ao formato tridimensional do sítio catalítico, e somente atuam em moléculas com configurações bastante precisas.<sup>16-19</sup>

Essa habilidade enantiosseletiva das enzimas pode estar diretamente relacionada a configuração L dos aminoácidos, o qual confere formas tridimensionais específicas que proporcionam o encaixe adequado dos substratos. Por exemplo, só reagem com aminoácidos que tem seu carbono  $\alpha$  assimétrico com configuração L, e não revelam atividade sobre formas idênticas desses aminoácidos que apresentam configuração do tipo D.<sup>9</sup>

A **Figura 4** mostra a representação gráfica da estrutura tridimensional obtida por cristalografia de Raios-X da pepsina que é uma enzima encontrada no suco gástrico dos seres humanos. Destaca-se a região do sítio ativo, responsável pela catálise.<sup>20</sup>

No item abaixo estão demonstradas as classes as quais as enzimas pertencem de acordo com a reação que catalisam.



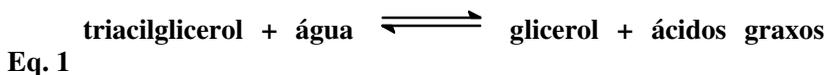
**Figura 4.** Representação gráfica da estrutura tridimensional e da cavidade do sítio ativo da pepsina, presente no suco pancreático (adaptado de Ref. 20).

### 1.3. CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS

As enzimas são divididas em seis classes principais, segundo a *Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (UIBBM – União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular), nas quais estão incluídas subclasses de acordo com o tipo de reação catalisada.<sup>21</sup> Por este sistema, cada enzima é designada por:

- um **nome recomendado**, pequeno e apropriado para o uso diário;
- um **nome sistemático**, que identifica a reação catalisada;
- um **número de classificação**, usado quando é necessária uma identificação mais precisa.

O nome recomendado (que é o normalmente usado) para a enzima que realiza a reação mostrada na **Equação 1** é **lipase**, e o nome sistemático baseado na reação catalisada, é **triacilglicerol acilidrolase**.



Seu número de classificação é **EC 3.1.1.3**, onde:

- **EC** representa Enzyme Commission da IUBMB,
- o primeiro dígito, **3**, a classe (*hidrolase*),
- o segundo dígito, **1**, a subclasse (*esterase*),
- o terceiro dígito, **1**, a sub-subclasse (*éster carboxílico hidrolase*),

- o quarto dígito, 3, designa uma *triacilglicerol lipase*.

A seguir, na **Tabela 1** estão apresentados as classes, sub-classes, e função de algumas enzimas segundo a UIBBM.<sup>8</sup>

**Tabela 1.** Classes, subclasses e função das enzimas segundo a UIBBM.

<b>1</b>	<b><i>Oxido-redutases</i> (reações de oxidação-redução ou transferência de elétrons)</b>
l.1	atuam em grupos CH-OH
l.2	atuam em grupos aldeído
l.3	atuam em grupos CH-CH
l.4	atuam em grupos CH-NH <sub>2</sub>
<b>2</b>	<b><i>Transferases</i> (transferem grupos funcionais como amina, fosfato, acil, carboxil)</b>
2.1	transferem grupos com um carbono
2.2	transferem grupos aldeído ou cetona
2.3	aciltransferases
2.4	glicosiltransferases
<b>3</b>	<b><i>Hidrolases</i> (reações de hidrólise de ligação covalente)</b>
3.1	atuam em ligações de ésteres
3.2	glicosilases
3.3	atuam em ligações de éteres
3.4	peptidases
<b>4</b>	<b><i>Liases</i> (catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico)</b>
4.1	atuam em ligações carbono-carbono
4.2	atuam em ligações carbono-oxigênio
4.3	atuam em ligações carbono-nitrogênio
4.4	atuam em ligações carbono-enxôfre

<b>5</b>	<b><i>Isomerases</i> (reações de interconversão entre isômeros óticos ou geométricos)</b>
5.1	racemases
5.2	<i>cis- e trans</i> -isomerases
5.3	isomerases intramolecular
5.4	transferases intramolecular (mutases)
<b>6</b>	<b><i>Ligases</i> (catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas pré-existentes, sempre com consumo de energia)</b>
6.1	formam ligações C-O
6.2	formam ligações C-S
6.3	formam ligações C-N
6.4	formam ligações C-C

#### 1.4. APLICAÇÕES E USOS DE ENZIMAS.

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.<sup>8,9</sup>

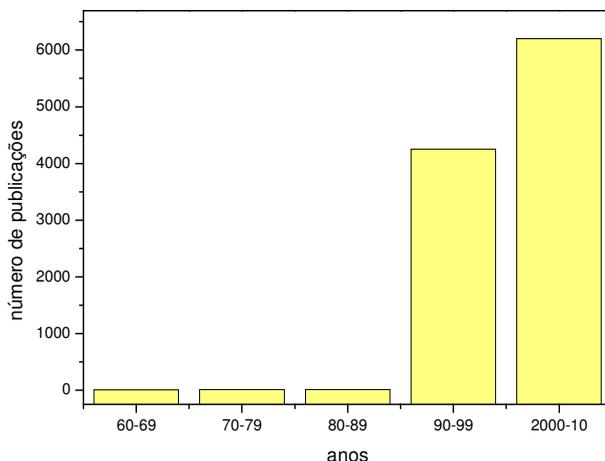
As biotransformações estão sendo utilizadas como um método para gerar compostos opticamente puros.<sup>22</sup> O uso desses catalisadores – enzimas – nas transformações de compostos orgânicos vêm desde o século passado, sendo que mudou dessa época até os dias atuais foi o objeto de pesquisa.<sup>23</sup>

Até o início da década de 80, muitos estudos estavam relacionados à elucidação de estruturas e mecanismos enzimáticos.<sup>23</sup>

A partir de meados dos anos 80, com o desenvolvimento bastante acentuado da microbiologia no que se refere à produção e isolamento de enzimas, é que se passou a estudar o potencial do emprego desses biocatalisadores em processos de síntese orgânica, com o intuito de se reduzir a formação de compostos indesejáveis, e também usar condições reacionais mais brandas, contribuindo para o que é chamado atualmente de “Química Verde”.<sup>24-25</sup>

Na **Figura 5**, está sendo demonstrado o número de trabalhos publicados ao longo das últimas décadas, a partir dos anos 60. Em conse-

quência desta pesquisa e interesse crescente, as enzimas tem ocupado um lugar importante na síntese orgânica contemporânea.<sup>26-28</sup> Este fato pode ser observado pelo número de publicações que vêm aumentando a cada década e que continua crescendo até hoje.<sup>29</sup>



**Figura 5.** Publicações anuais envolvendo biotransformações de compostos orgânicos.<sup>29</sup>

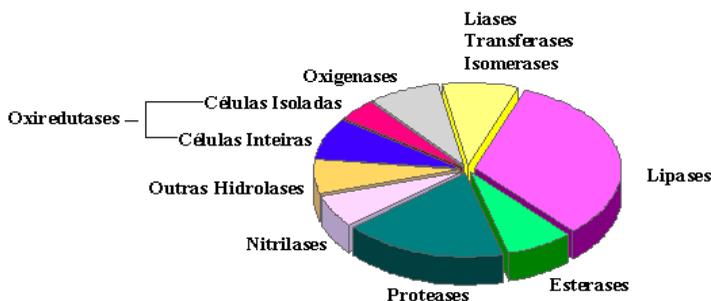
O fato deste crescimento no número de publicações ao longo dos anos se deve à descoberta e isolamento de novos biocatalisadores, juntamente com a aplicação destes na área farmacêutica, alimentícia e de engenharia de materiais.

De acordo com Faber<sup>30</sup> e Loughlin<sup>31</sup> e outros autores<sup>32-34</sup> o uso de enzimas possui certas vantagens em reações de síntese orgânica. Estas incluem:

- ⇒ são catalisadores de alta eficiência – as velocidades de reação pelo método enzimático são maiores se comparadas a catálise química;
- ⇒ em geral, as enzimas são amplamente conhecidas por atuarem sob condições suaves de temperatura (20 – 40 °C); mas sabe-se que muitos microrganismos catalisam reações em condições extremas (temperatura, pressão e acidez diferentes dos padrões conhecidos como “naturais de sobrevivência”), os chamados extremófilos.<sup>35-37</sup>
- ⇒ são quimiosseletivas – podem atuar em somente um tipo de grupo funcional mesmo na presença de outros grupos reativos na molécula;

- ⇒ são regio e diastereosseletivas – as enzimas podem distinguir entre grupos funcionais de acordo com a mudança do meio reacional;<sup>38</sup>
- ⇒ são enantiosseletivas – são catalisadores quirais e sua especificidade pode ser explorada para sínteses seletivas e assimétricas;
- ⇒ não são restritas aos seus substratos naturais (versatilidade catalítica),<sup>39</sup>
- ⇒ catalisam reações em meios não aquosos (ou aquo-restritos), embora as vezes, se observe perda de atividade.<sup>8, 30</sup>

As enzimas hidrolíticas (proteases, celulases, amilases e lipases) são as mais frequentemente 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 e facilidade no uso e aplicação.<sup>8</sup> (Figura 6).



**Figura 6.** Utilização relativa das enzimas em biotransformações.<sup>8, 30</sup>

Com o desenvolvimento de metodologias mais limpas e de baixo custo, as enzimas tornaram-se indispensáveis para a produção de muitos compostos.

A exploração da biodiversidade na busca de novos catalisadores por técnicas de seleção de microrganismos, de plantas ou de células animais representam os métodos tradicionais de descobertas de novas enzimas para o desenvolvimento da biocatálise em escala industrial.<sup>40</sup>

Neste caso, os microrganismos são de particular interesse devido ao curto período de geração, grande diversidade de processos metabólicos e enzimas envolvidas e não há um número limitado de microrganismos na natureza que possam ser testados, os quais são bastante diferentes entre si. Microrganismos isolados em território brasileiro têm de-

monstrado excelente potencial biocatalisador frente a diferentes substratos orgânicos de interesse.<sup>41</sup>

Zanotto *et al.* avaliaram 212 fungos isolados de plantas da região Amazônica para aplicação em biocatálise como fornecedores de lipases. Cerca de 90% dos fungos apresentaram atividade hidrolítica frente à hidrólise da tributirina e nove desses fungos apresentam bons desempenhos de enantiosseletividade na resolução do (*R,S*)-2-octanol. Utilizando o fungo UEA\_115 obteve-se conversão >90% e *ee<sub>p</sub>* de 99%. Com este estudo foi possível demonstrar o grande potencial dos fungos amazônicos como fontes de lipases para a biocatálise.<sup>41</sup>

Dentre as aplicações de microrganismos e/ou enzimas isoladas, em especial, as lipases, pode-se destacar a hidrólise de óleos marinhos<sup>42</sup>, síntese de ésteres de ácidos graxos poliinsaturados,<sup>43</sup> ésteres de aroma<sup>44</sup> e resolução de alcoóis<sup>45</sup>. Devido à extensa aplicação de lipases e por sua versatilidade catalítica, o interesse por esse biocatalisador tem crescido bastante nos últimos anos.

No próximo item será demonstrada a definição e as mais recentes aplicações de lipases.

## 1.5. LIPASES

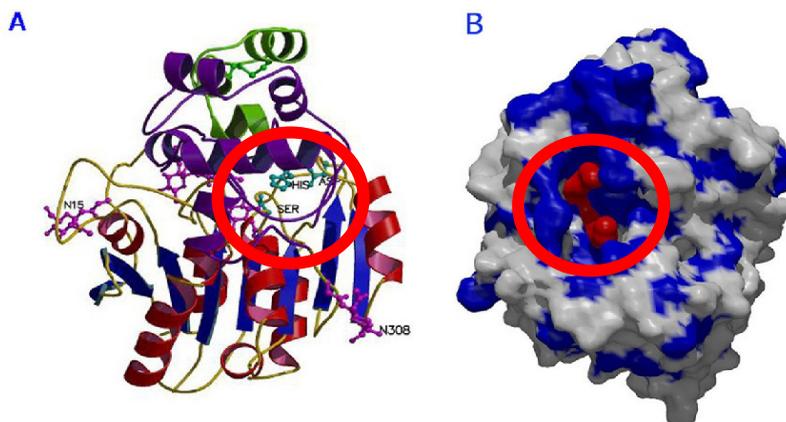
As lipases (3.1.1.3.triacilglicerol hidrolases) são enzimas hidrolíticas presentes em diversos organismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias.<sup>8,9,30</sup> Possuem massa molar em torno de 40 a 50 Kda, com mais ou menos 300 resíduos de aminoácidos. São conhecidas por catalisarem em seu meio natural, a hidrólise de ésteres, especificamente triacilgliceróis em ácidos graxos livres, di e monoacilglicerol e glicerol.<sup>46,47</sup> Possuem também a função de catalisar a reação inversa executando esterificações, transesterificações (acidólise, interesterificação, alcoólise), aminólise e tiotransesterificação em solvente orgânico anidro, em sistema bifásico ou em solução micelar com alta especificidade.<sup>8,47</sup>

As lipases são enzimas extracelulares produzidas por fungos tais como *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum* sp, *Bacillus megaterium*, *Metarhizium anisopliae*, *Penicillium wortmanii* e por leveduras como *Tulopsis* sp e *Candida* sp. Algumas bactérias que produzem lipases são *Pseudomonas* sp, *Achromobacter* sp e *Staphylococcus* sp.<sup>48</sup> Destes organismos, as lipases de *Aspergillus* sp, *Mucor* sp, *Rhizopus* sp e *Candida* sp entre outras já estão disponíveis comercialmente.<sup>49,50</sup>

Os vegetais também têm sido amplamente estudados como fontes de lipases, como por exemplo, extratos de látex de *Carica papaya* e das

folhas de *Ananas comosus*. Estes extratos podem ser utilizados em escala industrial para síntese de um similar ao Salatrim, que é um triacilglicerol estrutural de baixa caloria obtido a partir de interesterificação de óleo de soja hidrogenado (12% de C16 e 88% de C18) e tributirina. O interessante nesses triacilgliceróis estruturais é o fato de conterem apenas 5 cal.g<sup>-1</sup> contra 9 cal.g<sup>-1</sup> encontradas nas gorduras naturais. A razão entre os dois triglicerídios formados em 24 h de reação foi de 3/2. Neste processo de síntese, a reutilização do biocatalisador foi feita até oito vezes, com uma perda de atividade máxima de 50%.<sup>51</sup>

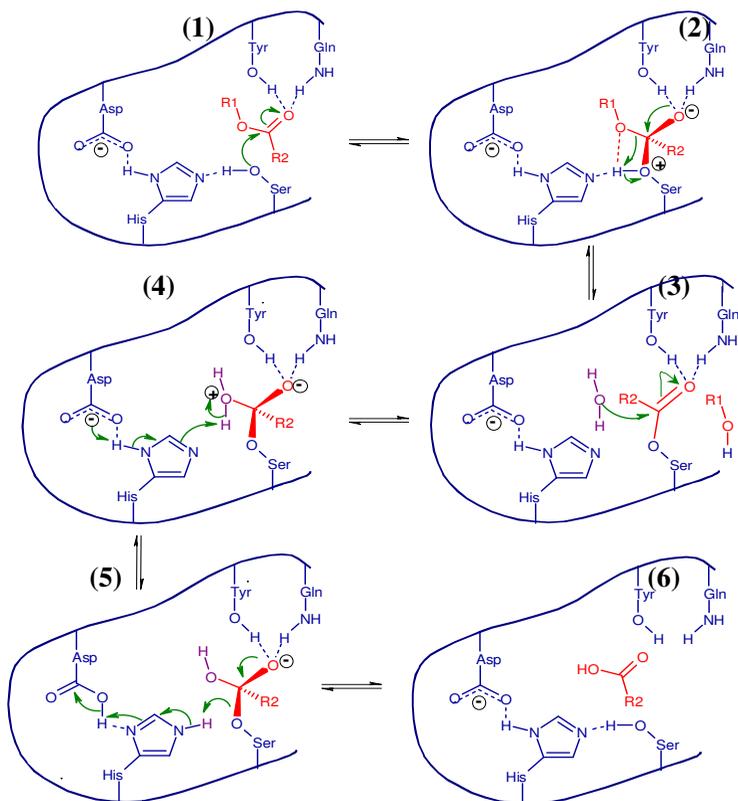
As lipases cujas estruturas foram elucidadas são membros da família  $\alpha$ - $\beta$ -hidrolases e possuem uma tríade catalítica constituída dos resíduos de aminoácidos serina, histidina e ácido aspártico ou glutâmico. (Ser-His-Asp/Glu)<sup>8,9</sup> A **Figura 7** mostra a representação gráfica da estrutura tridimensional obtida por cristalografia de raio X da lipase pancreática humana. Em destaque, são mostrados os resíduos de aminoácidos que formam o sítio ativo da enzima e que é constituído pelos resíduos dos aminoácidos de serina, histidina e aspartato.<sup>52</sup>



**Figura 7.** Representações esquemáticas da lipase pancreática humana por (A) estrutura conformacional tridimensional e (B) densidade eletrônica, obtida por cristalografia de raios-X.<sup>52</sup>

Todos os membros da família de estrutura  $\alpha$ - $\beta$ -hidrolase possuem um mecanismo comum de hidrólise de ésteres, que consiste em seis etapas: ligação ao substrato éster (1); formação do primeiro intermediário tetraédrico por ataque nucleofílico da serina catalítica com o oxânion estabilizado por duas ou três ligações de hidrogênio (2); hidrólise e saída da porção alcoólica (3), estabilização do segundo intermediário (4)

e regeneração do sítio ativo e formação do produto (5) e (6). Estas etapas estão demonstradas no **Esquema 1**.<sup>53</sup>



**Esquema 1.** Mecanismo proposto para a hidrólise enzimática de um éster.

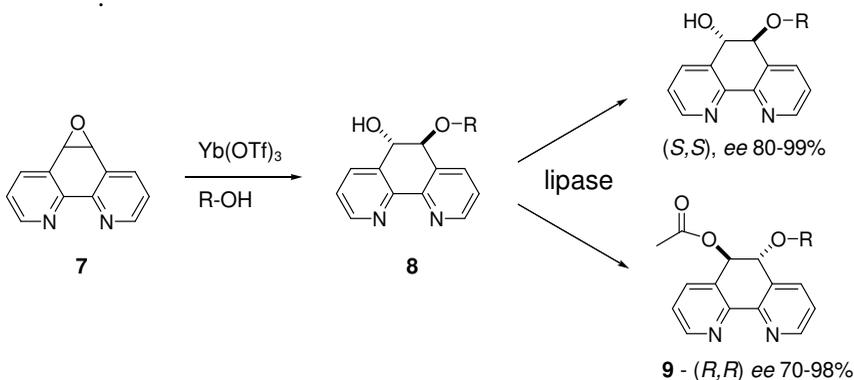
No período de 2000-2010 foram publicados cerca de 2900 trabalhos, sendo que somente nos últimos dois anos, foram 920 trabalhos relatando o uso de lipases em processos químicos e industriais.<sup>54</sup>

Estes dados demonstram o grande interesse e a versatilidade do uso desses catalisadores em inúmeras áreas, os quais serão exemplificados a seguir.

## 1.6. APLICAÇÕES DE LIPASES

As lipases são amplamente usadas na resolução de misturas racêmicas, isto é, possuem a habilidade de serem cataliticamente ativas em relação a somente um dos enantiômeros.

Schoffers *et al.* prepararam derivados de 5,6-diidro-1,10-fenantrolina (**8**) catalisados por triflato de itérbio por alcoólise do epóxido correspondente **7**. Em seguida, o composto **8**, racêmico foi esterificado de forma enantiosseletiva com a lipase de *Burkholderia cepacia* (LPS), obtendo excesso enantiomérico de 98% do composto **9**, conforme apresentado na **Figura 8**.<sup>55</sup>

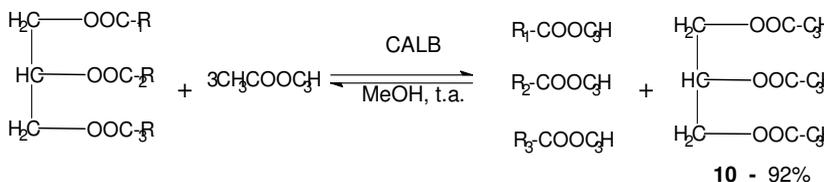


**Figura 8.** Resolução cinética de derivados de 5,6-diidro-1,10-fenantrolina (**8**) catalisadas pela LPS em acetato de vinila.

Neste caso, a LPS, foi o biocatalisador mais eficiente obtendo o produto **9** com *ee* de 70-98% e enantiosseletividade (*E*) superior a 200.

As lipases também apresentam a capacidade de preservar sua atividade catalítica em solventes orgânicos. Devido a esta propriedade, seu potencial para conversão de gorduras e óleos em produtos para usos industriais tem sido amplamente investigado.<sup>56</sup>

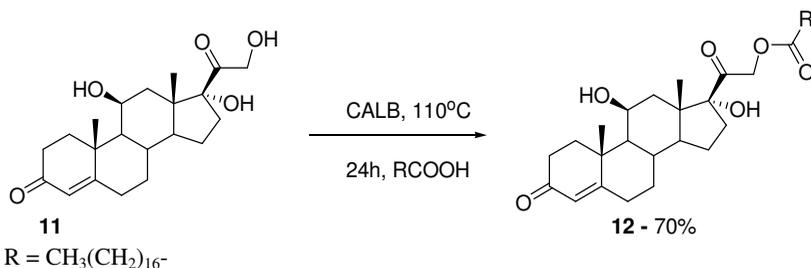
Du *et al.* utilizaram a lipase de *Candida antarctica* (CALB) na obtenção de biodiesel à partir do óleo de soja, acetato de metila e metanol como solvente, obtendo-se conversões de 92% em éster metílico **10**. O processo é de interesse pois o biocatalisador foi reutilizado em até 100 vezes sem diminuição na conversão em éster.<sup>57</sup> (**Figura 9**)



**Figura 9.** Produção de biodiesel através de interesterificação do óleo de soja com acetato de metila.

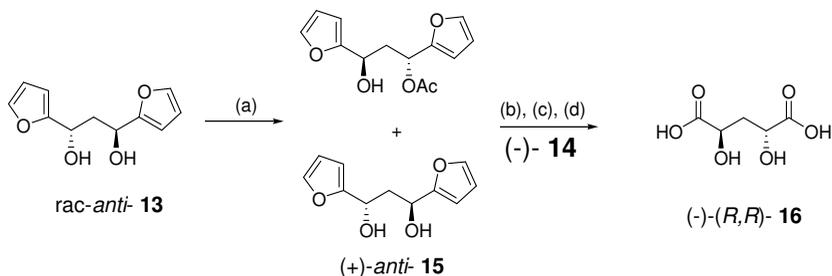
Conforme já mencionado, as lipases apresentam inúmeras aplicações. Pode-se destacar o trabalho de Baldessari *et al.* que utilizam lipases de diferentes fontes na esterificação regioseletiva da hidrocortisona. (**Figura 10**).

Neste caso, a esterificação é importante pois o processo, além de ser regioseletivo, o produto **12** formado possui alta lipofilicidade o qual apresenta inúmeras aplicações farmacêuticas. Utilizando a CALB como biocatalisador, o produto **12** foi obtido com 70% de rendimento em 24h.<sup>58</sup>



**Figura 10.** Esterificação regioseletiva da hidrocortisona **11**.<sup>57</sup>

As lipases têm sido amplamente utilizadas também na preparação de compostos de interesse em síntese orgânica. Pode-se destacar o uso da lipase de *Candida rugosa* (LCR) como biocatalisador na obtenção do composto acetilado **14** com *ee* de 95% e que foi usado na preparação de ácidos homotartáricos opticamente ativos **16**, que possuem aplicação em sínteses estereosseletivas (**Figura 11**).<sup>59</sup>

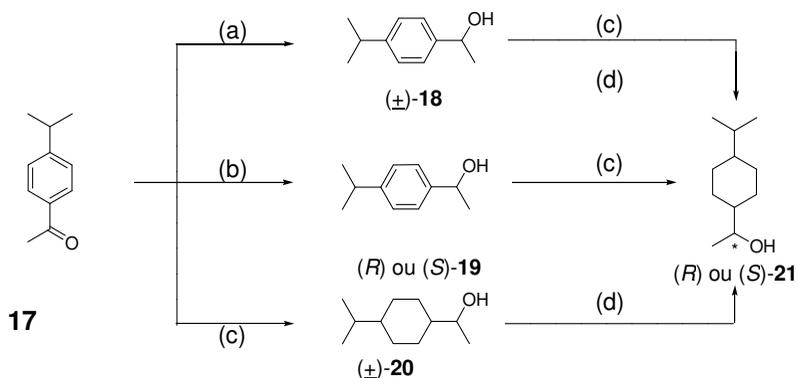


- (a) – LCR, acetato de vinila, éter-t-butilmetílico  
 (b) – NaOH/MeOH  
 (c) - O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH, HCOOH  
 (d)- Ba(OH)<sub>2</sub>; resina de troca iônica, acetona

**Figura 11.** Aplicação da LCR na síntese enantioselectiva de ácidos homotartáricos (**16**).

A indústria alimentícia e de cosméticos tem utilizado lipases e/ou microrganismos na preparação de compostos de interesse. Por exemplo, o Mugetanol (**21**), é bastante utilizado na indústria como fragrância.

Vieira *et al.* relataram a preparação deste compostos a partir da 4-isopropilacetofenona (**17**) por diferentes rotas, conforme mostrado na **Figura 12**.<sup>60</sup>

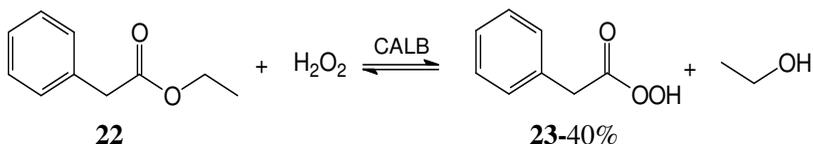


- (a) NaBH<sub>4</sub>, MeOH, 90%  
 (b) álcool desidrogenase (ADH), tampão fosfato de potássio pH = 7,4, 24h, 30°C, 140 rpm.  
 (c) THF, Hexano, tampão fosfato de potássio pH = 7,4, t.a., 88%  
 (d) CALB, 2,5h, *ee* >99%, t.a., 24h.

**Figura 12.** Rotas sintéticas de obtenção do **21** a partir da 4-isopropilacetofenona (**17**).

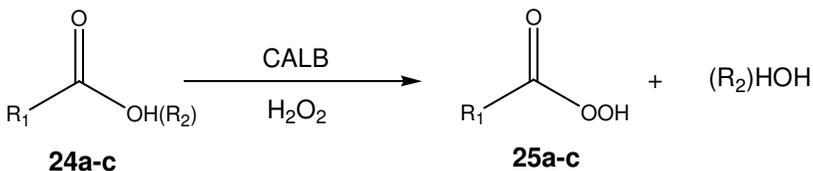
No início da década de 90, Bjorkling *et al.* reportaram a utilização de lipases na preparação de perácidos (**23**), juntamente com peróxido de hidrogênio. Essa reação é bastante atraente, pois se pode obter novos oxidantes em condições relativamente brandas de temperatura e pH.<sup>61,62</sup>

Por exemplo, a **Figura 13** mostra a reação geral de peridrólise do fenilacetato de etila (**22**) catalisada pela lipase de *C. antarctica* (CALB).<sup>62</sup>



**Figura 13.** Peridrólise do fenilacetato de etila.

Klaas *et al.*<sup>63</sup> prepararam perácidos de duas formas distintas, e em ambas utilizaram a CALB como catalisador. Os ácidos carboxílicos ou ésteres (**24a-c**) foram convertidos aos correspondentes perácidos (**25a-c**) com peróxido de hidrogênio. (**Figura 14**).



R<sub>1</sub> = (a) CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-, (b) CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>-, (c) CH<sub>3</sub>-  
 R<sub>2</sub> = H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-

**Figura 14.** Preparação enzimática de perácidos catalisados pela lipase CALB.

Os resultados obtidos por Klaas *et al.* da conversão aos correspondentes perácidos estão demonstrados na **Tabela 2**.

**Tabela 2.** Preparação de perácidos catalisadas pela CALB.<sup>(a)</sup>

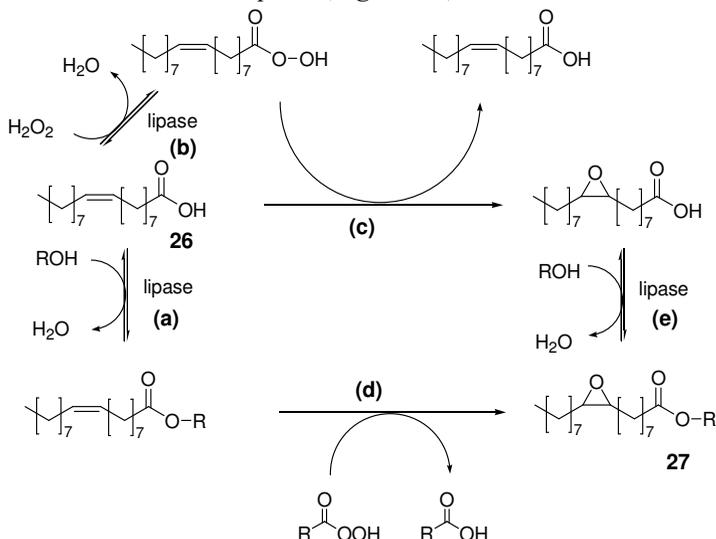
Entrada	Substratos	Conv. (%)
1	ácido dodecanóico	67
2	ácido octadecanóico	83
3	acetato de etila	>99

(a) = 24h, t.a.

Os resultados apresentados na **Tabela 2**, demonstram a eficiência da utilização de lipases para a obtenção de peróxi-ácidos, e a partir destes pode-se obter diferentes tipos de oxidantes e com um elevado grau de estabilidade.

Outros trabalhos relatando a utilização de lipases na preparação de peroxiácidos podem ser citados. Orellana-Coca *et al.* que utilizaram a CALB na síntese de perácidos a partir de ácidos graxos de cadeia linear e a seguir, o utilizaram *in situ* na epoxidação do ácido oléico e do oleato de metila em meio livre de solvente.<sup>64</sup>

Em outro trabalho, estes mesmos autores prepararam epoxiestearatos de alquila (**27**) através da esterificação e peridrólise catalisada pela lipase de *C. antarctica* seguida pela epoxidação do ácido oléico (**26**) em um processo chamado “one-pot”. (**Figura 15**)<sup>65</sup>



**Figura 15.** Esterificação e epoxidação simultânea do ácido oléico (**26**) para produção de epoxiestearatos de alquila (**27**) mediada pela CALB.<sup>65</sup>

A **Figura 15** representa as vias reacionais para a esterificação **(a)** e formação do perácido oléico **(b)** catalisados pela CALB. Após a formação do perácido, têm-se a rota de formação do ácido epoxiesteárico **(c)**. No caminho **(a)** o ácido oléico reage com um álcool formando um éster que é posteriormente epoxidado de acordo com o caminho **(d)**. O ácido epoxiesteárico também atua como substrato para a reação de esterificação catalisada pela lipase conforme apresentado na rota **(e)**.

A reação de esterificação ocorreu de forma relativamente rápida e foi seguida pela de epoxidação do éster alquílico e do ácido graxo remanescente. Os maiores valores de conversão na esterificação ( $\approx 75\%$ ) foram obtidos com *n*-octanol, *n*-hexanol e *n*-butanol quando comparados com o *iso*-propanol (55%).

Os resultados mostraram que houve perda significativa de atividade da lipase durante a reação, principalmente devido a exposição prolongada ao peróxido de hidrogênio. A presença dos álcoois, particularmente o etanol, também contribuiu para diminuição da atividade da enzima.<sup>65</sup>

Considerando alguns dos trabalhos citados, no que se refere a preparação de compostos de interesse sintético, fica claro que o uso de enzimas (em especial, as lipases) é bastante importante. Porém, o uso destes catalisadores é ainda um pouco limitado devido ao elevado custo de produção e baixa estabilidade em solventes orgânicos.

Para contornar estes problemas, muitos estudos tem sido feitos com o objetivo de tornar as enzimas mais estáveis e eficientes frente a fatores químicos, físicos ou biológicos, e com isso, promover a sua reutilização no processo.<sup>8</sup>

Frente a este problema, técnicas de imobilização vêm sendo desenvolvidas com o intuito de fornecer estabilidade física e química para as enzimas e facilitar sua recuperação, reutilização em solventes orgânicos e diminuição de custos.<sup>8, 66-69</sup>

## 1.7. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

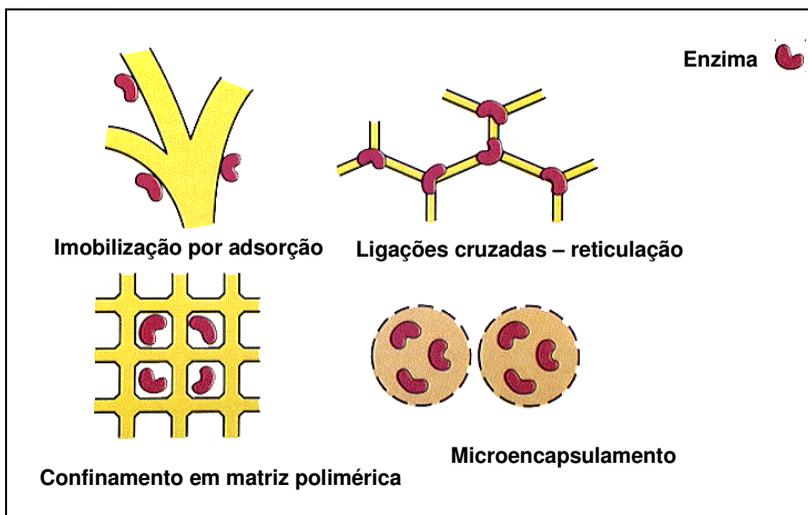
Como mencionado anteriormente, a imobilização de enzimas vem sendo amplamente estudada, com o objetivo principal de fornecer maior estabilidade aos biocatalisadores empregados em cada processo.

A imobilização é o confinamento ou retenção de uma enzima em um material, ou conjunto de materiais, onde ela mantém a sua forma ativa (confinamento em matriz sólida). Assim, a enzima imobilizada se mantém estável no meio reacional e garante a catálise enzimática. A enzima quando imobilizada, em geral, retém sua configuração estrutural

devido às possíveis ligações de hidrogênio que ocorrem na superfície do material. Isto conduz a certa dificuldade de vibração, aumentando sua estabilidade térmica.<sup>8,70</sup>

Algumas técnicas de imobilização envolvem a ligação de enzimas em suporte sólido insolúvel em água (ligação em suporte) ou ligações cruzadas intermoleculares das enzimas por reagentes bifuncionais ou multifuncionais.

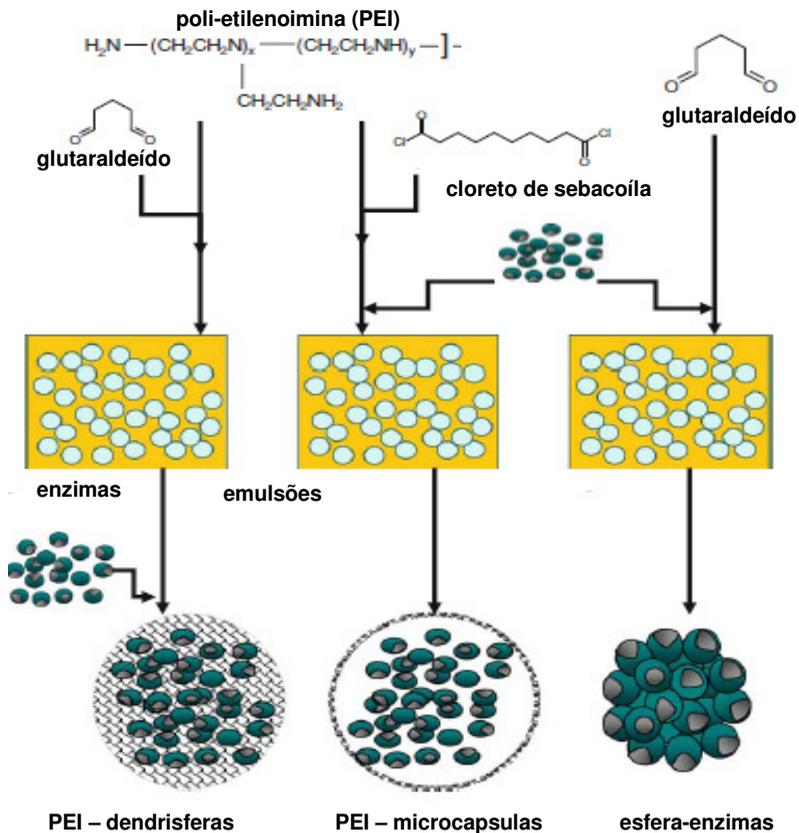
Outro método, apesar de não apresentar ligações e nem confinar fisicamente às enzimas, é o sistema bifásico. Este é formado por duas fases onde na fase aquosa se encontra a enzima e na orgânica, o substrato. A interação das duas fases ocorre através de agitação mecânica.<sup>9,71</sup> Na **Figura 16** estão representadas as principais formas de imobilização de enzimas.



**Figura 16.** Representação gráfica de alguns métodos de imobilização de enzimas.<sup>72</sup>

Muitos pesquisadores também têm investido suas pesquisas em métodos de imobilização de enzimas em suportes específicos os quais podem funcionar como biossensores.<sup>8b</sup>

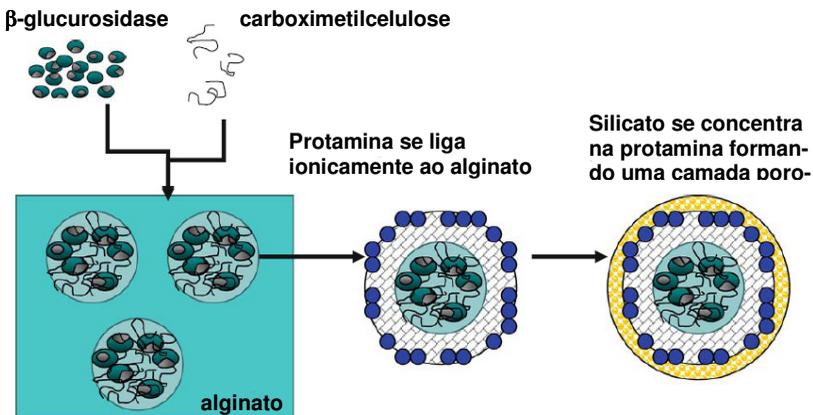
Na **Figura 17** está demonstrado o método de imobilização de lacases, para aplicação em biossensores. Rochefort *et al.* usaram diferentes métodos para a imobilização de lacases, utilizando como suporte a polietilenoimina (PEI).<sup>73</sup>



**Figura 17.** Diferentes métodos de imobilização de lacases utilizando PEI como suporte.<sup>73</sup>

Muitos trabalhos na literatura têm demonstrado a combinação de diferentes materiais para a obtenção de outros com propriedades mais específicas para a imobilização de biocatalisadores.

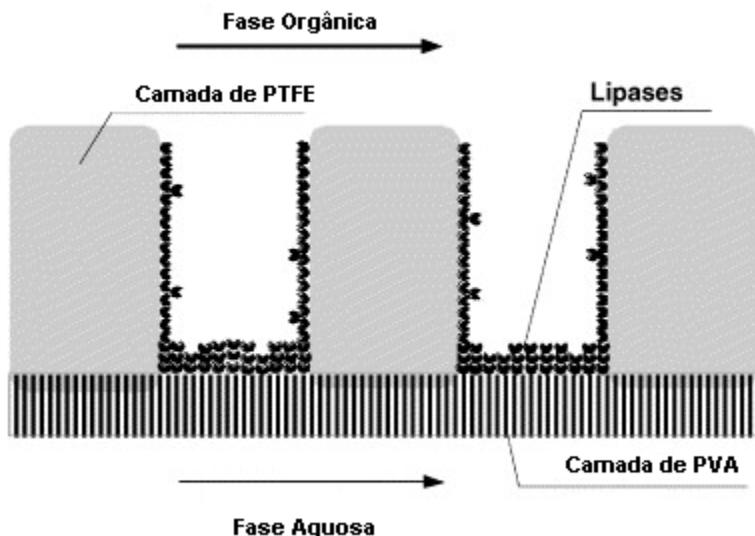
Por exemplo, Zhang *et al.*, utilizaram a carboximetilcelulose e o alginato de cálcio na para encapsular a  $\alpha$ -glucosidase. Os autores demonstraram que a utilização destes materiais para o encapsulamento desta enzima pode aumentar em até 125% a atividade catalítica para o processo de silicificação e uso de até 10 vezes sem perda significativa de atividade. (Figura 18)<sup>74</sup>



**Figura 18.** Microencapsulamento de enzimas em multi-camadas.

Em outro exemplo, foram usadas blends poliméricas (mistura de polímeros). Destaca-se o trabalho de Wang *et al.* que imobilizaram a lipase de *C. rugosa* (LCR) em membranas formadas pela mistura de PVA (álcool polivinílico) e PTFE (politetrafluoretileno). Esse método de imobilização é interessante, pois mostra a função de cada polímero na formação do suporte: o PTFE atua como uma camada hidrofóbica para a imobilização da lipase e na manutenção de sua atividade e o PVA evita que a LCR se dissolva na água causando dessorção do biocatalisador do suporte.<sup>75</sup>

A **Figura 19** mostra de forma detalhada este processo de imobilização. A eficiência deste suporte foi medida através das análises de dessorção do biocatalisador e da atividade enzimática na hidrólise de óleo de oliva<sup>75</sup>.



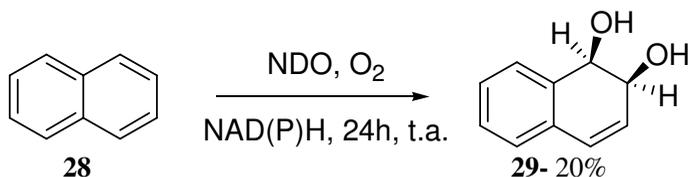
**Figura 19.** Representação esquemática para a imobilização de LCR em misturas de polímeros PVA/PTFE.

Com o desenvolvimento da nanotecnologia outros materiais com diferentes propriedades vêm sendo testados e utilizados para a imobilização de enzimas.<sup>76</sup>

Pan *et al.* utilizaram nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  agregadas em quitosana (biopolímero derivado da quitina) para a imobilização da D- $\alpha$ -galactosidase (lactase) de *Aspergillus oryzae*. Análises de microscopia de transmissão eletrônica mostraram que o suporte formado possui uma grande área superficial e grandes volumes de poros em sua superfície. Além disso, a aplicação de materiais magnéticos, aumentam a estabilidade do suporte frente à agentes químicos. A enzima suportada neste suporte reteve a atividade catalítica por até 15 reutilizações na hidrólise da lactose.<sup>77</sup>

Em outro estudo, a CALB foi imobilizada em nanopartículas superparamagnéticas. O suporte foi preparado através da co-precipitação da magnetita e posteriormente tratado com  $\gamma$ -aminopropiltrietóxisilano. O grupo amino do suporte promoveu interações com a enzima em pH = 7,0. A CALB imobilizada neste suporte foi utilizada na resolução de (R,S)-1-feniletanol via transesterificação com acetato de vinila. Os resultados obtidos mostram que o produto foi obtido com *ee* >99% e E = 226.<sup>78</sup>

Trabalhos recentes da literatura têm usado o sistema bifásico na obtenção de compostos de interesse. McIever *et al.* usaram o sistema bifásico água/dodecano 80:20 v/v na preparação de (1*R*, 2*S*)-1,2-dihidrodiol naftaleno (**29**) à partir do naftaleno (**28**), catalisada pela naftaleno dioxigenase (NDO) de *Eschericia coli*. O uso do sistema bifásico forneceu uma proteção extra à enzima pela fase aquosa aumentando a solubilidade do substrato na fase orgânica. Assim, diminuiu o contato prolongado do naftaleno com a enzima evitando a perda ou diminuição da atividade catalítica. (Figura 20)<sup>79</sup>

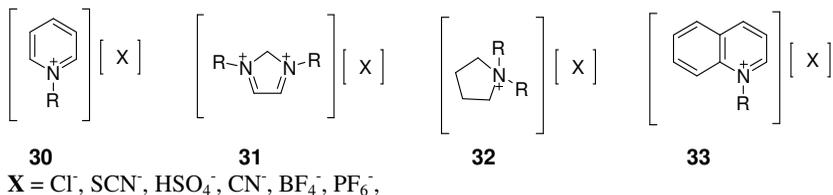


**Figura 20.** Biotransformação de naftaleno (**28**) catalisada pela NDO em sistema bifásico água/dodecano.

Além da imobilização, uma alternativa crescente e atraente para as transformações químicas é a aplicação dos líquidos iônicos (LIs) aliados ao uso de biocatalisadores.

## 1.8. APLICAÇÕES DE LÍQUIDOS IÔNICOS (LI) EM REAÇÕES BIOCATALISADAS

Os LIs são sais orgânicos com ponto de fusão inferior à 100 °C, freqüentemente inferior até mesmo à temperatura ambiente. Os mais comuns são os derivados de piridina, imidazol, pirrol, e naftilpiridinas (**Figura 21**).<sup>80</sup>



**Figura 21.** Estrutura geral de alguns líquidos iônicos baseados nos cátions do (**30**) alquil-piridínio, (**31**) dialquil-imidazólio, (**32**) dialquil-pirrolidínico e (**33**) alquil-naftilpiridínio.

Atualmente, encontram-se catalogados e devidamente caracterizados 162 líquidos iônicos no Ionic Liquids Database (ILD). Este banco de dados mostra todas as publicações referentes ao uso de LIs em diferentes áreas da ciência.<sup>80</sup>

O que torna o uso de LIs vantajoso é o fato do seu baixo grau de toxicidade devido a ausência de pressão de vapor fazendo com que estes compostos não contaminem o meio ambiente com facilidade. Possuem outras propriedades importantes tais como, a baixa inflamabilidade, alta viscosidade, e estabilidade térmica.<sup>81</sup>

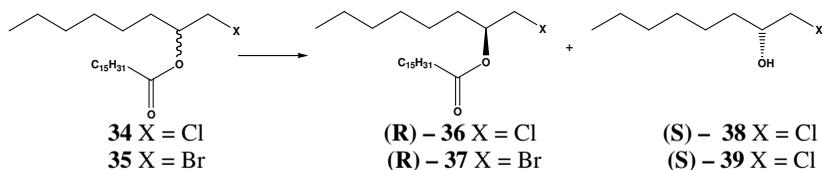
Os LIs têm sido amplamente empregados com excelentes resultados em reações orgânicas clássicas como as de Diels-Alder, e alquilação de Friedel-Crafts.<sup>80</sup> Por exemplo, o uso de tetrafluorborato de 1-etil-3-metilimidazólio ([EMIm]BF<sub>4</sub>), se mostrou eficiente na reação de cicloadição de ciclopentadieno com metil acrilato, obtendo o correspondente produto com 91% de rendimento em 72 h e à 25 °C.<sup>82</sup>

Em alguns casos, o uso de LIs pode favorecer um aumento na enantiosseletividade do produto e retenção da atividade do biocatalisador empregado.<sup>83</sup>

Por exemplo, na síntese do propionato de butila as lipases de *C. antarctica*, *Rhizomucor miehei* e a *T. lanuginosus* apresentaram alta atividade catalítica em LIs com ânions hexafluorofosfato e cátions do tipo 1-butil-3-metilimidazólio, 1-octil-3-metilimidazólio e 1-butil-2,3-dimetilimidazólio à 40 °C. O produto foi obtido com conversões de 30-99%.<sup>83</sup>

Encontram-se relatados na literatura também, estudos que demonstram a manutenção da atividade catalítica de lipases de *Candida rugosa* (LCR), *Chromobacterium viscosum* (LCV) e *T. lanuginosus* (LTL) em microemulsões de água e hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio ([BMIm][PF<sub>6</sub>]) na síntese de laurato de propila. O autor mostrou que a formação de microemulsão leva à uma pequena solubilidade do LI em água, sendo favorável para a manutenção da conformação tridimensional das enzimas.<sup>84</sup>

Outro trabalho de relevância é a hidrólise enantiosseletiva de derivados de palmitatos de 1-halo-2-octila **34** e **35** em sistemas reacionais na presença e ausência de LIs sob diferentes condições. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 22**.<sup>85</sup>



composto	biocatalisador	solvente	hidrólise (%)	ee <sub>s</sub>	E
<b>34</b>	CALB	t-butanol	57	90	40
<b>34</b>	CALB	[OMIm][BF <sub>4</sub> ]	43	98	220
<b>34</b>	CALB	[BMIm][PF <sub>6</sub> ]	51	98	360
<b>34</b>	LRO	[OMIm][BF <sub>4</sub> ]	57	47	4
<b>35</b>	LTL	t-butanol	54	48	4
<b>35</b>	CALB	t-butanol	52	90	50
<b>35</b>	CALB	[BMIm][PF <sub>6</sub> ]	35	>99	>340

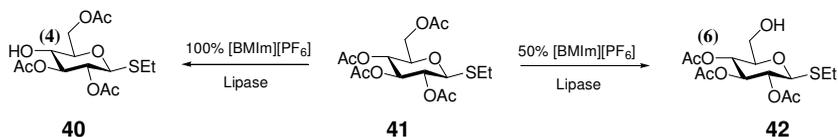
**Figura 22.** Hidrólise enantiosseletiva de palmitatos derivados 1-halo-2-octila **34** e **35** em LIs e em *t*-butanol. [LTL = lipase de *T. lanuginosus*, LRO = lipase de *R. oryzae*, CALB = lipase de *C. antarctica*].

Os resultados demonstraram que a utilização de ambos os LIs nesta reação foi bastante eficiente, pois, foi observado um grande aumento na enantiosseletividade (E) quando comparada com o *t*-butanol puro.

Além do aumento da enantiosseletividade, o uso de LIs em reações biocatalisadas tem demonstrado em muitos casos, favorecimento na regioseletividade na formação de produtos.

Gervaise *et al.* utilizaram a lipase de *Candida cylindracea* (LCC) na desacetilação regioseletiva de 2,3,4,6-tetraetil-O-acetil-1-tio-β-D-glucopiranosídeo (**41**) na presença de diferentes proporções de [BMIm]PF<sub>6</sub> e tampão fosfato de potássio (**Figura 23**).<sup>86</sup>

Os resultados mostraram que à medida que se utilizou 100% de LI verificou-se a desproteção preferencial da hidroxila do carbono 4 formando o produto **40**. Ao utilizar o meio reacional com 50% de LI, a formação de outro produto **42** foi favorecida, com a desacetilação da hidroxila do carbono 6.<sup>86</sup>



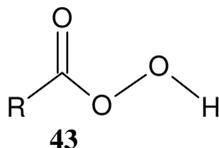
**Figura 23.** Aplicação do [BMIm][PF<sub>6</sub>] na desacetilação regioseletiva de **41**.

Os autores sugeriram que com o uso de diferentes proporções de LI no meio reacional, a superfície da enzima pode sofrer modificações, alterando o equilíbrio entre a forma fechada e aberta. Com isso, a forma tridimensional do sítio catalítico pode ter grandes mudanças resultando em um comportamento regioseletivo.<sup>86</sup>

Além da aplicação na biocatálise conforme visto anteriormente, os LIs têm sido aplicados nos mais variados campos do conhecimento, como por exemplo, na indústria alimentícia, na geração de energia por fontes solares e nucleares, extração de produtos naturais e também na obtenção de peróxi-ácidos.<sup>87</sup>

## 1.9. PERÓXI-ÁCIDOS

Os peróxi-ácidos (**43**), também comumente denominados de per-ácidos, são ácidos que possuem um grupamento peróxido (-OOH).<sup>88</sup>

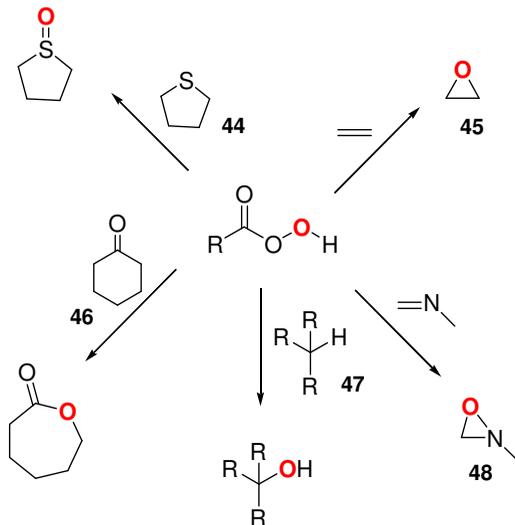


A preparação destes compostos envolve geralmente a reação de um ácido carboxílico com peróxido de hidrogênio, em meio contendo ácido sulfúrico. São oxidantes fortes e comumente usados em sínteses orgânicas e na indústria química.<sup>89</sup>

Apesar de sua importância como agente oxidante, os peróxi-ácidos são compostos tóxicos e de difícil manuseio, por serem altamente instáveis em solução ou em temperatura mais elevadas. Devido a estes fatores, o número de peróxi-ácidos disponíveis para síntese orgânica ainda é bastante limitado. Os ácidos perfórmico e peroxi trifluor-acético são formados *in situ* a partir dos correspondentes 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.<sup>90</sup>

A aplicação mais comum, promovida pelos perácidos é a oxidação de ligações C=C e C=N para a obtenção de epóxidos (**45**)<sup>91</sup> e oxaziridinas (**48**),<sup>92</sup> respectivamente. São também amplamente utilizados na oxidação de cetonas cíclicas (**46**) (oxidações de Baeyer-Villiger)<sup>93</sup>, compostos sulfurados<sup>94</sup> (**44**) e em numerosas oxidações de hidrocarbonetos catalisadas por metais de transição<sup>95</sup> (**47**) (**Figura 24**)



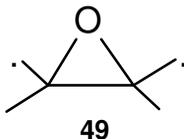
**Figura 24.** Usos de perácidos em processos de síntese orgânica.

Conforme mencionado no item **1.6.** pg 14, a obtenção quimio-enzimática de peróxi-ácidos catalisada por lipases, é interessante, pois não necessita o uso de ácidos minerais e estes se podem ser obtidos sob condições mais suaves de reação tais como temperatura ambiente, pH neutro e agitação moderada.

Além disso, com a variedade de ácidos carboxílicos disponíveis comercialmente, pode-se preparar diversos perácidos com diferentes cadeias e poderes de oxidação. Estes peróxi-ácidos podem ser úteis nas sínteses régio- e enantiosseletivas de compostos de interesse como os epóxidos e oxaziridinas,<sup>96</sup> os quais serão demonstrados nos próximos itens.

## 1.10. EPÓXIDOS

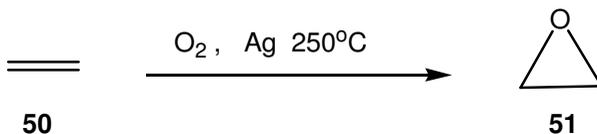
Os oxiranos (termo utilizado pela IUPAC)(**49**) constituem uma classe de compostos orgânicos pertencente ao grupo de éteres, cuja sua característica é a presença de um anel de três membros C-O-C. Estes átomos estão ligados entre si por ligações  $\sigma$ . As ligações C-O são relativamente polares devido a alta diferença de eletronegatividade entre os átomos.<sup>97</sup>



O que torna os epóxidos interessantes sob o ponto de vista sintético é porque seu “pequeno” anel de três membros é altamente reativo frente à nucleófilos devido à grande tensão conformacional devido à posição e os ângulos das ligações.<sup>97</sup>

Essa reatividade permite a transformação de epóxidos em substâncias de grande interesse sintético, pois pode formar uma série de produtos multifuncionalizados, como haloidrinas e amino-álcoois.<sup>98</sup>

Um epóxido muito importante, é o óxido de etileno (**51**) que pode ser preparado na indústria por oxidação catalítica do eteno (**50**) com oxigênio, sob alta temperatura e prata como catalisador.<sup>99</sup> (**Figura 25**).



**Figura 25.** Processo industrial de epoxidação do eteno, por oxidação catalítica.

A produção mundial anual do óxido de eteno é de 15 milhões de toneladas anuais. A importância desse composto é devida o seu emprego na produção de etilenoglicol, que é muito utilizado na indústria química para a fabricação de tecidos de poli-éster e na indústria automobilística como refrigerante automotivo e anticongelante. Além disso, o óxido de etileno é largamente utilizado para esterilizar suprimentos médicos e instrumentos cirúrgicos.<sup>99</sup>

Com o desenvolvimento de novos agentes oxidantes, a epoxidação se tornou uma reação de extrema importância em síntese orgânica, devido a possibilidade de obtenção de novas moléculas com proprieda-

des distintas e que futuramente poderão ter aplicação na indústria farmacêutica e de alimentos.

Dentre as metodologias conhecidas, pode-se destacar a preparação de epóxidos por oxidação com perácidos (podendo ser eletrofílica ou nucleofílica) ou a enzimática. Essas metodologias serão apresentadas a seguir.

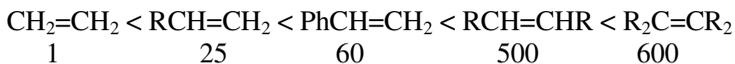
### 1.10.1. Epoxidação por perácidos

A principal característica dessa reação é a inserção do oxigênio proveniente do perácido na ligação C=C, formando o correspondente anel epóxido. A eficiência dessa reação é determinada pelo tipo de oxidante empregado, juntamente com o solvente e reatividade da ligação dupla.<sup>88,91,97</sup>

Caso a ligação dupla (C=C) apresente uma densidade eletrônica suficiente e o perácido for eletrofílico, a epoxidação é chamada de eletrofílica.

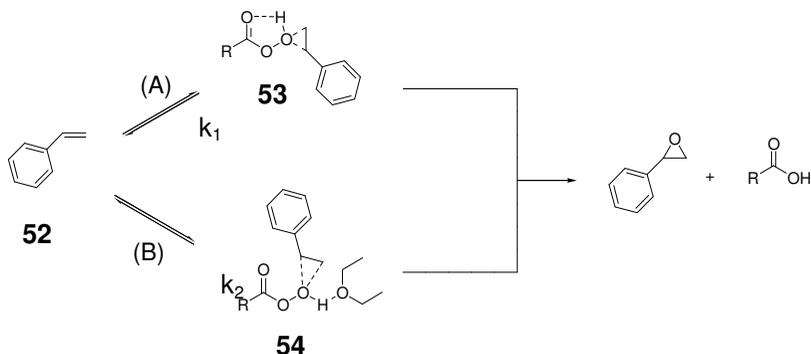
A presença na ligação dupla C=C de grupos substituintes que doam elétrons (p.ex., grupos alquilas) aumentam a densidade eletrônica e favorecem o ataque do perácido e a transferência do oxigênio.

Na **Figura 26** está representado a escala de reatividade relativa (R=alquil) das ligações duplas frente à perácidos.<sup>88</sup>



**Figura 26.** Reatividade relativa das ligações duplas frente a oxidação com perácidos.

Porém, a velocidade de epoxidação é sensivelmente diminuída na presença de grupos retiradores de elétrons na ligação C=C e também por solventes que possam coordenar com os perácidos através de ligações intermoleculares de hidrogênio. Por exemplo, as reações conduzidas em éter etílico ou acetato de etila, são cerca de 10 vezes mais lentas que as feitas em benzeno, tolueno ou clorofórmio, conforme o exemplo mostrado na **Figura 27** para a epoxidação do estireno (52).<sup>88</sup>

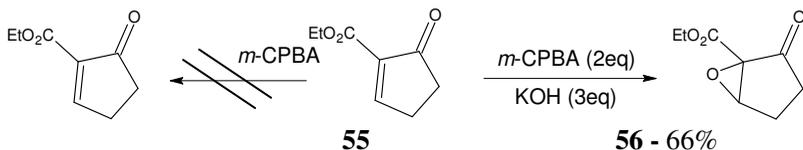


**Figura 27.** Epoxidação de estireno (**52**), em (A) tolueno e (B) éter etílico.

As epoxidações feitas em solventes que fazem ligações intermoleculares com perácidos como, por exemplo, em éter etílico ocorrem de maneira mais lenta. Por isso estes solventes tem a importância na estabilização (ou não) do estado de transição cíclico (**53**) . (**Figura 27**)

Por outro lado, essa metodologia aplicada é restrita à substratos com ligações duplas ricas em elétrons. Quando os substratos a serem epoxidados apresentam ligações duplas elétron-deficientes, como por exemplo, sistemas  $\square\square\square$ -insaturados é necessário o uso de oxidantes mais nucleofílicos, como íons hidroperóxidos, em meio alcalino. Esta reação também é conhecida como epoxidação alcalina nucleofílica ou epoxidação de Weitz-Scheffer.<sup>100</sup>

Pode-se destacar a epoxidação nucleofílica utilizando o *m*-CPBA em meio alcalino desenvolvido por García Ruano *et al.*, na epoxidação de compostos com ligações duplas elétron-deficientes **55**, obtendo-se o correspondente epóxido **56** com conversão de 66%. Na ausência de base no meio reacional, a reação não ocorre. (**Figura 28**).<sup>101</sup>



**Figura 28.** Epoxidação nucleofílica catalisada por *m*-CPBA em meio alcalino.

Além da aplicação de perácidos comerciais em reações de epoxidação, muitos trabalhos têm demonstrado a aplicação de enzimas e/ou

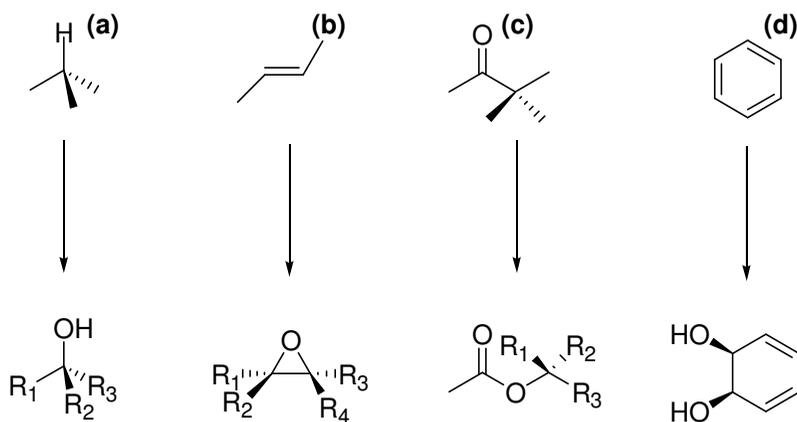
microrganismos como agentes oxidantes em reações orgânicas. Este tópico será apresentado a seguir.

### 1.10.2. Epoxidação catalisadas por enzimas.

A epoxidação enzimática tem sido amplamente estudada, pois o uso de microrganismos ou de enzimas isoladas tem demonstrado de forma bastante promissora a obtenção de moléculas quirais em diversos processos na síntese orgânica.

Nestas reações em geral, são utilizados (como é o caso da epoxidação) microrganismos que produzem oxidases para a oxidação de alcenos, formando os correspondentes epóxidos. As oxidases são enzimas doadoras de oxigênio e podem ser enantio-, químio- ou regioseletivas e assim podem formar compostos opticamente puros em reações onde os catalisadores químicos não alcançam total êxito.

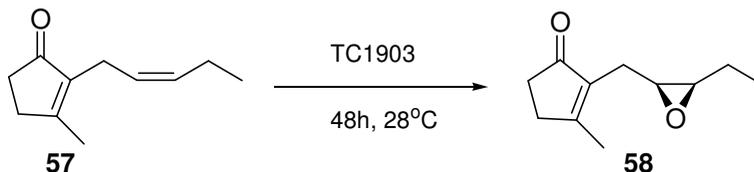
Na **Figura 29** estão demonstradas algumas das principais reações catalisadas por oxigenases.<sup>102</sup>



**Figura 29.** Reações típicas catalisadas pelas oxigenases: (a) hidroxilação por monooxigenase, (b) epoxidação por monooxigenase, (c) oxidação de Baeyer-Villiger, (d) dioxigenação por dioxigenase.<sup>102</sup>

Um exemplo bastante interessante, citado por Marsaioli *et al.* é a epoxidação enantiosseletiva da *cis*-jasmona (**57**) para a obtenção da (*7S,8R*)-(-)-epoxijasmona (**58**) catalisada por células de *Trichosporum*

cutaneum CCT 1903 (TC1903). O produto **58** foi obtido com *ee* de 92% e 13% de rendimento.<sup>103</sup>



**Figura 30.** Bioconversão da cis-jasmona (**57**) em (7*S*,8*R*)-epoxijasmona (–)-**58** catalisada por células de *T. cutaneum*.

O uso de oxigenases é bastante eficiente, mas o alto custo de obtenção comercial e o manuseio deste microrganismo no meio reacional dificultam a utilização em processos sintéticos.

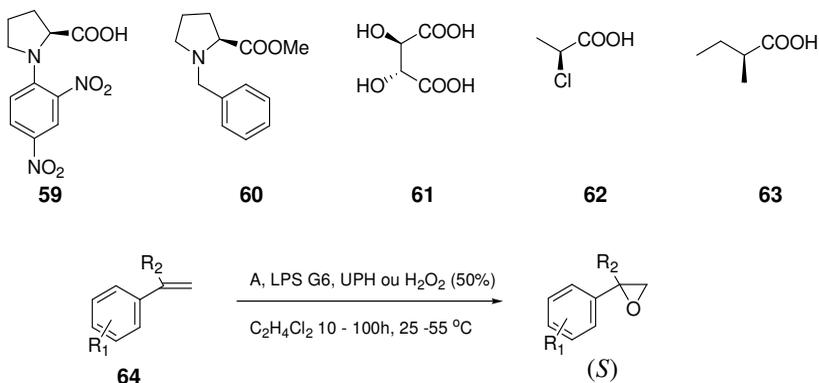
Outra possibilidade na utilização de biocatalisadores para obtenção de epóxidos é através da epoxidação químio-enzimática. Neste processo é associado o uso de enzimas com doadores de grupos acila e peróxido de hidrogênio para formação de peróxi-ácidos, sendo que estes são utilizados *in situ* na obtenção destes compostos. Este tópico será discutido no próximo item.

### 1.10.3. Epoxidação químio-enzimática de alcenos.

Neste tipo de epoxidação, o processo ocorre em duas etapas principais; a primeira etapa é enzimática e a lipase é utilizada para a preparação do perácido por peridrólise de um ácido carboxílico. Em seguida, esse perácido é utilizado *in situ* na epoxidação da ligação C=C. Este tipo de epoxidação foi inicialmente citada por Bjorkling *et al.* na década de 90.<sup>61,62</sup>

Trabalhos recentes mostram a aplicação dos perácidos preparados pela lipases na preparação seletiva de epóxidos.<sup>96</sup>

Sarma *et al.* reportaram a epoxidação químio-enzimática seletiva de derivados do estireno (**64**) utilizando uma série de ácidos quirais (*N*-2,4-dinitrofenil-*L*-prolina (**59**), éster metílico da *N*-benzil-*L*-prolina (**60**), *L*-(+)-ácido tartárico (**61**), (*S*)-(-)-2-ácido cloropropiônico (**62**) e (*S*)-(+)-2-ácido metilbutírico (**63**) com uréia peróxido de hidrogênio (UPH) ou peróxido de hidrogênio aquoso (50 %) e com a lipase de *Pseudomonas sp.* G6, conforme descrito na **Figura 31**.



R<sub>1</sub> = H, 4-Cl, 3-Cl, 2-Cl, 4-Br, 3-Br, 2-Br, 4-NO<sub>2</sub>, 3-NO<sub>2</sub>, 2-NO<sub>2</sub>, 4-Me  
 R<sub>2</sub> = H, CH<sub>3</sub>  
 A = ácidos e ésteres quirais **59 - 63**

**Figura 31.** Epoxidação químio-enzimática de derivados de estireno utilizando ácidos quirais na presença da LPS-G6 e peróxido de hidrogênio.<sup>96</sup>

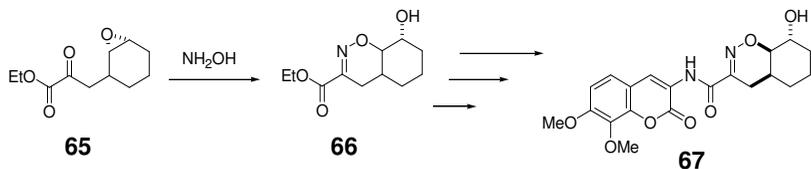
Os resultados mostraram bons valores de conversão (5-85%) e enantiosseletividade ( $ee_p$  60-81%) na formação de epóxidos quirais. Os melhores resultados com relação à enantiosseletividade foram obtidos utilizando o ácido *N*-2,4-dinitrofenil-L-prolina (**59**) obtendo-se o produto com  $ee_p$  70-81 %.<sup>96</sup>

Os autores ainda demonstraram que a presença de grupos volumosos, como é o caso do grupo *N*-2,4-dinitrofenil, provavelmente orientou a transferência do oxigênio para a ligação dupla somente para o lado menos impedido estericamente, resultando na formação de um epóxido com boa enantiosseletividade.<sup>96</sup>

O método de epoxidação químio-enzimática pode ser aplicado a inúmeros substratos. Recentemente foi publicado um estudo que mostra a epoxidação de ésteres metílicos do óleo de girassol, utilizando lipase em meio aquoso, na presença ou não de doadores acila. A conversão foi maior do que 99% em 16 h de reação. Os melhores resultados foram obtidos com o sistema bifásico, em tempo reacional de 16 h, a 30 °C.<sup>7</sup>

Os epóxidos obtidos, independente da metodologia, podem ter inúmeras aplicações em sínteses totais.<sup>104</sup> Wang *et al.* utilizaram um epóxido **65** na preparação de oxazina (**66**), que pode ser usada como intermediário na síntese de tricodermamidas (**67**) (**Figura 32**).

A utilização de **65** na preparação de **66** foi bastante eficiente sendo que o produto foi obtido com rendimento de 97%.<sup>105</sup>



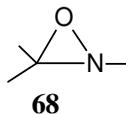
**Figura 32.** Utilização de epóxidos na preparação de oxazinas.

Como se pôde verificar, os epóxidos possuem grande importância na síntese e indústria química contemporânea. Suas aplicações ainda vão muito além dos exemplos aqui citados.

Uma outra classe de compostos heterocíclicos contendo anéis de três membros e com várias aplicações sintéticas são as oxaziridinas.

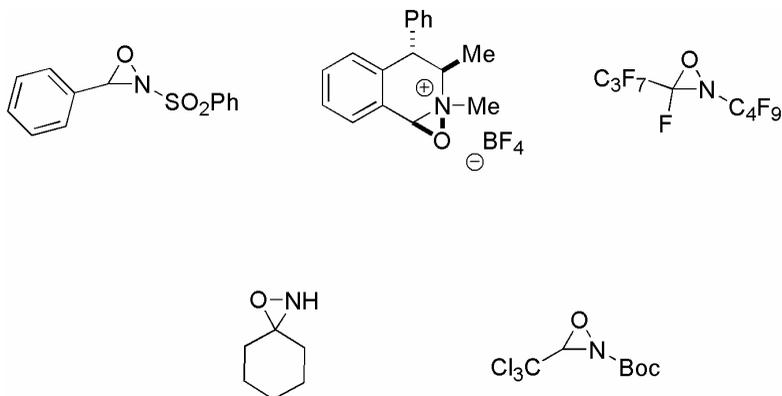
### 1.11. OXAZIRIDINAS

Desde a sua descoberta em 1956 por Emmons<sup>106</sup>, as oxaziridinas (**68**) vêm sendo investigadas por duas grandes razões, primeiramente pela ligação N-O que é altamente instável e também pela tensão conformacional formada pelo heterociclo de três membros C-O-N, o qual dependendo dos grupos ligados ao nitrogênio, favorece mudanças conformacionais.<sup>107</sup>



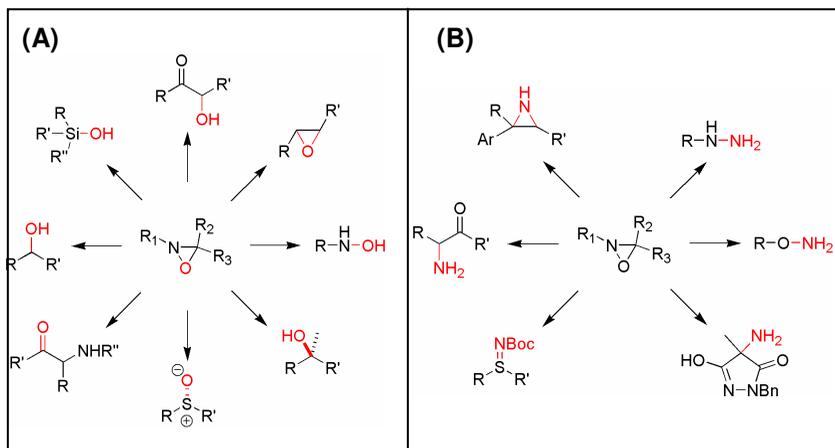
As oxaziridinas podem ser utilizadas como agentes oxidantes ou aminantes. Esse comportamento é determinado pela presença de grupos ligados ao nitrogênio. Em geral, estes compostos com grupos pequenos ligados, atuam como agentes doadores de nitrogênio. A presença de grupos volumosos ou retiradores de elétrons no nitrogênio faz com que as oxaziridinas atuem como agentes oxidantes, e neste caso ainda podem funcionar como indutores quirais.

Na **Figura 33** estão representadas algumas oxaziridinas que são comumente usadas como N,O-transferidores.<sup>108</sup>



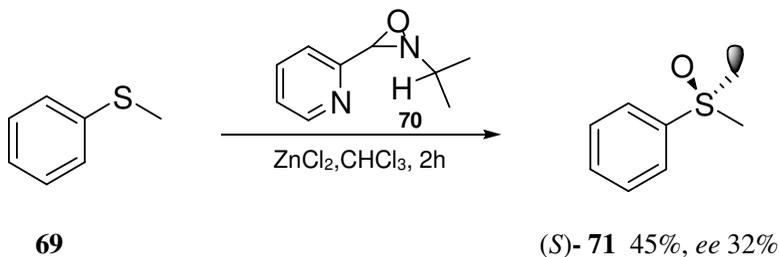
**Figura 33.** Oxaziridinas usadas como N,O-transferidores.

Pelo fato de serem reativas, as oxaziridinas podem ser aplicadas como fontes de **(A)** oxigênio e **(B)** nitrogênio para a preparação de inúmeros outros compostos, conforme demonstrado na **Figura 34**.<sup>109</sup>



**Figura 34.** Compostos que podem ser preparados a partir de oxaziridinas.<sup>109</sup>

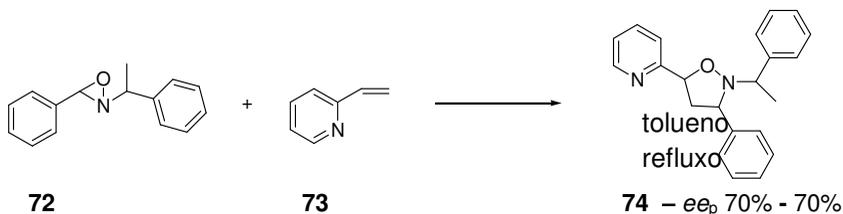
Como um exemplo de aplicação, pode-se destacar o trabalho de Fontecave *et al.* que estudou a oxidação enantiosseletiva de sulfetos **69** na presença de oxaziridina **70** e  $ZnCl_2$  com a formação de um sal de diazônio intermediário, obtendo-se o (*S*)-**71** com rendimento de 45% e ee de 32%.<sup>110</sup> (**Figura 35**)



**Figura 35.** Oxidação de sulfetos mediada por oxaziridinas.

Além de doadores de oxigênio ou nitrogênio em síntese orgânica, as oxaziridinas estão sendo utilizadas recentemente na preparação de isoxazolidinas **74** por cicloadição [3+2] da oxaziridina **72** com 2-vinilpiridina (**73**) (**Figura 36**).<sup>111</sup>

A preparação destes compostos foi reportada por Troisi *et al.* A quiralidade dessa reação ocorreu a partir de indução assimétrica gerada pela presença de grupos volumosos na oxaziridina formando centros estereogênicos definidos. Os produtos foram obtidos com *ee* de 70% e possui três centros quirais. Os compostos preparados possuem grande interesse biológico (atividade citotóxica e antiviral) na preparação de compostos oticamente ativos.<sup>111</sup>



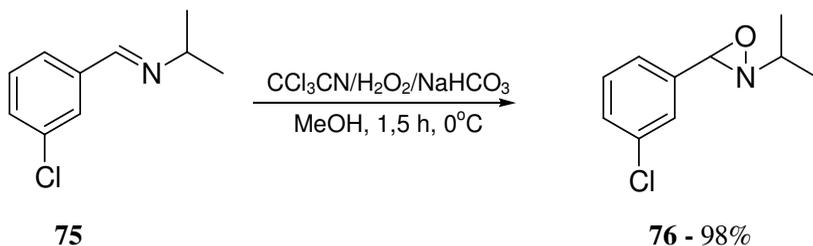
**Figura 36.** Preparação de isoxazolidinas **74**.

Devido as suas aplicações, as oxaziridinas podem ser obtidas através de várias metodologias. A mais conhecida é por oxidação de iminas com a utilização de ácido *m*-cloroperbenzóico (*m*-CPBA), que consiste na inserção de um oxigênio na ligação C=N, formando o anel C-O-N **68**.<sup>112</sup>

Na literatura mais recente são descritos alguns trabalhos no que se refere a obtenção destes compostos utilizando metodologias alternativas. Por exemplo, pode-se citar os estudos de Kraïem *et al.* que utiliza-

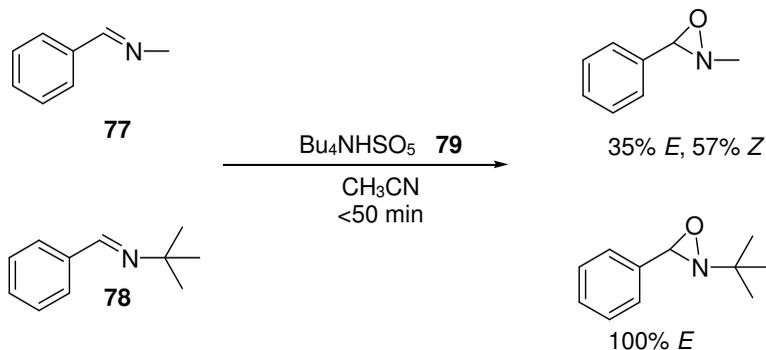
ram tricloro-acetonitrila e peróxido de hidrogênio para a geração de peróxi-imidas *in situ* em temperatura ambiente e posterior oxidação de uma série de alquil-iminas, obtendo-se os produtos com bons rendimentos de 90-98%.

Na **Figura 37**, está sendo demonstrada a obtenção do oxaziridina (**76**) a partir da 3-cloro-N-benziliden-*iso*-propilamina (**75**).<sup>113</sup> (**Figura 37**)



**Figura 37.** Síntese de oxaziridinas via tricloro-acetonitrila e peróxido de hidrogênio.

A Oxona é outro oxidante de baixo custo e de fácil manuseio que pode ser usado na preparação de oxaziridinas. Mohajer *et al.* demonstraram a utilização da Oxona (monoperoxissulfato de tetrabutilamônio) (**79**) na oxidação das iminas **77** e **78**.<sup>114</sup> (**Figura 38**)



**Figura 38.** Oxidação de iminas com Oxona (**79**).

Os resultados descritos acima mostram a seletividade do produto formado em função do grupo ligado ao nitrogênio. Com grupos maiores como *t*-butil, o produto formado foi exclusivamente (*E*). Com grupos

menores como o metil, o percentual do isômero (*Z*) aumentou consideravelmente.<sup>114</sup>

Baseando-se nos estudos apresentados, observa-se que a preparação de epóxidos e oxaziridinas é bastante importante, pois são compostos de interesse para síntese de inúmeros outros. A preparação quími-enzimática destes compostos vem sendo estudada com o intuito de utilizar condições mais brandas de reação onde não são utilizados catalisadores químicos convencionais e/ou oxidantes fortes que contribuem negativamente para a “química verde”.

Portanto, neste trabalho propõe-se a utilização de lipases de diferentes procedências na preparação de peróxi-ácidos derivados de ácidos carboxílicos ou de éster e sua posterior utilização *in situ* na obtenção de epóxidos e oxaziridinas. Os estudos a seguir serão demonstrados em função da otimização dos parâmetros que influenciam diretamente nestas reações, tais como, agitação, procedência da lipase, solvente orgânico na presença ou ausência de líquidos iônicos, e de diversos doadores acila e peróxidos. Também será demonstrada a aplicabilidade desta metodologia em relação a diferentes substratos.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Utilizar lipases de diferentes fontes como biocatalisadores em reações de peridrólise de ácidos carboxílicos ou ésteres para formação dos respectivos perácidos, e usar estes perácidos na oxidação *in situ* de compostos que contenham ligações duplas C=C e C=N, além da formação de lactonas *via* oxidação de Baeyer-Villiger.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### 2.2.1. Preparação e caracterização dos perácidos

- Preparar perácidos derivados de ácidos carboxílicos de cadeias lineares (exs. ácidos acético, propanóico, butanóico, hexanóico, octanóico, e láurico) ou aromáticos (ácido benzóico), ou de éster (acetato de etila), utilizando diferentes lipases como biocatalisadores.
- Avaliar a formação de perácidos por titulação iodométrica;
- Comparar o método da titulação iodométrica com a da determinação de perácidos por eletroforese capilar de zona;
- Utilizar os perácidos obtidos *in situ* na formação de epóxidos e oxaziridinas;

#### 2.2.2. Preparação químio-enzimática de oxaziridinas, derivadas de Bases de Schiff

- Preparar e caracterizar por técnicas espectroscópicas de ressonância magnética e nuclear de hidrogênio e carbono (RMN-  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e por infravermelho (IV) uma série de iminas, derivadas de N-benzilidenalquilaminas com diferentes substituintes ligados ao anel aromático do benzaldeído e ao nitrogênio, de acordo com metodologias descritas na literatura.
- Utilizar as iminas obtidas na preparação químio-enzimática de oxaziridinas;
- Avaliar os diversos parâmetros que influenciam diretamente na conversão e seletividade das oxaziridinas formadas tais como: agitação, solvente, doador acila e doador peróxido.
- Avaliar o efeito do uso de diferentes solventes orgânicos e a adição de quatro diferentes líquidos iônicos (LIs) derivados do 1-butil-3-

metilimidazólio ([BMIm][X], onde [X] = BF<sub>4</sub>, PF<sub>6</sub>, Cl e SCN), em diferentes proporções na conversão e seletividade dos produtos obtidos.

- Verificar a influência de grupos substituintes ligados ao anel aromático e/ou ao nitrogênio na formação e seletividade das oxaziridinas,
- Isolar e caracterizar as oxaziridinas obtidas por técnicas espectroscópicas de RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e por IV.

### **2.2.3. Preparação químico-enzimática de epóxidos e lactonas utilizando lipases de diferentes fontes, livres ou imobilizadas**

- Preparar epóxidos derivados dos terpenos, como a (-)-carvona,  $\alpha$ -cariofileno, e de outros substratos como o cinamato de etila e derivados de cicloexadienodienóis.
- Avaliar, a conversão e seletividade dos correspondentes epóxidos formados em diferentes condições reacionais (efeito do doador peróxido e suporte utilizado na imobilização da lipase de *Pseudomonas* sp.).
- Avaliar a influência da procedência da lipase, a agitação, doador acila, e doador peróxido como fatores importantes na eficiência do processo químico-enzimático para a obtenção de epóxidos.
- Utilizar diferentes metodologias (enzimáticas ou não-enzimáticas) para a formação de  $\alpha$ -caprolactonas e avaliar a possível formação de subprodutos, por oxidação de Baeyer-Villiger.
- Comparar os resultados obtidos com os dados publicados na literatura.

### 3. EXPERIMENTAL

#### 3.1. REAGENTES, SOLVENTES E LIPASES UTILIZADAS.

Os reagentes, todos de grau P.A. utilizados neste trabalho foram:

- ✓ Aldrich: benzaldeído, 4-nitrobenzaldeído 98%, 4-metil-benzaldeído 98%, 4-fluor-benzaldeído 98%, 4-metóxi-benzaldeído 98%, 2,4,5-trimetóxi-benzaldeído, 4-ciano benzaldeído 98%, 3-nitro benzaldeído 98%, 4-hidróxi benzaldeído,  $\square$ -cariofileno (80%), cicloexeno, tetrametilsilano (TMS), 2-etil-hexilamina 98%, 4-flúor-benzaldeído, 2-metilbenzaldeído, *sec*-butilamina 99%, *n*-butilamina 99%, ( $\pm$ )-feniletilamina, cicloexanona, 2-hexanona 98%, dimetóxi-propano, alumina e os ácidos malônico, butanóico, propanóico, hexanóico, benzóico, cinâmico, octanóico, palmítico, mirístico, láurico, *m*-cloroperbenzóico 78%.
- ✓ Merck: tolueno, 2,4-diclorobenzaldeído 98%, éter-*t*-butilmetílico (MTBE), cicloexeno, ácido *p*-toluenossulfônico, cloreto de alumínio, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), fosfato de potássio, tetraborato de sódio.
- ✓ Vetec: peróxido de hidrogênio (30%), glicerol, álcool polivinílico (PVA -300.000 g/mol), bicarbonato de sódio, bicarbonato de potássio.
- ✓ Fluka: *t*-butilamina, uréia peróxido de hidrogênio (UPH) 33%, montmorilonita K10.
- ✓ Acros: (-)-carvona (98%), líquidos iônicos (LIs) (tetrafluorborato de 1-butil-3-metil-imidazólio [BMIm][BF<sub>4</sub>], hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil-imidazólio [BMIm][PF<sub>6</sub>], tiocianato de 1-butil-3-metil-imidazólio [BMIm][SCN] e cloreto de 1-butil-3-metil-imidazólio [BMIm][Cl]),
- ✓ Grupo Química: acetato de etila, etanol (98%), ácido acético
- ✓ Reagen: éter etílico,
- ✓ Nuclear: clorofórmio; diclorometano, tetracloreto de carbono, acetonitrila.
- ✓ Solventes deuterados (Aldrich): clorofórmio (CDCl<sub>3</sub>) e metanol (CD<sub>3</sub>OD).
- ✓ Quimidrol: permanganato de potássio,
- ✓ Riedel de Haen: tiosulfato de sódio
- ✓ Anchor products: caseinato de sódio
- ✓ Sigma: gelatina 300 Bloom
- ✓ As iminas foram preparadas conforme descritos na seção 3.3.3.

- ✓ Os derivados bromados e metilados de cicloexadienodienóis foram preparados e caracterizados pelo grupo de Biocatálise e Biotransformações coordenado pelo Prof. Dr. David Gonzalez da Universidad de La Republica (UdelaR-Montevideo)
- ✓ Os amidos de cará e inhame foram extraídos e caracterizados em colaboração com a Prof. Dra. Elisa Moecke do Laboratório de Microscopia (Depto de Ciência e Tecnologia de alimentos – UFSC).

Além dos reagentes mencionados acima, foram utilizados nos estudos três lipases de diferentes fontes, que estão listadas na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Lipases utilizadas neste trabalho.

Lipases	Nome comercial ou Sigla	Atividade <sup>(c)</sup>
<i>Pseudomonas</i> sp.	LPS <sup>(a)</sup>	30000 u/g
<i>Rhizopus oryzae</i>	LRO <sup>(a)</sup>	150000 u/g
<i>Candida antarctica</i>	Novozym 435 <sup>(b)</sup> CALB	10000 PLU/g

(a)Amano Pharmaceuticals CO. (b) Novozymes, (c) A atividade catalítica (Amano) é definida como a quantidade de enzima que libera um  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto (unidade/grama (u/g)). Para a lipase de *C. antarctica*, a unidade é expressa em unidades de lipase/grama (LU/g).

### 3.2. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.

As reações de epoxidação e formação de oxaziridinas foram realizadas com o auxílio de um banho termostatizado MQBTZ99-20 (Microquímica) e com quatro agitadores magnéticos da Microquímica – MQAMA-301, um tipo Dubnoff da Technal –TE069 e outro tipo orbital da Technal-TE053.

Os reagentes e produtos foram caracterizados por técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono (RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) e de infravermelho (IV). Os espectros de RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram obtidos em um espectrômetro Varian (400MHz), utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS,  $\delta = 0,00$  ppm). Os solventes utilizados foram o  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

As análises de infravermelho (IV) foram feitas em um espectrofotômetro ABB Bomem FTLA 2000-100, e a caracterização através da comparação dos sinais com padrões da literatura.

Para os compostos sólidos foram feitas caracterizações por ponto de fusão em um aparelho Marca Microquímica Modelo APF-301. Os

dados de ponto de fusão foram comparados quando possível, com os reportados na literatura e não foram corrigidos.

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 4**.

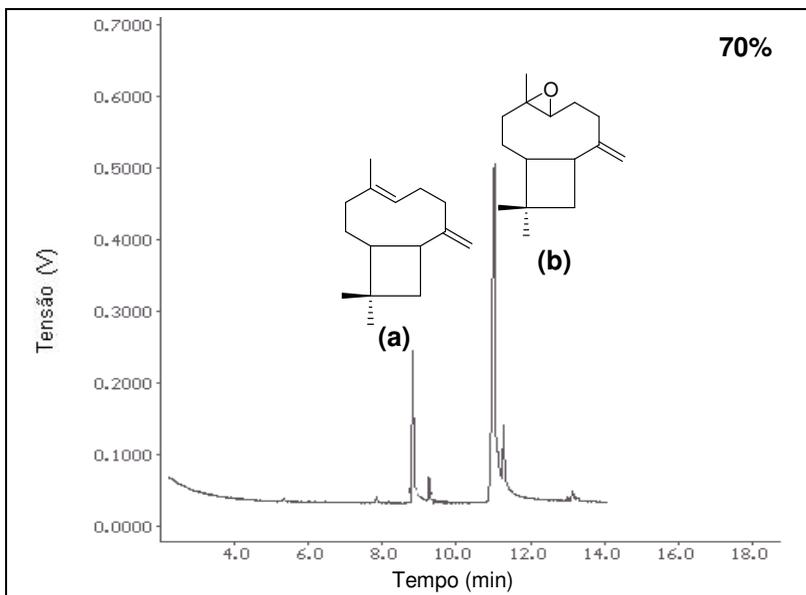
**Tabela 4.** Parâmetros usados nas análises por cromatografia gasosa.

<b>Parâmetros</b>	
temperatura Inicial	80 °C
temperatura Final	250 °C
taxa de Aquecimento	8 °C/min
injetor: split 200	280 °C
detector: FID	290 °C
pressão do gás carreador (H <sub>2</sub> )	75kPa
volume da Amostra	1µL

A conversão em produtos foi obtida através da razão das áreas dos picos dos reagentes e produto, de acordo com a **Equação 2**.

$$(\%) \text{ conv.} = \frac{\text{área do pico do produto}}{\text{área do produto} + \text{área do reagente}} \times 100 \quad \text{Eq.2}$$

Por exemplo, na **Figura 39**, está demonstrado o cromatograma de uma alíquota da reação de epoxidação do  $\alpha$ -cariofileno (**a**) em 16h de reação. A conversão em óxido de cariofileno (**b**) foi de 70%.



**Figura 39.** Cromatograma de uma alíquota da reação de epoxidação do  $\square$ -cariofileno em 16h. [Condições reacionais: diclorometano, (5mL), CALB (25 mg), UPH (5 mmol), t.a., 16h, 150 rpm].

As análises de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas foi realizada em Aparelho Shimadzu GC-17B que está localizado no Laboratório de Química Analítica coordenado pelo Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha (DQ-UFSC). Os espectros de massas foram comparados com os disponíveis em um banco de dados fornecido pela Shimadzu.

As análises para determinação dos perácidos foram também realizadas por eletroforese capilar de zona em um aparelho Agilent Technologies modelo HP3DCE. Este aparelho está localizado no Laboratório de Eletroforese Capilar (LABEC), que é coordenado pelo Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke (DQ-UFSC). (**Figura 40**)



**Figura 40.** Aparelho de eletroforese capilar utilizado nas determinações de perácidos.

### 3.3. MÉTODOS EXPERIMENTAIS

#### 3.3.1. Imobilização da lipase de *Pseudomonas sp.* (LPS) em diferentes suportes.

Para a imobilização da LPS utilizou-se 50mg da enzima, quantidades variadas dos suportes, sendo estes o caseinato de sódio (CS), amido de cará (AC) e inhame (AI), gelatina (G), álcool polivinílico (PVA) e montmorilonita K10 (K10).

Para a preparação dos filmes de CS, AC, AI, e G, utilizaram-se massas variadas dos suportes (0,5-1,5 g) e 25 mL de água destilada. O glicerol foi adicionado (0-0,5 g) como agente plastificante.<sup>115</sup>

As quantidades usadas na preparação dos suportes estão demonstradas na **Tabela 5**.

**Tabela 5.** Quantidades usadas e condições necessárias para a imobilização da LPS<sup>(a)</sup> em diferentes suportes.

Entrada	Suporte	Suporte (g)	Glicerol (g)	Tempo (min) <sup>(b)</sup>
1	CS	1,5	0,5	120
2	AC	1,0	0,3	20
3	AI	1,0	0,3	20
4	G	1,0	0,3	20
5	PVA	0,5	-	10
6	K10	1,0	-	300

(a) 50mg de LPS imobilizada. (b) tempo necessário para solubilização da LPS no suporte na fase de preparação.

A mistura foi mantida sob agitação magnética por intervalos de 20 min à 5 h e secos por 24 h na capela. Os filmes secos obtidos foram

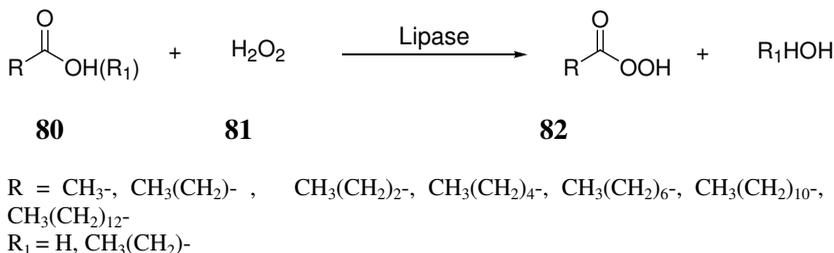
cortados em pedaços de aproximadamente 2 mm<sup>2</sup> e posteriormente utilizados nas reações de epoxidação da (-)-carvona.

Para a preparação do suporte LPS/K10 (Entrada 6), foi necessário a adição de 1 g de suporte e 30 mL de água em com 50 mg de LPS. A mistura foi submetida à agitação por 5 h.

Após a agitação, o material obtido foi filtrado em funil de buchner e seco na capela por 12 h. O suporte K10/LPS foi finamente triturado na forma de pó<sup>116</sup> e posteriormente utilizado na epoxidação da (-)-carvona.

### 3.3.2. Determinação dos perácidos.

Os perácidos (**82**) foram preparados utilizando ácidos carboxílicos (ex. ácido acético, propanóico) ou éster (**80**) com peróxido de hidrogênio (**81**) na presença das lipases de *C. antarctica*, (CALB), de *Pseudomonas* sp. (LPS) e de *R. oryzae* (LRO), conforme descrito na **Figura 41**.



**Figura 41.** Preparação de perácidos catalisada por lipases.

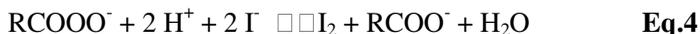
A quantificação dos perácidos formados na peridrólise dos ácidos acético, *n*-propanóico, *n*-butanóico, *n*-hexanóico, *n*-octanóico, láurico, palmítico, malônico e benzóico, foi realizada através de titulação iodométrica. Utilizou-se um balão de fundo redondo de 125 mL, e neste foram adicionados 5 mL de água destilada, 10 mmol de peróxido de hidrogênio aquoso (30%), 6 mL de tolueno ou acetonitrila, 50 mg de diversas lipases e 5 mmoles do doador acila (ácidos carboxílicos ou éster).

Após 30 min de reação foi retirada uma alíquota de 5 mL da reação. Em seguida adicionou-se 30 mL de etanol absoluto e então titulou a amostra com uma solução de  $3,6 \times 10^{-3}$  mol. L<sup>-1</sup> de KMnO<sub>4</sub> para a determinação residual de peróxido de hidrogênio (**Equação 3**).

A reação estará completa quando a solução estiver com coloração marrom.<sup>117</sup>



Após esta etapa, adiciona-se, 20 mL de uma solução de iodeto de potássio 1M. Neste caso, o perácido formado reage com os íons iodetos ( $\Gamma$ ), formando a espécie  $\text{I}_2$  que apresenta coloração marrom em solução. A reação ocorre de acordo com a **Equação 4**.



O  $\text{I}_2$  liberado é titulado com uma solução  $2,8 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  até que a solução adquira coloração incolor, denotando o consumo total de iodo ( $\text{I}_2$ ) (**Equação 5**)



Portanto, a concentração de iodo determinada é a mesma do perácido formado pelas lipases. Os resultados obtidos estão demonstrados na Seção 4.2.

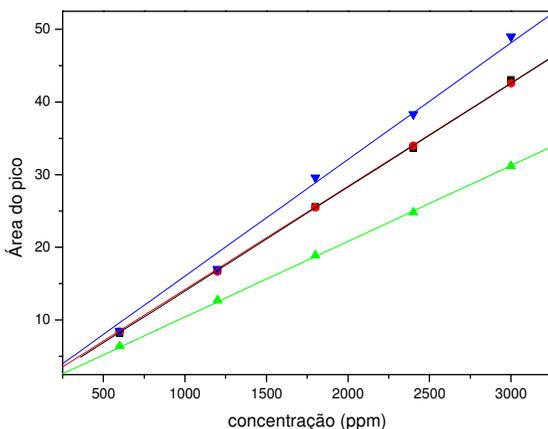
Outro método utilizado para a determinação de perácidos foi a eletroforese capilar de zona.

As reações foram realizadas em erlenmeyers de 125 mL com agitação orbital utilizando quantidades variadas das lipases CALB, LPS e LRO (25-100 mg), 2,5 mmol dos ácidos acético, *n*-propanóico, *n*-butanóico e *n*-hexanóico em 10 mL de acetonitrila, e 5 mmol de uréia peróxido de hidrogênio (UPH) em 12 h de reação. Não foram usados com esse método, ácidos carboxílicos de cadeias maiores por problemas de solubilidade deste no eletrólito.

Após 12 h de reação, o procedimento analítico baseou-se em diluir os perácidos resultantes em acetonitrila (1: 9 v/v) e analisar no equipamento de eletroforese capilar, com detector de arranjo de diodos.

O eletrólito foi composto por  $20 \text{ mmolL}^{-1}$  de tetraborato de sódio (TBS) em água (pH 9,30) e  $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$  de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Utilizou-se injeção hidrodinâmica 50 mbar durante 5 s, tensão de 30 kV, polaridade negativa, em coluna capilar de sílica fundida com revestimento externo de poliimida (48,5 cm x 50  $\mu\text{m}$  D.I. x 375  $\mu\text{m}$  D. E.) da marca Polymicro (Phoenix, AZ, USA), à 25°C com detecção direta em 200 nm.

A determinação dos perácidos foi feita baseando-se no consumo dos respectivos ácidos carboxílicos, com o auxílio de curvas de calibração para cada ácido, construída a partir da área do pico do ácido em função de sua concentração (520-3000ppm) conforme demonstrado na **Figura 42**. Os resultados obtidos serão apresentados na Seção 4.2.



**Figura 42.** Variação da área do pico dos ácidos carboxílicos no eletroferograma em função da concentração (ppm) dos ácidos (□) acético, (●) propanóico, (□) butanóico e (□) hexanóico obtidos por eletroforese capilar de zona. [acetoneitrila (1: 9 v/v) TBS (20 mmolL<sup>-1</sup> pH 9,30, CTAB (0,2 mmolL<sup>-1</sup>), 50 mbar, 5s, 30 kV, 25°C].

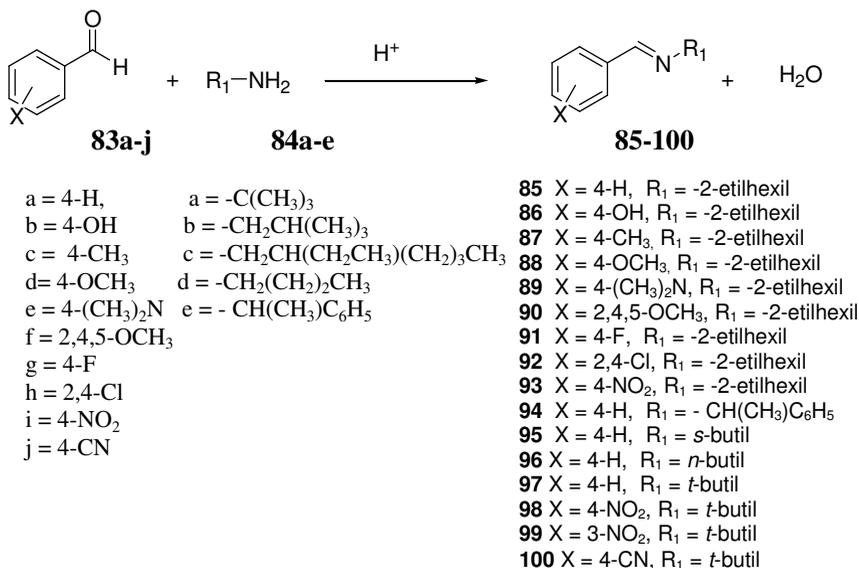
### 3.3.3. Preparação e caracterização das iminas.

As iminas foram preparadas conforme metodologias já descritas na literatura<sup>118</sup> através da reação de condensação de aldeídos e aminas apropriadas em meio ácido (**Figura 43**).

Utilizou-se 10 mmol de derivados substituídos do benzaldeído **83a-j** e 10,2 mmol de aminas **84a-e** em 20 mL de etanol absoluto e 0,1 mL de ácido acético glacial como catalisador. O sistema foi mantido em refluxo por até 30 h e a reação acompanhada por CCD utilizando como eluente uma mistura de hexano:acetato de etila 80:20 v/v. Ao final da reação, o meio foi resfriado e neutralizado com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>. Em seguida a fase orgânica foi extraída com diclorometano (3 x 15mL). Adicionou-se em seguida sal secante (MgSO<sub>4</sub>) e a fase orgâni-

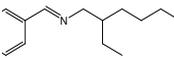
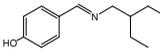
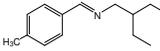
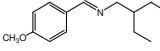
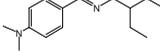
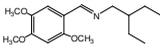
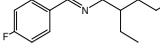
ca concentrada em rota-evaporador. Os compostos obtidos **85-96** foram obtidos como óleos.

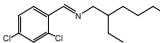
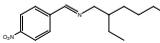
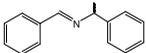
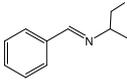
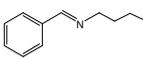
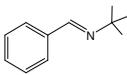
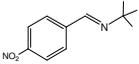
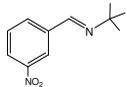
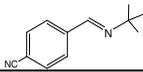
Na preparação dos compostos **97-100**, os produtos precipitaram após a mistura dos reagentes à temperatura ambiente usando éter de petróleo como solvente. Os produtos obtidos foram filtrados e recristalizados com etanol à frio, e determinado o rendimento. As caracterizações espectroscópicas foram feitas pelas técnicas citadas no item **3.2**. Os dados analíticos e espectroscópicos para as iminas preparadas estão demonstradas na **Tabela 6**.



**Figura 43.** Preparação de N-alkyliminas derivadas de benzaldeídos aromáticos.

**Tabela 6.** Dados analíticos e espectroscópicos das iminas **85-100**.

Imina	Estrutura	Massa (g)	IV (cm <sup>-1</sup> ) C=N <sup>a</sup>	RMN		P.F (°C) <sup>d</sup>	Rend <sup>e</sup> (%)
				<sup>1</sup> H <sup>b</sup> (□ppm)	<sup>13</sup> C <sup>c</sup> (□ppm)		
85		1,78	653	8,24	66,00	-	82
86		1,96	1670	8,04	63,00	-	84
87		2,08	1683	8,08	62,59	-	90
88		2,20	1657	8,25	61,46	-	89
89		2,47	1661	8,10	60,00	-	95
90		2,71	1690	7,93	57,00	-	88
91		2,28	1673	8,20	64,12	-	97

<b>92</b>		2,64	1628	8,59	65,25	-	92
<b>93</b>		1,1	1630	8,47	60,40	-	77
<b>94</b>		1,80	1632	8,36	65,00	-	90
<b>95</b>		1,41	1620	8,16	64,79	-	88
<b>96</b>		1,56	1664	8,18	63,03	-	97
<b>97</b>		1,41	1659	8,27	69,34	170-173 (174-175) <sup>19</sup>	88
<b>98</b>		1,62	1644	8,33	63,89	71-73 (73-75) <sup>120</sup>	95
<b>99</b>		1,55	1639	8,59	64,79	62-65	81
<b>100</b>		1,48	1640	8,29	65,31	55-57	60

(a) Banda na região do IV referente à deformação axial da ligação C=N. (b) pico referente ao hidrogênio imínico. (c) pico referente ao carbono imínico, (d) os compostos **85-96**, apresentaram-se à t.a. como óleo e não foi determinado seu ponto de fusão. (e) rendimento do produto obtido (isômero *E*).

### 3.3.4. Preparação de epóxidos e oxaziridinas pelo método químio-enzimático.

Para a preparação deste meio reacional foram utilizados erlenmeyers de 125 mL ou frascos âmbar de 60 mL, 0,2-2,5 mmol de substratos contendo as ligações duplas C=C ou C=N, 5 mL de solvente orgânico e quantidades variadas de líquidos iônicos (LIs) em sistema bifásico ou monofásico, peróxido de hidrogênio aquoso (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30% (PHA) ou uréia peróxido de hidrogênio (UPH) como doadores peróxidos (0,4-5 mmol), quantidades variadas e diversos ácidos carboxílicos ou acetato de etila como doadores acila, bem como quantidades variadas de lipases livres ou imobilizadas.

O sistema foi mantido a temperatura constante de 30<sup>0</sup>C ou ambiente, em banho termostaticado conforme mostrado na **Figura 44**. Foram utilizadas diferentes formas de agitação tais como a magnética, Dubnoff e orbital.

Foram retiradas alíquotas das reações em tempos pré-determinados e analisadas por RMN-<sup>1</sup>H e/ou CG.



(a)



(b)



(c)

**Figura 44.** Representação gráfica dos sistemas reacionais sob agitação (a) magnética, (b) tipo Dubnoff e (c) orbital (também chamada de circular).

Estes sistemas serão usados e estudados de forma particular na oxidação dos diferentes substratos os quais serão demonstrados nos resultados e discussão.

### 3.3.5. Preparação do 2-metil-5-(2-metil-2-oxiranil) 2-cicloexen-1-ona (102)

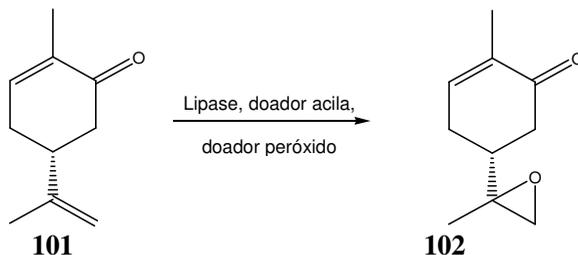


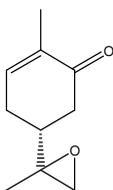
Figura 45. Epoxidação químico-enzimática da (-)-carvona.

Em um erlenmeyer de 125 mL, foram adicionados 415 mg (2,5 mmol) de (-)-carvona (**101**), e 50 mg das lipases de *C. antarctica* (CALB) ou de *Pseudomonas* sp. (LPS) livre ou imobilizada em filmes de CS, AC, AI, G, e PVA. A LPS foi também imobilizada em outro suporte como o K10.(Seção 3.3.1.) em 10 mL de diclorometano. Em seguida, adicionou-se 360 mg (2,5 mmol) do ácido octanóico com doador acila e 470 mg (5 mmol) de UPH como doador peróxido.

A reação foi mantida em temperatura ambiente (~25°C) sob agitação orbital de 150 rpm. Foram retiradas alíquotas da reação e analisadas por CG para a determinação da conversão (%) no epóxido **102**. Após o término da reação, a mistura reacional foi filtrada, lavada e purificada com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>.

A mistura reacional obtida foi purificada usando uma coluna de sílica e eluída com mistura de hexano:acetato de etila 70:30 v/v. O produto **102** isolado foi caracterizado por RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e os dados espectroscópicos foram comparado com os da literatura.<sup>121</sup>

#### 2-metil-5-(2-metil-2-oxiranil) 2-cicloexen-1-ona - (102)



C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub> = 166,10 g/mol

óleo amarelo

rendimento: 400 mg (90%)

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 4,63-4,57 (d, 2H), 3,31 (t, 1H), 2,55-2,52 (m, 1H), 2,45-2,37 (m, 1H), 2,25-2,26 (m, 1H), 1,92-1,83 (dd, 1H), 1,81-1,72 (m, 1H), 1,57 (s, 3H), 1,24 (s, 3H);

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> 198,1-198,2, 143,6-143,8, 134,8-134,7, 57,4-57,7, 52,2-51,9, 40,3-40,6, 39,6-39,3, 27,4-27,2 18,0-17,9, 15,0.

**CG (min)** = 9,9 min

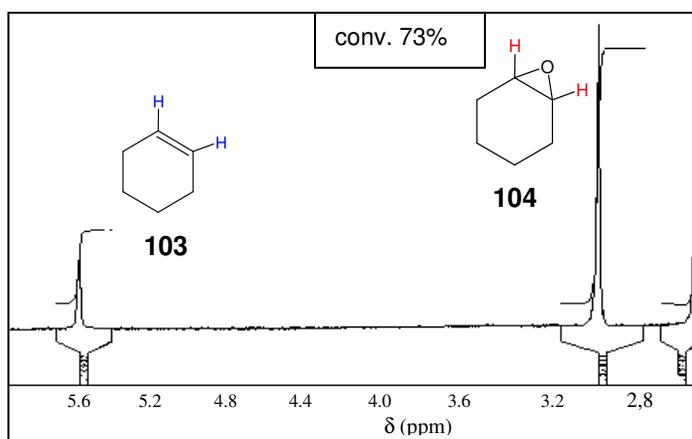
Utilizando esse substrato, foi estudada também a possibilidade de formar o epóxido endocíclico. Neste caso, a reação foi mantida por um período de até 7 dias, e após esse tempo não foi observado a formação do di-epóxido.

### 3.3.6. Preparação do óxido de cicloexeno (**104**).

Em um balão de fundo de redondo, adicionaram-se 0,2 mL (2 mmol) de cicloexeno, 25 mg de CALB em 10 mL de diclorometano ou tolueno e 1 mmol de diferentes doadores acila. Em seguida adicionou-se 190 mg (2mmol) de UPH 0,5 mL (2mmol) de PHA, como doadores peróxidos.

O sistema reacional foi colocado em um reator termostatzado e mantido sob agitação e temperatura constante de 30°C. Foram retiradas alíquotas da reação periodicamente e analisadas por RMN-<sup>1</sup>H, para a determinação da porcentagem de conversão ao correspondente epóxido.

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 **103** centradas em 5,6 ppm e em 3,1 ppm referente aos do epóxido **104**, respectivamente. (**Figura 46**).



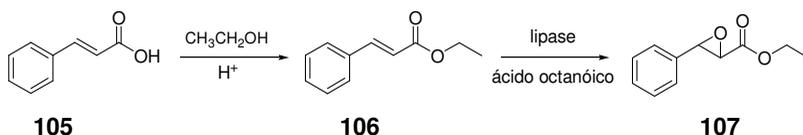
**Figura 46.** Espectro de RMN- <sup>1</sup>H, de uma alíquota da fase orgânica da reação de epoxidação quimio-enzimática do cicloexeno. [cicloexeno, (2 mmol), CALB (50 mg), tolueno (10 mL), ácido octanóico (1 mmol), PHA (2 mmol), 30°C, 6 h, (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz).]

### 3.3.7. Preparação do cinamato de etila (106) e do correspondente epóxido (107).

Para a preparação do éster etílico **106** derivado do ácido cinâmico **105** foram adicionados em balão de fundo redondo, 296 mg (2 mmol) do ácido cinâmico, 15 mL de etanol absoluto com 0,1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. A mistura foi refluxada por 12 h. A formação do éster foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando hexano e acetato de etila 9:1 v/v como eluente.

Ao final da reação, a mistura foi resfriada e transferida para um funil de separação. Adicionou-se 20 mL de uma solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> e diclorometano (20 mL). As fases foram separadas, sendo que a orgânica foi concentrada no rota-evaporador. O éster obtido **106** foi pesado e calculado o rendimento, e posteriormente analisado por técnicas espectroscópicas de IV, RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, e CG.

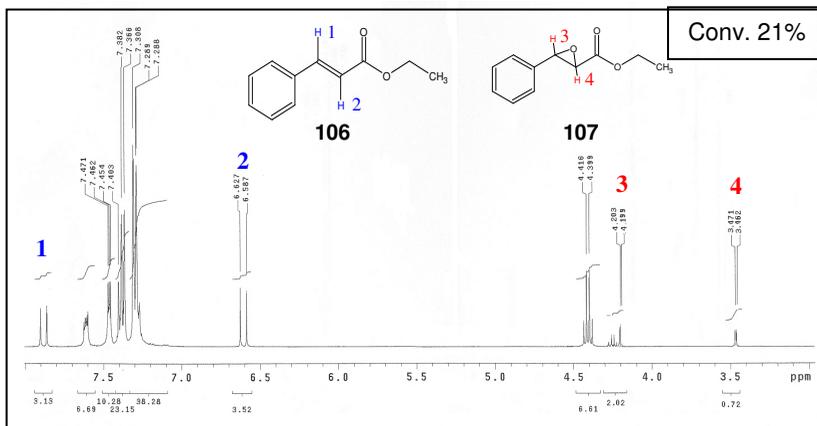
Para a preparação do correspondente epóxido **107** foram adicionados em um erlenmeyer de 125 mL, 148 mg (1 mmol) de **106** com 1 mL (10 mmol) de PHA e 1,44 g (10 mmol) de ácido octanóico. Como biocatalisadores foram utilizados 150 mg da CALB, LPS ou LRO, em sistema bifásico tampão formado com fosfato de potássio pH 9,0(1M)/solvente orgânico (15 mL 50:50 v/v) e 300 mg de NaHCO<sub>3</sub>. As reações foram realizadas a 30°C, com agitação do tipo Dubnoff. (**Figura 47**)



**Figura 47.** Preparação do cinamato de etila e do correspondente epóxido.

Foram retiradas alíquotas da reação para determinar a conversão do produto formado, por um período de até 96 h (4 dias) por RMN-<sup>1</sup>H.

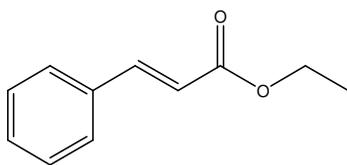
As análises foram feitas por comparação das integrais dos doublets referentes aos hidrogênios ligados ao carbono da ligação dupla do éster cinâmico, centradas em 6,60 e 8,13 ppm com os hidrogênios do epóxido **107** em 3,58 e 4,20 ppm, (**Figura 48**).



**Figura 48.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H, de uma alíquota da fase orgânica da reação de epoxidação quimio-enzimática do cinamato de etila. [(1mmol) de **106**, CALB (150mg), tolueno (10 mL), PHA (10 mmol), ácido octanóico (10 mmol), 30°C, 96 h, (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).]

Nestes estudos, o epóxido **107** não foi isolado. Os dados espectroscópicos obtidos foram comparados com os dados já reportados na literatura.<sup>122</sup>

### (E)-cinamato de etila – (107)



C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub> = 176,08 g/mol

óleo amarelo

rendimento: 309 mg (88%)

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub>(ppm)

7,69(d, *J* = 16Hz, 1H) 6,44(d, *J*<sup>3</sup> =

15,9Hz, 1H) 4,26(q, 2H) 1,34(t,

3H), 6,3-7,63 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)

RMN-<sup>13</sup>C: δ<sub>C</sub>(ppm) 165,9, 143,9,

133,8, 129,9, 128,5,127,8, 117,9,

59,7, 14,1,

IV: ν (cm<sup>-1</sup>) = 2980, 2932, 1711,

1636, 1609, 1262, 813

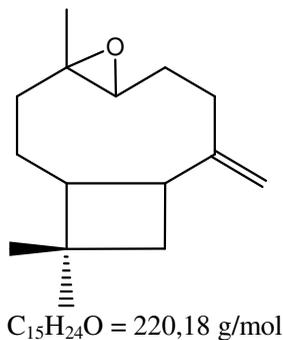
CG (min) = 12.49 min

### 3.3.8. Preparação químico-enzimática dos 4, 12, 12-trimetil-9-metileno-5-oxatriciclo[8.2.0.0.4,6] dodecano (108) e 4, 12, 12-trimetil-spiro [5-oxatriciclo [8.2.0.0.4,6] dodecano-9-2'-oxirano (109).

Para a preparação dos compostos **108**, e **109** utilizou-se em dois erlenmeyers de 125 mL, 0,55g (2,5mmol) de  $\square$ -cariofileno (**110**), 10mL de diclorometano, 50mg de CALB, 144mg (1mmol) de ácido octanóico, à temperatura ambiente. Em cada um dos frascos adicionou-se 470 mg (5 mmol) de UPH e 1,2mL (5mmol) de PHA como doadores peróxido. A reação ficou sob agitação por até 24h. As reações foram acompanhadas por CCD e CG, onde se detectou a formação do mono- e di-epóxidos correspondentes quando se utilizou UPH e PHA respectivamente.

Após o término da reação, a mistura reacional foi lavada com uma solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  e purificada por coluna cromatográfica utilizando como eluente uma mistura de hexano:acetato de etila (7:3 v/v). Os produtos obtidos foram caracterizados por RMN- $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparados com os dados obtidos da literatura.<sup>123</sup>

#### 4, 12, 12-trimetil-9-metileno-5-oxatriciclo[8.2.0.0.4,6] dodecano – (108)



Sólido branco

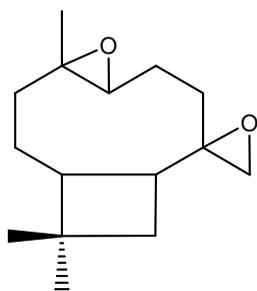
rendimento: 225 mg (50%)

**RMN- $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  4,96 (s, 1H), 4,85 (1H), 2,86 (q, 1H), 2,60 (d, 1H), 2,32 (m, 1H) 2,22 (q, 1H), 2,10 (m, 2H) 1,53-1,77 (m, 5H), 1,34 (m, 1H) 1,28 (m, 2H) 1,18 (s, 3H), 0,99 (s, 3H), 0,95 (s, 3H)

**RMN- $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  62,0, 59,0, 58,0, 56,0, 49,0, 47,0, 39,0, 35,0, 33,0, 31,0, 30,0, 27,0, 25,0, 22,0, 16,0.

**CG (min)** = 11,0 min

#### 4, 12, 12-trimetil-spiro [5-oxatriciclo [8.2.0.04,6] dodecano-9-2'-oxirano – (109)



$C_{15}H_{24}O_2 = 236,18 \text{ g/mol}$

Sólido branco

rendimento: 224,7 mg (38%)

**RMN-<sup>1</sup>H** ( $CDCl_3$ ):  $\delta_H$  3,09, (q, 1H), 2,98 (d, 1H), 2,88 (q, 1H), 2,67 (t, 2H), 2,56 (d, 1H), 2,36 (m, 1H), 2,10-2,16, (m, 6H), 1,91 (m, 2H), 1,68-1,77 (m, 2H), 1,34-1,65 (m, 2H), 1,34 (s, 3H), 1,28 (s, 3H), 0,97 (s, 3H).

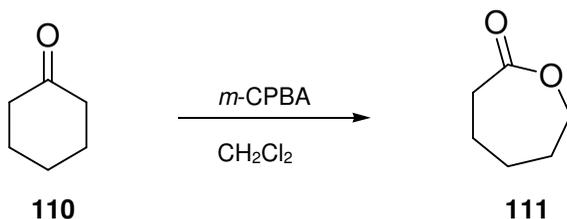
**RMN-<sup>13</sup>C** ( $CDCl_3$ )  $\delta_C$  63,0, 60,0, 50,0, 49,0, 40,0, 39,0, 34,0, 30,1, 29,8, 29,7, 27,2 17,0.

**CG (min)** = 16,5 min

#### 3.3.9. Preparação da $\square$ -caprolactona (111).

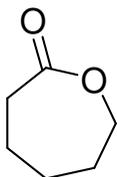
O produto **111** foi preparado utilizando 147mg (1,5mmol) de cicloexanona **110**, 430mg (2,5mmol) de ácido *m*-cloroperbenzóico (*m*-CPBA), 150mg (1,5 mmol) de  $KHCO_3$ , e 20 mL de diclorometano (**Figura 49**).

O sistema foi mantido por refluxo por um período de 12h. A formação do produto foi monitorada por CCD usando a mistura de hexano:acetato de etila 9:1 v/v como eluente. Ao final da reação, a mistura reacional foi resfriada e o *m*-CPBA foi extraído com solução aquosa saturada de  $NaHCO_3$  (3x 20 mL). A fase orgânica foi evaporada e o produto (óleo) obtido foi pesado e calculado o rendimento. Este composto foi usado como padrão para comparação com os obtidos nas reações pelo método enzimático.



**Figura 49.** Preparação de  $\square$ -caprolactona (**111**) por oxidação com *m*-CPBA.

□□caprolactona – (111)



$C_6H_{10}O_2 = 114,07 \text{ g/mol}$

óleo amarelo

rendimento: 214 mg (75%)

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  4,08, (2H, t), 2,25 (2H, t), 1,68 (2H, m), 1,57 (2H, m), 1,29 (2H, m).

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  172,1, 66,1, 29,3, 31,9, 24,8, 33,0.

**CG (min)** = 4,5 min

**EM**  $m/z = 114$  (pico do íon molecular)

Para a preparação de **111** foram testadas diferentes metodologias, sendo algumas delas já descritas na literatura.<sup>124</sup> Os produtos e subprodutos obtidos foram identificados por CG-EM e comparados com o padrão obtido com *m*-CPBA. A conversão total em produtos (%) foi determinada por CG.

Na **Tabela 7** estão descritas as condições experimentais utilizadas para a preparação de **111**.

**Tabela 7.** Condições experimentais testadas para a formação de **111**.

Ent.	Condições reacionais <sup>(a)</sup>	Conversão (%) <sup>(b)</sup>
1	UPH (2mmol)	n.d. <sup>(c)</sup>
2	PHA (2mmol)	n.d.
3	UPH (2mmol), AlCl <sub>3</sub> (150 mg)	30
4	PHA (2mmol), AlCl <sub>3</sub> (150 mg)	60
5	PHA (2mmol), alumina (150mg)	45

(a) **110** (1mmol), 60 °C, 24h. (b) determinado por CG, (c) n.d. - não detectado

Ao utilizar as condições experimentais descritas acima, as conversões ao produto **111** foram de 0-60%, e não houve a formação de subprodutos, confirmados por CG-EM. As melhores condições para a obtenção do **111** foi utilizando PHA com AlCl<sub>3</sub> obtendo-se o produto com 60% de rendimento. (Entrada 4).

Em seguida utilizou-se para testes, mais quatro condições reacionais com a CALB como biocatalisador (**Tabela 8**).

**Tabela 8.** Metodologias químico-enzimáticas testadas para a formação de  $\epsilon$ -caprolactonas.

Ent.	Condições reacionais <sup>(a)</sup>
1	acetonitrila (10mL), UPH (2,0mmol), ácido octanóico (1,0mmol).
2	acetonitrila (10mL), PHA (2,0mmol), ácido octanóico (1,0mmol).
3	acetato de etila (10mL), UPH (2,0mmol).
4	acetato de etila (10mL), PHA (2,0mmol).

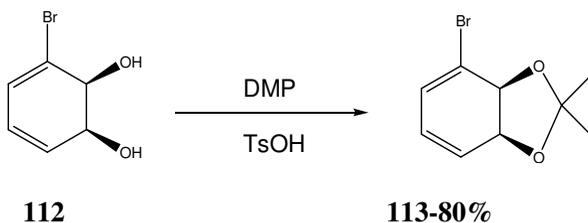
(a) **110** (1 mmol), CALB (50mg), 48h, t.a.

As conversões em **111** foram de 38-68% em função da metodologia empregada. As reações conduzidas em acetato de etila apresentaram após certo tempo, formação de subprodutos, identificados e comparados com padrões por CG-EM. Esses resultados obtidos serão discutidos mais detalhadamente na Seção 4.8.

### 3.3.10. Preparação de epóxidos derivados de ciclohexadienodienóis (**114** e **117**).

Inicialmente, preparou-se o composto **113**, partindo da adição de 500mg (2,7mmol) de **112** em 5 mL de acetona. Em seguida, adicionou-se 2mL (5mmol) de 2,2,-dimetóxiopropano (DMP) e 1mg (0,006 mmol) de ácido *p*-toluenosulfônico. (**Figura 50**)

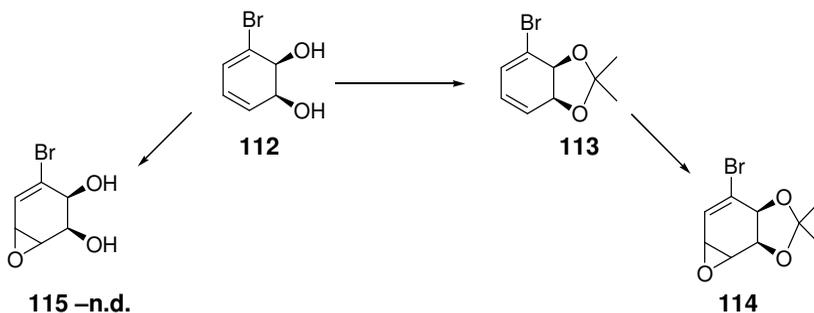
A reação foi mantida sob agitação magnética por 30 min à temperatura ambiente e acompanhada por CCD utilizando como eluente a mistura de hexano:acetato de etila 8:2 v/v. Após o término da reação, o ácido *p*-toluenosulfônico foi neutralizado com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, e a solução foi filtrado e o solvente evaporado. O produto obtido **113** foi pesado e calculado o rendimento (80%).



**Figura 50.** Preparação do composto **113**, com proteção com DMP.

A seguir, fizeram-se duas reações separadamente utilizando a CALB como biocatalisador para a epoxidação dos compostos **112** e **113**. As reações foram realizadas utilizando 0,2 mmol de **112** e **113**, 50mg de CALB, e 47mg (0,5mmol) de UPH, sob agitação orbital de 150 rpm à temperatura ambiente.

Para a epoxidação do **112** e **113**, utilizou-se um sistema com 5 mL de acetato de etila e outro com 30mg (0,2mmol) de ácido octanóico em 5mL de acetonitrila. Ambas as reações foram agitadas em agitador orbital por 12h. (**Figura 51**)



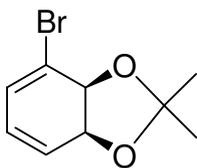
**Figura 51.** Epoxidação químio-enzimática de **112** e **113**. [\*Condições experimentais descritas no texto].

O produto **114** foi obtido somente quando se utilizou o ácido octanóico como doador acila. Neste caso, a mistura reacional foi lavada com solução saturada de carbonato de sódio (3 x 25 mL) e o produto foi purificado em coluna cromatográfica, utilizando como eluente mistura de hexano:acetato de etila 5:5 v/v ( $R_f = 0,30$ ). O produto obtido foi quantificado, calculado o rendimento (25%) e caracterizado por RMN-

<sup>1</sup>H. Os dados foram comparados com os publicados pelo grupo de Biocatálise e Biotransformações da UdelaR e outros autores.<sup>125</sup>

Não foi verificado a epoxidação direta do composto **112** para a obtenção de **115** sem a proteção dos grupos hidroxilas. A proteção dos grupos hidroxila do composto **112** é importante, pois mantém a estabilidade, evitando assim a sua decomposição.<sup>125</sup>

#### 4-bromo-3a, 7a-dihidro-2,2-dimetil, 1,3-benzodioxol – (113)



$C_9H_{11}BrO_2 = 229,09$  g/mol

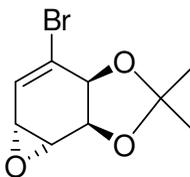
óleo amarelo

rendimento: 494 mg (80%)

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  6,40 (d,d, 1H), 5,89 (d,d 1H), 5,60 (d, 1H), 4,88 (d,d 1H), 4,60 (d,d, 1H), 1,53 (s 3H), 1,40 (s, 3H).

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  134,3, 118,8, 118,7, 118,5, 107,1, 77,1 74,5, 26,8,

#### 4-bromo-3a, 5a, 6a oxireno [e]-1,3-benzodioxol - (114)



$C_9H_{11}BrO_3 = 245,99$  g/mol

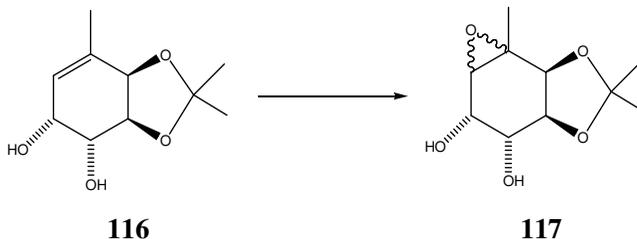
óleo incolor

rendimento: 13 mg (25%)

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  6,47 (d, 1H), 4,87 (d, 1H), 4,40 (d, 1H), 3,58 (d, 1H), 3,33 (d, 1H), 1,40 (s, 3H), 1,25 (s, 3H);

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  129,0, 122,6, 111,6, 77,5, 74,3, 71,0, 48,3, 27,4, 26,3.

Para a formação do composto **117** pelo método químio-enzimático foi adicionado em um frasco de âmbar de 60 mL, 87mg (0,4 mmol) de **116**, 50 mg de CALB, 15mL de acetato de etila, e 94 mg (1mmol) de UPH. (**Figura 52**)

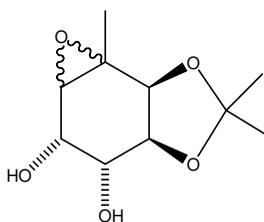


**Figura 52.** Epoxidação químio-enzimática de **116** para a obtenção de **117**. [0,4mmol de **116**, CALB (50 mg), acetonitrila (15 mL), UPH (0,5 mmol), ácido octanóico (0,2 mmol), 24h].

A agitação foi mantida por 24h em agitador orbital à temperatura ambiente. Após o término da reação, a mistura reacional foi filtrada para retirada da CALB, e então se adicionou 10mL de  $\text{CHCl}_3$ . A seguir, a mistura foi eluída em coluna cromatográfica utilizando como eluente à mistura hexano:acetato de etila 50:50 v/v. O produto foi obtido com 65% de rendimento e caracterizado por RMN- $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

Em seguida fez-se outro teste utilizando o mesmo substrato (0,4mmol), juntamente com 50 mg de CALB, 15mL de acetonitrila, 47 mg (0,5mmol) de UPH, e 30 mg (0,2 mmol) de ácido octanóico. Após 24h de reação, o produto **117** foi obtido com 80% de rendimento.

#### 4-metil-5-6-dihidróxi-oxireno[e]-1,3-benzodioxol - (**117**)



$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2 = 216,10 \text{ g/mol}$

óleo incolor

rendimento : 70 mg (80%)

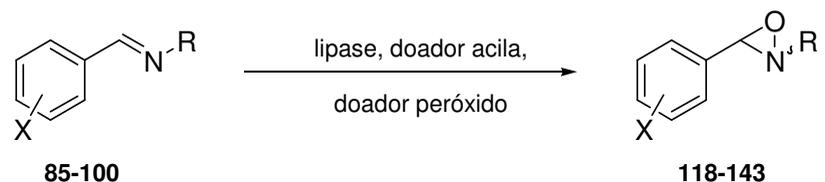
**RMN- $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  4,40 (m, 1H), 4,37 (m, 1H), 4,16 (m, 1H), 3,90 (m, 1H), 3,34 (m, 1H), 2,28 (s, 3H), 1,39 (s, 3H), 1,39 (s, 3H);

**RMN- $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  113,8, 87,6, 71,0, 69,7, 65,0, 62,1, 26,9, 25,4, 13,5.

### 3.3.11. Preparação da N-alquinoxaziridinas derivadas de N-benziliden-alquilaminas.

Em um reator de 60mL de cor âmbar, adicionou-se 0,4mmol de diferentes iminas **85-100**, (Tabela 6), quantidades variadas (0-3mmol) de diferentes doadores acila (ácidos carboxílicos ou acetato de etila), massas diversas de lipases (25-200 mg) (CALB, LPS ou LRO) em solventes orgânicos de diferentes log *P* (10 mL) com ou sem a adição de líquidos iônicos.

Em seguida, foram adicionados 0,4 mmol de diferentes doadores peróxido (UPH ou PHA), e a reação foi mantida à temperatura ambiente. (Figura 53).



X= 4-H, 4-OH, 4-CH<sub>3</sub>, 4-OCH<sub>3</sub>, 4-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N, 2,4,5-OCH<sub>3</sub>, 4-F, 2,4-Cl, 4-NO<sub>2</sub>, 4-CN

R = -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

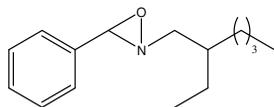
**Figura 53.** Formação químico-enzimática de N-alquinoxaziridinas.

A reação foi monitorada por CCD, utilizando hexano:acetato de etila 9:1 v/v e por CG. A conversão e a seletividade dos produtos formados foram determinadas por CG e RMN-<sup>1</sup>H.

Após o término da reação, a mistura reacional foi filtrada para a retirada do biocatalisador e em seguida adicionou-se 4mL de CHCl<sub>3</sub> para a precipitação da uréia. A mistura obtida foi eluída em coluna de sílica gel para a separação cromatográfica dos produtos obtidos (isômeros *E* e *Z*) utilizando como eluente a mistura citada anteriormente. Para a maioria dos compostos **118-143**, foi necessário repetir a separação cromatográfica para maior pureza e separação dos produtos.

As oxaziridinas obtidas **118-143** foram pesadas, calculados os rendimentos e caracterizadas por técnicas espectroscópicas de RMN-<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e IV. Os compostos preparados **136-143** depois de identificados e caracterizados, foram comparados com dados publicados na literatura quando possível.<sup>126</sup>

**(E)-2-etil-hexil-3-fenil oxaziridina - (118)**



$C_{13}H_{19}NO = 205,15 \text{ g/mol}$

Óleo amarelo

Rendimento: 25 mg, (26%)

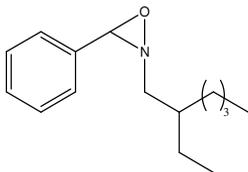
**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  7,41-7,37 (5H, m), 4,47 (1H, s), 2,86-2,75 (2H, m), 1,71 (1H, m), 1,36-1,26 (8H, m), 0,89 (3H, s), 0,87 (3H, s);

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  130,2, 130,1, 128,7, 127,8, 128,6, 80,9, 65,6, 39,5, 34,3, 31,8, 31,2, 29,3, 29,1, 29,0, 25,0, 14,3, 11,0.

**IV** (janela de seleneto de zinco):  $\nu \text{ cm}^{-1}$  2924, 1633, 1549, 1459, 1370, 1270, 731.

**Rf** = 0,43 (hexano:acetato de etila) 9:1v/v

**(Z)-2-etil-hexil-3-fenil oxaziridina - (119)**



$C_{13}H_{19}NO = 205,15 \text{ g/mol}$

Óleo incolor

Rendimento: 11 mg, (10%)

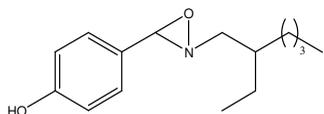
**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  7,41-7,37 (5H, m), 5,25 (1H, s), 2,84-2,73 (2H, m), 1,70 (1H, m), 1,39-1,26 (8H, m), 0,89 (3H, s), 0,87 (3H, s);

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  133,1, 130,2, 128,7, 127,8, 79,9, 63,4, 42,8, 39,5, 34,2, 31,8, 24,4, 23,2, 22,8, 14,1, 11,0.

**IV** (janela de seleneto de zinco):  $\nu \text{ cm}^{-1}$  2962, 1653, 1423, 1375, 1297, 756.

**Rf** = 0,38 (hexano:acetato de etila) 9:1v/v

**(E)-2-etil-hexil-3-4-hidróxi-fenil oxaziridina – (120)**



$C_{13}H_{19}NO_2 = 221,14$  g/mol

óleo castanho claro

rendimento: 15 mg, (15%)

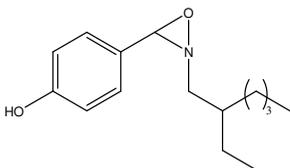
**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  7,51 (2H, d,  $J^3 = 9,5$ Hz), 6,73 (2H, d,  $J^3 = 9,5$ Hz), 4,37 (1H, s), 3,45 (2H, m), 1,65 (1H, m), 1,29-1,19 (8H, m), 0,86-0,83 (6H, s),

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  153,6, 129,9, 119,9, 114,2, 77,2, 62,1, 33,1, 30,4, 26,6, 23,2, 21,8, 12,3, 8,6.

**IV** (janela de seleneto de zinco):  $\nu$  cm<sup>-1</sup> 2960, 1620, 1509, 1459, 1300, 1292, 728.

**Rf** = 0,25 (hexano:acetato de etila) 9:1v/v

**(Z)-2-etil-hexil-3-4-hidróxi-fenil oxaziridina – (121)**



$C_{13}H_{19}NO_2 = 221,14$  g/mol

óleo castanho claro

rendimento: 15 mg, (15%)

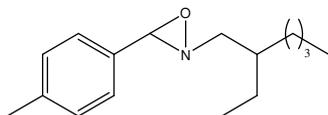
**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  8,02 (2H, d,  $J^3 = 8,8$ Hz), 6,74 (2H, d,  $J^3 = 8,7$ Hz), 5,19 (1H, s), 3,64 (2H, m), 1,59 (1H, m), 1,27-1,11 (8H, m), 0,78-0,71 (6H, s),

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  158,5, 129,9, 115,2, 114,0, 78,3, 66,1, 36,1, 32,4, 29,9, 28,4, 21,2, 12,3, 8,6.

**IV** (janela de seleneto de zinco):  $\nu$  cm<sup>-1</sup> 2979, 1618, 1519, 1400, 1372, 1268, 730.

**Rf** = 0,18 (hexano:acetato de etila) 9:1v/v

**(E)-2-etil-hexil-3-4-metil-fenil oxaziridina – (122)**



$C_{14}H_{21}NO = 219,16 \text{ g/mol}$

óleo incolor

rendimento: 38 mg, (38,4%)

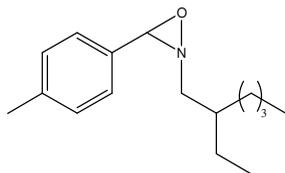
**RMN-<sup>1</sup>H** ( $CDCl_3$ ):  $\delta_H$  7,76 (2H, d  $J^3 = 9,0\text{Hz}$ ), 7,18 (2H, d  $J^3 = 9,2\text{Hz}$ ), 4,44 (1H, s), 2,75-2,73 (m, 2H), 2,33(s, 3H), 1,62, (1H, m), 1,43-0,86 (14H, m).

**RMN-<sup>13</sup>C** ( $CDCl_3$ )  $\delta_C$  136,1, 130,1, 127,3, 125,8, 78,9, 63,7, 37,1, 35,1, 29,9, 27,2, 23,0, 20,7, 12,3.

**IV** (janela de seleneto de zinco):  $\nu \text{ cm}^{-1}$  2890, 1620, 1471, 1374, 1305, 1162, 810.

**Rf** = 0,36 (hexano:acetato de etila) 9:1v/v

**(Z)-2-etil-hexil-3-4-metil-fenil oxaziridina – (123)**



$C_{14}H_{21}NO = 219,16 \text{ g/mol}$

óleo amarelo

rendimento: 15 mg, (15%)

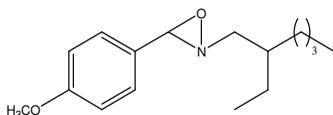
**RMN-<sup>1</sup>H** ( $CDCl_3$ ):  $\delta_H$  8,13 (2H, d  $J^3 = 8,6\text{Hz}$ ), 7,75 (2H, d  $J^3 = 8,6\text{Hz}$ ), 5,21 (1H, s), 2,73 (m, 2H), 2,33 (s, 3H), 1,62-1,28 (8H, m), 0,87-0,86 (6H, s).

**RMN-<sup>13</sup>C** ( $CDCl_3$ )  $\delta_C$  137,6, 128,1, 127,4, 125,8, 77,5, 63,5, 36,9, 29,6, 26,5, 23,0, 21,1, 12,2.

**IV**(janela de seleneto de zinco):  $\nu \text{ cm}^{-1}$  2926, 1622, 1460, 1386, 1216, 818.

**Rf** = 0,30 (hexano:acetato de etila) 9:1v/v

**(E)-2-etil-hexil-3-4-metóxi-fenil oxaziridina – (124)**



$C_{14}H_{21}NO_2 = 235, 16 \text{ g/mol}$

óleo amarelo

rendimento: 70 mg, (66%)

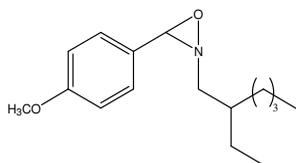
**RMN-<sup>1</sup>H** ( $CDCl_3$ ):  $\delta_H$  7,31 (2H, d  $J^3 = 9,1\text{Hz}$ ), 6,90 (2H, d  $J^3 = 9,0\text{Hz}$ ), 4,40(1H, s), 3,76 (3H, s), 2,77-2,70 (2H, m), 1,66 (1H, m), 1,26 (8H, m), 0,89-0,84 (6H, m).

**RMN-<sup>13</sup>C** ( $CDCl_3$ )  $\delta_C$  159,4, 129,1, 127,2, 112,1, 78,7, 63,7, 53,5, 36,1, 29,8, 28,3, 23,1, 21,7, 12,3.

**IV** (janela de seleneto de zinco):  $\nu \text{ cm}^{-1}$  2929, 1592, 1577, 1506, 1450, 1309, 1257, 1160, 1022, 829.

**Rf** = 0,33 (hexano:acetato de etila)  
9:1v/v

**(Z)-2-etil-hexil-3-4-metóxi-fenil oxaziridina – (125)**



$C_{14}H_{21}NO_2 = 235, 16 \text{ g/mol}$

óleo amarelo

rendimento: 25 mg, (23%)

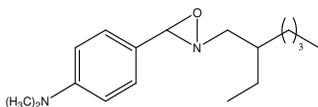
**RMN-<sup>1</sup>H** ( $CDCl_3$ ):  $\delta_H$  7,81 (2H, d  $J^3 = 9,3\text{Hz}$ ), 6,96 (2H, d  $J^3 = 9,2\text{Hz}$ ), 5,17(1H, s), 3,76 (3H, s), 2,77-2,70 (2H, m), 1,65 (1H, m), 1,35-1,25 (8H, m), 0,89-0,84 (6H, m).

**RMN-<sup>13</sup>C** ( $CDCl_3$ )  $\delta_C$  153,4, 130,2, 129,1, 125,2, 112,1, 77,6, 63,6, 53,8, 37,0, 29,8, 29,7, 23,1, 21,7, 12,3.

**IV** (janela de seleneto de zinco):  $\nu \text{ cm}^{-1}$  2928, 1603,1570, 1448, 1451, 1313, 1238, 1156, 1026, 829.

**Rf** = 0,28 (hexano:acetato de etila)  
9:1v/v

**(E)-2-etil-hexil-3-4-N,N-dimetil-fenil oxaziridina – (126)**



$C_{15}H_{24}N_2O = 248,19 \text{ g/mol}$

óleo amarelo escuro

rendimento: 47 mg, (42,5%)

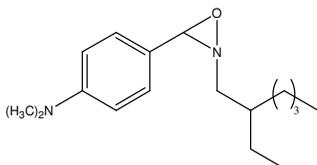
**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  7,61(d, 2H  $J^3 = 9,9\text{Hz}$ ), 6,69 (2H, d  $J^3 = 9,9\text{Hz}$ ), 4,42 (1H, s), 3,48-3,45 (2H, m), 2,99 (6H, s), 1,67(1H, m), 1,30 (8H, m), 0,90-0,88(6H, s).

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  157,4, 126,3, 116,0, 111,2, 72,2, 62,8, 40,0, 34,8, 31,8, 29,3, 25,2, 22,8, 14,3, 11,0.

**IV** (janela de seleneto de zinco):  $\nu \text{ cm}^{-1}$  2959, 1600, 1535, 1480, 1374, 1332, 1292, 1237, 1165, 1113, 849, 721, 630.

**Rf** = 0,36 (hexano:acetato de etila) 9:1v/v

**(Z)-2-etil-hexil-3-4-N,N-dimetil-fenil oxaziridina – (127)**



$C_{15}H_{24}N_2O = 248,19 \text{ g/mol}$

óleo castanho

rendimento: 30 mg, (27%)

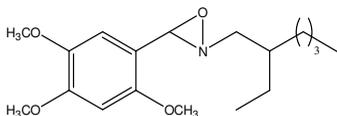
**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  7,61(d, 2H  $J^3 = 9,8\text{Hz}$ ), 6,69 (2H, d  $J^3 = 9,7\text{Hz}$ ), 5,11(1H, s), 3,46-3,44 (2H, m), 2,99(6H, s), 1,78 (1H, m), 1,44 (8H, m), 0,92 (6H, m).

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  157,4, 126,3, 116,0, 111,2, 70,2, 62,3, 40,1, 34,8, 31,8, 29,3, 25,2, 22,8, 14,3, 11,1.

**IV**(janela de seleneto de zinco):  $\nu \text{ cm}^{-1}$  2960, 1600, 1459, 1377, 1332, 1289, 1167, 1101, 852, 757, 724, 627.

**Rf** = 0,32 (hexano:acetato de etila) 9:1v/v

**(E)-2-etil-hexil-3-2,3,5-trimetóxi-fenil oxaziridina – (128)**



$C_{16}H_{25}NO_4 = 295,18 \text{ g/mol}$

óleo alaranjado

rendimento: 60 mg, (46%)

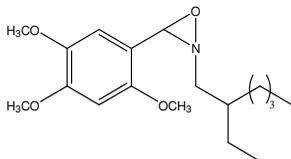
**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  7,72 (1H s), 6,47 (1H, s), 3,99 (1H, s), 3,95 (3H, s), 3,90 (3H, s), 3,83 (3H, s), 2,29(2H, m), 1,59 (1H, m) 1,28-1,27(8H, m), 0,88 (6H, m);

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  151,8, 142,4, 111,7, 96,8, 70,9, 56,5, 36,9, 29,3, 29,1, 25,1, 23,7, 14,3, 10,6.

**IV**(janela de seleneto de zinco):  $\nu \text{ cm}^{-1}$  2980, 1607, 1507, 1459, 1408, 1285, 1224, 1122, 1029, 876.

**Rf** = 0,19 (hexano:acetato de etila) 9:1v/v

**(Z)-2-etil-hexil-3-2,3,5-trimetóxi-fenil oxaziridina – (129)**



$C_{16}H_{25}NO_4 = 295,18 \text{ g/mol}$

óleo alaranjado escuro

rendimento: 38 mg, (29%)

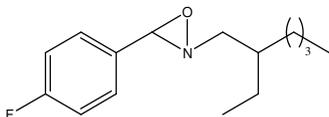
**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  7,66 (1H s), 6,43 (1H, s), 5,27 (1H, s), 3,90 (3H, s), 3,85 (3H, s), 3,80 (3H, s), 2,25 (2H, m), 1,55(1H, m), 1,26 (8H, m), 0,81(6H, m);

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  151,8, 142,5, 109,2, 99,9, 70,9, 56,4, 56,3, 36,9, 34,4, 30,3, 29,3, 28,6, 25,1, 22,8, 14,2, 10,6.

**IV** (janela de seleneto de zinco):  $\nu \text{ cm}^{-1}$  2962, 1608, 1460, 1378, 1332, 1285, 1165, 1100, 848, 757, 722, 618.

**Rf** = 0,11 (hexano:acetato de etila) 9:1v/v

**(E)-2-etil-hexil-3-4-flúor-fenil oxaziridina – (130)**



$C_{13}H_{18}FNO = 223,14 \text{ g/mol}$

óleo incolor

rendimento: 28 mg, (28%)

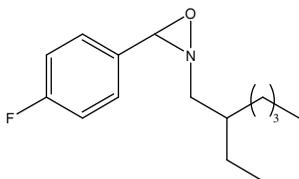
**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  7,38 (2H, m), 7,04 (2H, m), 4,45 (1H, s), 2,82-2,72 (2H, m), 1,62 (1H, m), 1,43-0,81 (14H, m).

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  165,3, 155,4, 132,9, 132,8, 131,4, 129,7, 115,6, 80,0, 62,5, 39,1, 31,8, 31,7, 24,8, 23,2, 14,3, 11,0.

**IV** (janela de seleneto de zinco):  $\nu$  cm<sup>-1</sup> 2932, 1603, 1541, 1480, 1260, 1104, 829, 610.

**Rf** = 0,29 (hexano:acetato de etila) 9:1v/v

**(Z)-2-etil-hexil-3-4-flúor-fenil oxaziridina - (131)**



$C_{13}H_{18}FNO = 223,14 \text{ g/mol}$

óleo incolor

rendimento: 13 mg, (13%)

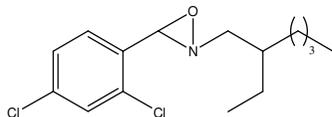
**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  7,55 (2H, m), 7,15 (2H, m), 5,23 (1H, s), 2,93-2,78 (2H, m), 1,85-1,82 (1H, m), 1,60-0,89 (14H, m).

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  162,8, 155,4, 162,8, 132,8, 131,5, 131,1, 115,8, 77,6, 62,5, 39,1, 34,3, 31,6, 29,2, 25,0, 14,3, 10,6.

**IV** (janela de seleneto de zinco):  $\nu$  cm<sup>-1</sup> 2932, 1603, 1541, 1480, 1260, 1104, 829, 610.

**Rf** = 0,20 (hexano:acetato de etila) 9:1v/v

**(E)-2-etil-hexil-3-2,4-dicloro-fenil oxaziridina - (132)**



$C_{13}H_{17}Cl_2NO = 273,07 \text{ g/mol}$

sólido branco (Pf = 118°C)

rendimento: 40 mg, (33%)

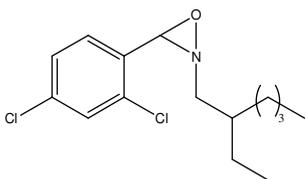
**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  7,44-7,30 (3H, m), 4,91 (1H, s), 2,93-2,70 (2H, m), 1,64 (1H, m), 1,28-1,26 (8H, m), 0,86 (6H, m).

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  134,2, 133,4, 129,3, 127,5, 126,1, 125,4, 75,2, 63,7, 37,4, 30,0, 27,4, 23,3, 21,4, 21,0, 12,1, 9,7.

**IV**(KBr):  $\nu \text{ cm}^{-1}$  2960, 1608, 1469, 1390, 1258, 1140, 1080, 829, 818.

**Rf** = 0,36 (hexano:acetato de etila) 9:1v/v

**(Z)-2-etil-hexil-3-2,4-dicloro-fenil oxaziridina - (133)**



$C_{13}H_{17}Cl_2NO = 273,07 \text{ g/mol}$

óleo verde-claro

rendimento: 15 mg, (12,5%)

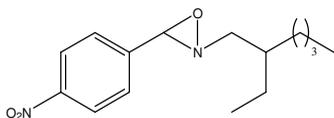
**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  7,74-7,61 (3H, m), 5,39 (1H, s), 2,95-2,73 (2H, m), 1,61 (1H, m), 1,28 (2H, m), 1,28-0,87 (14H, m).

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  134,2, 133,4, 129,3, 129,2, 127,5, 126,0, 75,2, 63,7, 37,4, 32,2, 30,1, 27,4, 23,2, 21,4, 12,3, 9,8.

**IV** (janela de seleneto de zinco):  $\nu \text{ cm}^{-1}$  2930, 1690, 1503, 1459, 1285, 810.

**Rf** = 0,32 (hexano:acetato de etila) 9:1v/v

**(E)-2-etil-hexil-3-4-nitro-fenil oxaziridina – (134)**



$C_{13}H_{18}N_2O_3 = 250,13 \text{ g/mol}$

óleo avermelhado

rendimento: 26 mg, (31%)

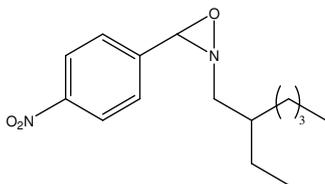
**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  8,26 (d, 2H,  $J^3 = 9,7\text{Hz}$ ), 7,62 (d, 2H,  $J^3 = 9,7\text{Hz}$ ), 4,61 (1H, s), 2,95-2,74 (2H, m), 1,63 (1H, m), 1,29 (2H, m), 1,28-0,89 (14H, m).

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  131,2, 130,4, 127,3, 126,2, 125,5, 124,0, 77,2, 64,7, 36,5, 33,2, 31,1, 28,4, 22,2, 20,4, 11,3, 10,8.

**IV** (janela de seleneto de zinco):  $\nu \text{ cm}^{-1}$  3000, 1695, 1528, 1462, 1302, 808.

**Rf** = 0,25 (hexano:acetato de etila) 9:1v/v

**(Z)-2-etil-hexil-3-4-nitro-fenil oxaziridina – (135)**



$C_{13}H_{18}N_2O_3 = 250,13 \text{ g/mol}$

óleo avermelhado

rendimento: 18 mg, (20%)

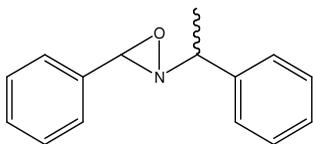
**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  8,15 (d, 2H,  $J^3 = 9,8\text{Hz}$ ), 7,61 (d, 2H,  $J^3 = 9,8\text{Hz}$ ), 5,31 (1H, s), 2,93-2,71 (2H, m), 1,60 (1H, m), 1,25 (2H, m), 1,24-0,87 (14H, m).

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  134,8, 133,4, 129,8, 129,4, 126,5, 126,0, 76,2, 62,7, 35,4, 31,2, 30,9, 28,3, 24,5, 22,5, 13,3, 9,5.

**IV** (janela de seleneto de zinco):  $\nu \text{ cm}^{-1}$  2990, 1693, 1500, 1444, 1270, 809.

**Rf** = 0,20 (hexano:acetato de etila) 9:1v/v

**(E)-2-(+)-metil-fenil-3-fenil oxaziridina – (136)**



$C_{15}H_{15}NO = 225,12 \text{ g/mol}$

óleo incolor

rendimento: 18 mg, (19%)

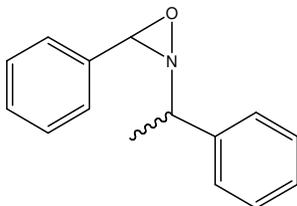
**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  7,33–7,43 (m, 10H), 4,40 (s, 1H), 3,38 (q,  $J^3 = 6.9 \text{ Hz}$ , 1H), 1,51 (d,  $J^3 = 6,9 \text{ Hz}$ , 3H),

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  19,7, 70,3, 80,3, 127,0, 127,6, 128,5, 128,6, 129,1, 130,0, 134,8, 141,8.

**IV** (janela de seleneto de zinco):  $\nu \text{ cm}^{-1}$  3060, 3037, 2984, 2933, 1495, 1454, 1402.

**Rf** = 0,40 (hexano:acetato de etila) 9:1v/v

**(Z)-2-(+)-metil-fenil-3-fenil oxaziridina - (137)**



$C_{15}H_{15}NO = 225,12 \text{ g/mol}$

óleo incolor

rendimento: 12 mg, (11%)

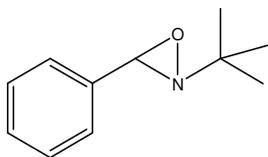
**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  7,23–7,43 (m, 10H), 5,04 (s, 1H), 3,35 (q,  $J^3 = 6.9 \text{ Hz}$ , 1H), 1,55 (d,  $J^3 = 6,9 \text{ Hz}$ , 3H).

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  18,5, 71,4, 81,3, 124,5, 126,8, 129,5, 130,6, 131,1, 132,0, 134,8, 141,8.

**IV** (janela de seleneto de zinco):  $\nu \text{ cm}^{-1}$  3068, 3043, 2984, 2933, 1505, 1452, 1402.

**Rf** = 0,32 (hexano:acetato de etila) 9:1v/v

**(E)-2-tercbutil-3-fenil oxaziridina - (138)**



$C_{11}H_{15}NO = 177,12 \text{ g/mol}$

óleo incolor

rendimento : 33 mg, (29%)

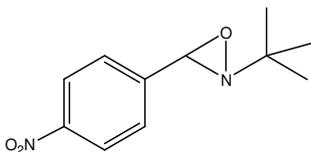
**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  7,60-7,00 (5H, m), 4,69 (1H, s), 1,12 (9H, m).

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  133,9, 129,9, 127,9, 127,3, 73,5, 58,3, 25,3.

**IV** (janela de seleneto de zinco):  $\nu$  cm<sup>-1</sup> 3070, 2980, 1600, 1560, 1340, 1135

**Rf** = 0,36 (hexano:acetato de etila) 9:1v/v

**(E)-2-tercbutil-3-4-nitro-fenil oxaziridina - (139)**



$C_{11}H_{14}N_2O_3 = 222,10 \text{ g/mol}$

sólido amarelo (p.f. = 64-65°C, lit. 66 °C) rendimento: 22 mg, (19%)

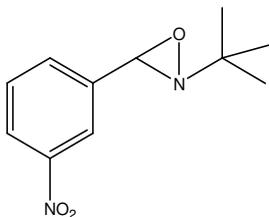
**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  7,82 (d, 2H,  $J^3 = 9,5\text{Hz}$ ), 7,30 (d, 2H,  $J^3 = 9,5\text{Hz}$ ), 4,70 (s, 1H), 1,15 (s, 9H).

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  147,6, 138,5, 123,6, 123,1, 72,3, 58,9, 25,2.

**IV** (janela de seleneto de zinco):  $\nu$  cm<sup>-1</sup> 3061, 2982, 1598, 1340, 1137

**Rf** = 0,28 (hexano:acetato de etila) 9:1v/v

**(E)-2-tercbutil-3-3-nitro-fenil oxaziridina - (140)**



$C_{11}H_{14}N_2O_3 = 222,10 \text{ g/mol}$

óleo amarelo

rendimento: 20 mg (17%)

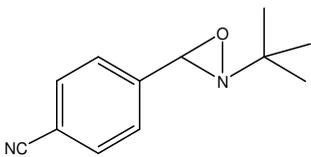
**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  8,11 (s, 1H), 8,11 (d, 1H) 7,64 (d,d, 1H), 7,60 (s, 1H), 4,73 (s, 1H), 1,15 (s, 9H)

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  148,7, 143,6, 130,6, 127,9, 123,9, 117,9, 75,1, 58,5, 25,1.

**IV** (janela de seleneto de zinco):  $\nu$  cm<sup>-1</sup> 3052, 1600, 1580, 1465, 1304, 1090.

**Rf** = 0,30 (hexano:acetato de etila) 9:1v/v

**(E)-2-tercbutil-3-4-ciano-fenil oxaziridina - (141)**



$C_{12}H_{14}N_2O = 202,11 \text{ g/mol}$

óleo amarelo

rendimento : 38 mg, (41%)

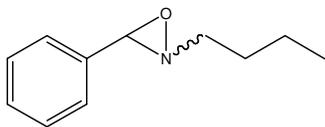
**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  7,78 (s, 1H), 7,75 (d, 1H), 7,70 (d,d, 1H), 7,47 (d, 1H), 4,80 (s, 1H), 1,16 (s, 9H).

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  134.2, 133.4, 129.3, 129.2, 127.5, 126.0, 75.2, 63.7, 37.4, 32.2, 30.1, 27.4, 23.2, 21.4, 12.3, 9.8.

**IV** (janela de seleneto de zinco):  $\nu$  cm<sup>-1</sup> 2990, 2245, 16150, 1503, 1419, 1235, 1187, 808.

**Rf** = 0,27 (hexano:acetato de etila) 9:1v/v

**(*E,Z*)-2-*n*-butil-3-fenil oxaziridina - (142)**

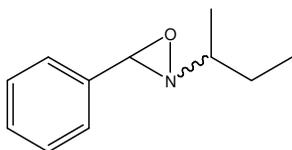


$C_{11}H_{15}NO = 177,12 \text{ g/mol}$

mistura de isômeros, óleo incolor  
rendimento bruto: (40%, 44,7 mg)  
**RMN-<sup>1</sup>H** ( $CDCl_3$ ):  $\delta_H$  7,5-7,1 (m, 10H),  
4,47 (s, 1H isômero *E*), 5,12 (s, 1H,  
isômero *Z*), 2,86-2,73 (m, 4H), 1,7-0,9  
(m, 14H).

**IV** (janela de seleneto de zinco):  $\nu \text{ cm}^{-1}$   
2985, 1616, 1485, 1395, 1227, 1108.

**(*E,Z*)-2-sec-butil-3-fenil oxaziridina - (143)**



$C_{11}H_{15}NO = 177,12 \text{ g/mol}$

mistura de isômeros, óleo amarelo  
rendimento bruto: (38%, 22,8mg)  
**RMN-<sup>1</sup>H** ( $CDCl_3$ ):  $\delta_H$  7,4-7,1 (m, 10H),  
4,48 (s, 1H isômero *E*), 5,14 (s, 1H,  
isômero *Z*), 3,3-3,0 (m, 2H), 1,6-1,4 (m,  
4H), 1,25 (s, 3H), 1,24 (s, 3H), 0,9-0,8  
(m, 6H).

**IV** (janela de seleneto de zinco):  $\nu \text{ cm}^{-1}$   
3010, 1620, 1489, 1421, 1215, 1090.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. BREVE HISTÓRICO

Nos últimos anos, têm crescido de forma exponencial,<sup>29</sup> o número de publicações, no que se refere ao uso de reações biocatalisadas. Esses processos por sua vez vêm “conquistando” cada vez mais a atenção devido a sua praticidade na preparação de moléculas com propriedades e configurações bastante específicas.<sup>22,29,30</sup>

As reações químio-enzimáticas vêm de encontro a esse desafio, pois já vem sendo relatados na literatura inúmeros trabalhos onde as etapas químicas e enzimáticas atuam em conjunto para obtenção de moléculas de interesse sintético.<sup>64,65</sup>

As reações químio-enzimáticas utilizando lipases para a formação de perácidos, teve início com Bjorkling *et al.*<sup>61,62</sup> na década de 90, onde foi demonstrado a aplicação desses biocatalisadores na preparação de peróxiácidos de cadeias longas, os quais podem ser usados como oxidantes *in situ* para a obtenção de epóxidos. Outros trabalhos, como de Warwel *et al.*<sup>62</sup> demonstraram o uso de lipases na formação de perácidos, com diferentes ácidos carboxílicos ou ésteres.

O nosso grupo de pesquisa iniciou os trabalhos com estas reações no ano 2000, onde foi estudada a epoxidação químio-enzimática do cicloexeno para a obtenção do correspondente epóxido.<sup>127</sup>

A partir desse trabalho inicial, o objetivo do Grupo de Pesquisa foi determinar a eficiência desse processo em diferentes condições reacionais utilizando substratos diferenciados, além da investigação de outros parâmetros que podem influenciar sensivelmente na conversão em produtos, tais como a agitação, fonte/procedência do biocatalisador, doador acila, doador peróxido, solventes orgânicos e a temperatura.<sup>71</sup>

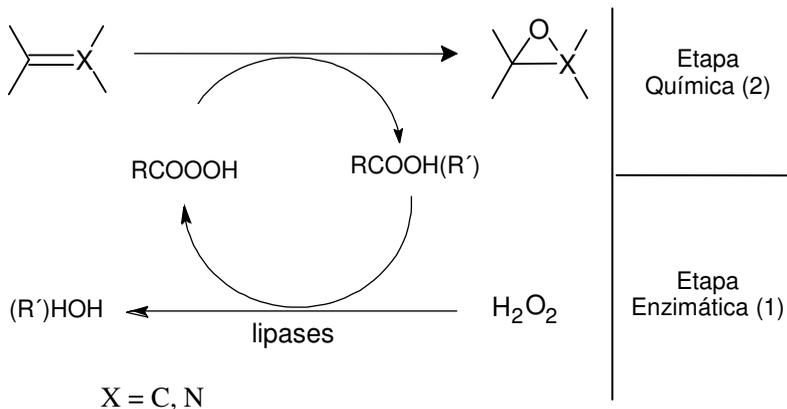
A utilização de oxidantes em síntese orgânica sempre foi objeto de estudos nas diferentes áreas da química. Como desvantagens do uso destes reagentes, pode-se destacar o custo, dificuldade de operação em alguns casos e o elevado grau de toxicidade, contribuindo de forma negativa para a chamada “Química Verde”.

Para contornar esses problemas, a metodologia químio-enzimática é atraente, pois além das condições brandas dessas reações, (temperatura ambiente, pH neutro em muitos casos), o biotalsador (lipases) pode ser reutilizado após imobilização.

O mecanismo de reação é bastante simples e é composto de duas etapas:

- 1) Etapa enzimática: a lipase atua como o biocatalisador na formação do perácido, utilizando um ácido carboxílico ou éster juntamente com peróxido de hidrogênio:
- 2) Etapa química: o perácido preparado é utilizado *in situ*, isto é sem a necessidade de isolá-lo, para a oxidação de compostos que contenham insaturações (C=C ou C=N).

O **Esquema 2** mostra as duas etapas descritas acima.



**Esquema 2.** Oxidação químico-enzimática de sistemas insaturados utilizando lipases.

Além disso, nesta metodologia não são utilizados oxidantes tóxicos que também possuem alto custo, e que em alguns casos podem apresentar dificuldade no seu manuseio.<sup>88</sup>

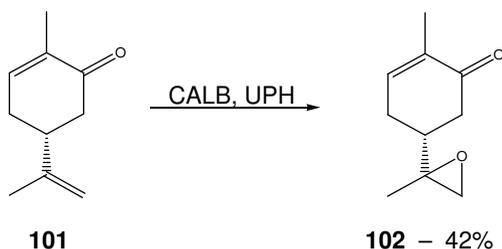
Com os trabalhos iniciados por Moreira *et al.* com relação a epoxidação químico-enzimática do cicloexeno, pôde-se avaliar as melhores condições com relação a formação do produto epoxidado.<sup>71</sup>

Estudos anteriores mostraram que a epoxidação de alcenos por oxidação com perácidos (*m*-CPBA, por exemplo) depende diretamente da densidade eletrônica na ligação dupla C=C, isto é quanto maior a densidade eletrônica na ligação dupla, mais favorável é a formação do produto epoxidado.<sup>88</sup>

Baseando-se nestes resultados iniciais, foram realizados inúmeros testes com diferentes substratos insaturados para obter os epóxidos com altas conversões.

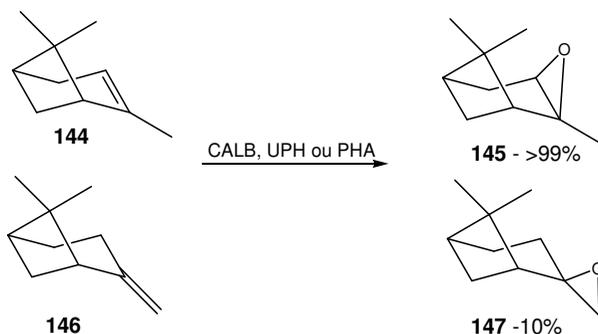
O primeiro substrato utilizado para os testes iniciais foi a (-)-carvona (**101**), onde verificou-se somente a formação do mono-epóxido exocíclico (**Figura 54**).

A dupla endocíclica não foi epoxidada, pois se trata de um sistema carbonílico  $\alpha,\beta$  insaturado, e conseqüentemente é deficiente de elétrons.



**Figura 54.** Epoxidação químio-enzimática da (-)-carvona (**101**). [**101** (2,5 mmol), CALB (50 mg), ACN (10 mL), UPH (5 mmol), ác. octanóico (2,5 mmol), 12 h, t.a., 150 rpm].

Outros terpenos utilizados por Moreira, tais como os  $\alpha$ -pineno (**144**) e  $\beta$ -pineno (**146**) respectivamente, apresentaram comportamentos distintos frente a epoxidação da ligação dupla, considerando a posição da ligação. A conversão em epóxido derivado do  $\alpha$ -pineno (**145**) foi maior (>99%) quando comparada com a do  $\beta$ -pineno (**147**), que foi obtido com apenas 10% no mesmo tempo de reação, conforme demonstrado na **Figura 55**.<sup>128</sup>



**Figura 55.** Epoxidação químio-enzimática dos compostos **144** e **146**. [**144** e **146** (2,5 mmol), CALB (50 mg), PHA (5 mmol), ácido octanóico (10 mmol), DCM, 24 h, 30°C].

A partir destes resultados iniciais, observou-se que a epoxidação de sistemas insaturados é bastante eficiente e que ocorre em condições brandas.

Contudo, antes da aplicação da metodologia na oxidação de outros substratos, fez-se necessário uma avaliação mais aprofundada em relação à primeira etapa do processo no que se refere à formação dos perácidos catalisada por lipases. Estes resultados serão apresentados e discutidos no próximo item.

#### 4.2. FORMAÇÃO DE PERÁCIDOS POR MÉTODO ENZIMÁTICO E DETERMINAÇÃO POR TITULAÇÃO IODOMÉTRICA E ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA.

Um parâmetro importante nestas reações é o tipo e a quantidade de doador acila utilizado no meio reacional, pois já está bem reportado na literatura que as lipases são bastante específicas e atuam em substratos de estruturas similares. Além disso, a formação do produto final (na etapa química) é dependente do perácido formado.<sup>128,129,130</sup>

Portanto, nestes experimentos foi avaliada a formação de perácido pelo método enzimático em função do tipo e concentração do doador acila no meio reacional. A eficiência do processo em função dos diferentes doadores acilas pode ser medida através da determinação direta do perácido sem o substrato a ser oxidado posteriormente, e esta determinação é baseada em suas propriedades oxidantes. Foram utilizados dois métodos; determinação por titulação iodométrica e por eletroforese capilar de zona.

Outra maneira de determinar a eficiência da formação de um perácido é pela determinação indireta. Neste caso, utiliza-se a formação do perácido “*in situ*” na oxidação de um sistema insaturado (por ex. C=C). Quanto maior a formação de perácido pela lipase, maior será a formação do epóxido. A escolha do substrato é importante, pois se a reatividade for baixa, será necessário a escolha de um doador acila eficiente para cada reação.

O primeiro estudo realizado foi a determinação de perácidos derivados de diferentes ácidos carboxílicos ou de éster por titulação iodométrica, utilizando a CALB como biocatalisador. As conversões foram determinadas de acordo com a metodologia descrita na parte experimental, item 3.3.2 e pg. 49. Os resultados obtidos com este método estão demonstrados na **Tabela 9**.

**Tabela 9.** Conversão (%)<sup>(a)</sup> em perácidos em função do doador acila.<sup>(b)</sup>

Ent.	Doador Acila	Conversão (%)		
		Sistema Bifásico	Tolueno	Acetonitrila
1	ácido acético	5	n.d. <sup>(c)</sup>	11
2	ácido hexanóico	15	8	28
3	ácido octanóico	32	20	26
4	ácido decanóico	27	18	19
5	ácido dodecanóico	29	15	26
6	ácido hexadecanóico	25	18	25
7	ácido malônico	<3	n.d. <sup>(c)</sup>	n.d.
8	ácido benzóico	<3	n.d. <sup>(c)</sup>	n.d.
9	acetato de etila	12	10	21

(a) Conversão determinada por titulação iodométrica, conforme procedimento descrito na Seção 3.3.2. p 49. (b) condições reacionais: ácido carboxílico (10 mmol), PHA (1 mL), CALB (50 mg), sistema bifásico água/tolueno 10 mL (1:1 v/v) ou tolueno e acetonitrila puros (10 mL) à 30°C, 6 h. (c) n.d. = não detectado

Os resultados apresentados na **Tabela 9** mostraram que as conversões aos correspondentes perácidos foram maiores quando se utilizam ácidos carboxílicos de cadeias maiores (Entradas 2-6) sendo de 19-28% em acetonitrila, 8-20% em tolueno e 15-32% em sistema bifásico. A utilização dos ácidos benzóico (aromático) ou malônico (um diácido) não foi eficiente para a formação dos correspondentes perácidos.

Pode-se observar também nos dados da **Tabela 9**, que com a CALB a produção de perácidos foi similar ao utilizar os três meios reacionais, em especial para os ácidos carboxílicos com cadeias maiores que 6 carbonos. Este resultado pode estar relacionado à efeitos estéreis em função do tamanho da cadeia alquílica, pois o ambiente natural de atuação de uma lipase é basicamente a hidrólise de triacilgliceróis com cadeias alquílicas grandes e alifáticas.<sup>8,9, 53, 57, 61</sup>

Outro método utilizado foi a eletroforese capilar de zona, que também mostrou ser uma técnica bastante interessante para a determinação destes perácidos, pois é uma análise rápida e com resultados bastante precisos.

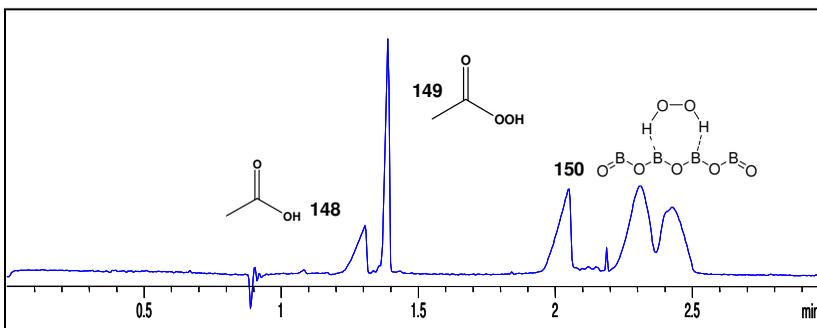
Após a realização das reações de formação dos perácidos, foi retirada uma alíquota e adicionou-se 20 mmol de tetraborato de sódio (TBS) em uma solução de pH = 9,3 cuja função é formar um complexo com o peróxido de hidrogênio. A seguir, adicionou-se 0,2 mmol de

brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) que tem a função de eletrólito na coluna capilar, conforme descrito na Seção 3.3.2. p 50.

A limitação deste método consiste na baixa solubilidade de ácidos graxos com cadeias maiores que seis carbonos. Portanto, os testes foram feitos apenas com ácidos carboxílicos de cadeias alquílicas menores (ácidos acético, propiônico, butírico e o hexanóico).

A conversão em perácido é medida a partir do consumo do ácido carboxílico através da diminuição da área do pico do ácido, durante a reação. Foram usadas as curvas de calibração para os diversos ácidos, conforme demonstrado na Seção 3.3.2. p 51.

Os eletroferogramas obtidos para todas as determinações de perácidos apresentaram perfis similares. Por exemplo, a **Figura 56** mostra o eletroferograma para formação do ácido peracético (**149**) a partir do ácido acético (**148**).



**Figura 56.** Eletroferograma de uma alíquota da reação de formação do ácido peracético (**149**) a partir do ácido acético (**148**) pelo método enzimático. [**148** (2,5 mmol), CALB (25 mg), UPH (5 mmol), TBS (20 mmol), CTAB (0,2 mmol), pH = 9,3].

No eletroferograma apresentado acima, pode-se quantificar a formação do perácido **149**, a partir do consumo do ácido acético (**148**). A adição de tetraborato de sódio forma um complexo com o peróxido de hidrogênio, o qual pode ser identificado no eletroferograma pelo pico **150**.

Inicialmente fez-se um estudo para avaliar a formação de perácidos derivados do ácido acético utilizando três lipases, CALB, LRO e LPS em 12h de reação. As conversões foram de 35, 9 e 7%, respectivamente, em função do biocatalisador utilizado.

A partir desse resultado preliminar, utilizou-se a CALB nos experimentos subsequentes, onde foi avaliada a quantidade de enzima na con-

versão do ácido acético ao correspondente perácido. As conversões ao ácido peracético (%) em função da massa de CALB estão apresentadas na **Tabela 10**.

**Tabela 10.** Conversão do ácido acético em ácido peracético em função da massa da CALB.<sup>(a)</sup>

Massa (mg)	Conversão (%) <sup>(b)</sup>
25	18,8
50	35,4
75	10,5
100	22,0

(a) determinada por eletroforese capilar (b) ác. acético (2,5 mmol), acetonitrila (10 mL), UPH (5 mmol) t.a., 12h, 150 rpm

Os resultados mostraram que as conversões em perácido atingiram um valor médio de 22 % em função da massa de CALB. A partir destes resultados, a massa de 25 mg de CALB foi usada nos experimentos posteriores.

As variações nos valores de conversão em ácido peracético em função da massa de CALB podem ser atribuídas a alterações nos procedimentos experimentais tal como estocagem das alíquotas antes das análises em tempos diferentes. Portanto, torna-se necessário um maior número de repetições dos experimentos para obter outros valores destas determinações.

Em seguida, fez-se um estudo da conversão em perácidos utilizando os ácidos propanóico, butanóico e hexanóico. Os valores de conversão (%) nos correspondentes perácidos estão apresentados na **Tabela 11**.

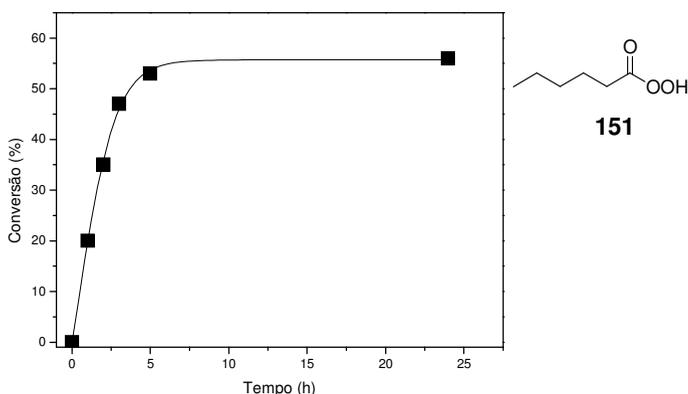
**Tabela 11.** Conversão (%) em perácidos por eletroforese capilar.

Ácidos	Ácido inicial (g.L <sup>-1</sup> )	Conc. determinada x10 <sup>3</sup> (mg.L <sup>-1</sup> ) <sup>(a)</sup>	Conversão (%) <sup>(b)</sup>
acético	31,0	25,1	19,2
propiónico	38,0	29,6	22,1
butírico	45,0	29,9	33,5
hexanóico	60,0	15,9	55,4

(a) Determinada a partir das curvas de calibração dos ácidos carboxílicos. (b) 12h.

Os resultados apresentados na **Tabela 11** demonstram que as conversões aos correspondentes perácidos são maiores à medida que aumenta a cadeia carbônica do ácido carboxílico evidenciando a importância dos efeitos estéreos na preparação destes compostos pelo método enzimático. Os resultados obtidos por eletroforese capilar são concordantes com os obtidos por titulação iodométrica, conforme discutido anteriormente.

Em outro estudo, avaliou-se a formação do ácido perhexanóico em função do tempo de reação usando a CALB como catalisador (**Figura 57**).



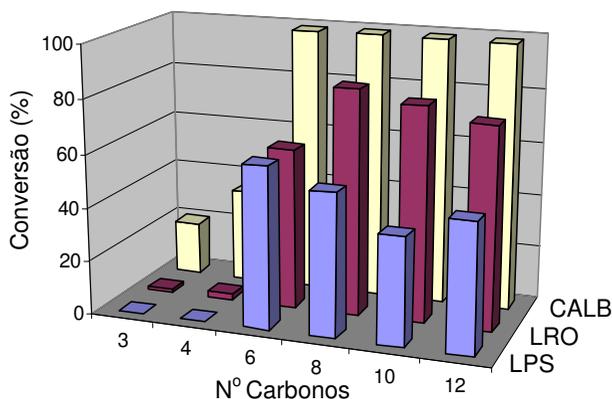
**Figura 57.** Conversão em ácido perhexanóico (**151**) em função do tempo de reação utilizando a CALB. [**151** (2,5 mmol), CALB (25 mg) acetonitrila (10 mL), UPH (5 mmol) t.a., 12 h, 150 rpm.

Os resultados mostraram que após 5 h e 24 h o ácido perhexanóico foi obtido com conversão de 55%. O valor máximo de conversão obtido está relacionado ao equilíbrio em solução com o correspondente ácido carboxílico.<sup>131</sup>

A eficiência do processo em função do tipo do perácido utilizado também foi avaliada na obtenção químico-enzimática do epóxido do cicloexeno.

Como doadores acila foram utilizados os ácidos propanóico, butanóico, hexanóico, octanóico, decanóico e o láurico e como biocatalisadores a CALB, LPS e LRO, em tolueno como solvente.

As conversões em óxido de cicloexeno foram determinadas por RMN-<sup>1</sup>H e os valores estão demonstrados na **Figura 58**.



**Figura 58.** Variação da conversão em epóxido (%) do cicloexeno (**104**) em função do doador acila. [**103** (2 mmol), doador acila (1 mmol), CALB, LPS e LRO (25 mg), PHA (1 mL), 30°C, 24 h, tolueno].

Pode-se observar nos dados da **Figura 58**, que as conversões em epóxido foram menores com ácidos propanóico e butanóico utilizando as três lipases. Utilizando ácidos carboxílicos de cadeias longas, as conversões em epóxido do cicloexeno foram maiores. Ao usar a LPS, a maior conversão foi obtida com o ácido hexanóico (60%). Com a CALB as conversões foram quantitativas ao utilizar os ácidos hexanóico, octanóico, decanóico e o láurico (>99%). Ao utilizar a LRO, a maior conversão foi obtida com o ácido octanóico, sendo de 84%.<sup>71</sup>

Os resultados obtidos nestes estudos são concordantes com a determinação direta do perácido tanto por titulação iodométrica ou eletroforese capilar. As conversões em perácidos foram dependentes do tamanho da cadeia alquílica, que contribui significativamente ou não para o perfeito “encaixe” do substrato no sítio ativo da enzima e conseqüentemente favorece a formação do produto.

Resultados similares foram obtidos por Moreira *et al.* na epoxidação do (+)-careno. Foi observado que a reação é favorecida quando foram utilizados os ácidos carboxílicos com cadeias lineares maiores ou igual a 6 carbonos. As maiores conversões ao correspondente epóxido foram obtidas utilizando o ácido octanóico, sendo >99% em 1,5 h de reação.<sup>130</sup>

A concentração de ácido carboxílico é outro fator importante para a conversão em produtos oxidados, mas o excesso deste pode levar a

inibição da enzima, e conseqüentemente diminuição na formação do produto desejado.<sup>130,131</sup>

Os resultados iniciais mencionados são promissores e mostram a dependência do doador acila e de outros parâmetros na preparação de epóxidos. Estes serão também discutidos nos próximos itens com relação a formação químio-enzimática de oxaziridinas.

#### 4.3. PREPARAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DE N-ALQUILOXAZIRIDINAS.

Na literatura, existem muitos trabalhos que mostram a preparação de epóxidos ou de oxaziridinas, usando as mais variadas metodologias.<sup>63,64,91,92,96,101,113,114</sup> O método mais comum é a oxidação de alcenos ou iminas com *m*-CPBA.<sup>91</sup>

Neste trabalho, avaliaram-se os parâmetros que influenciam diretamente na formação químio-enzimática de oxaziridinas derivadas de *N*-benziliden-alquilaminas. Essa metodologia é bastante atrativa, pois além de usar condições brandas de reações, pode-se em alguns casos reutilizar as lipases quando imobilizadas.

Nos estudos que serão apresentados à seguir, serão avaliados a influência de alguns parâmetros, tais como agitação, doador peróxido, doador acila, solventes orgânicos e a procedência das lipases. Estes fatores podem ou não afetar diretamente na conversão em epóxidos e oxaziridinas.

Para a preparação de oxaziridinas pelo método químio-enzimático, inicialmente foi preparada uma série de *N*-benziliden-alquilaminas **85-100** conforme apresentado na **Figura 43** e **Tabela 6** (p. 53)

Essas iminas foram preparadas através da metodologia descrita na Seção 3.3.3., com rendimentos que variaram entre 77-97%. Após purificação, todos os compostos foram caracterizados por ponto de fusão, RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e IV.

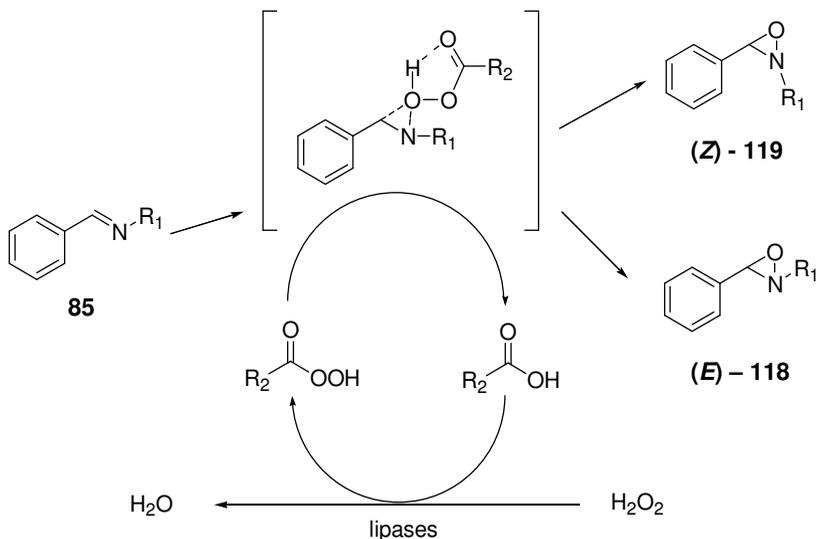
As iminas foram obtidas como único isômero *E*, de acordo com os sinais obtidos por RMN de <sup>1</sup>H (~8,20 ppm) e <sup>13</sup>C (~65,00 ppm) que correspondem aos picos do hidrogênio e carbono imínicos, respectivamente.

Nas análises de infravermelho, as iminas **85-100** apresentaram uma banda de intensidade média em torno de 1650 cm<sup>-1</sup> caracterizando o estiramento da ligação dupla C=N.<sup>132</sup>

Nos estudos iniciais, utilizou-se a *N*-benziliden-2-etilhexilamina (**85**) como substrato padrão, onde serão avaliadas as melhores condições

para a obtenção das correspondentes oxaziridinas **118** e **119**. (Esquema 3)

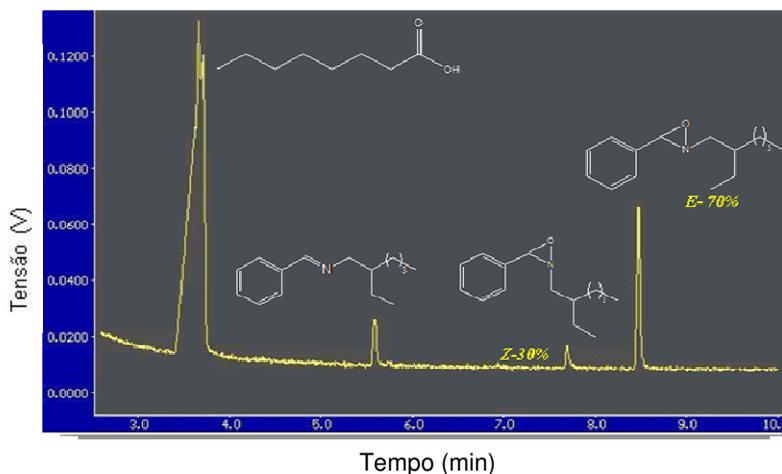
Após estes estudos, as melhores condições experimentais serão usadas na obtenção das oxaziridinas **120-143**.



R<sub>1</sub> = 2-etilhexil, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-

**Esquema 3.** Formação químio-enzimática de (*E,Z*)-2-etilhexil-3-fenil oxaziridinas.

A conversão nas oxaziridinas **118** e **119** foi determinada por CG, pela razão da área dos picos referentes a imina **85** e ao(s) produto(s) formado(s), conforme apresentado na **Figura 59**.

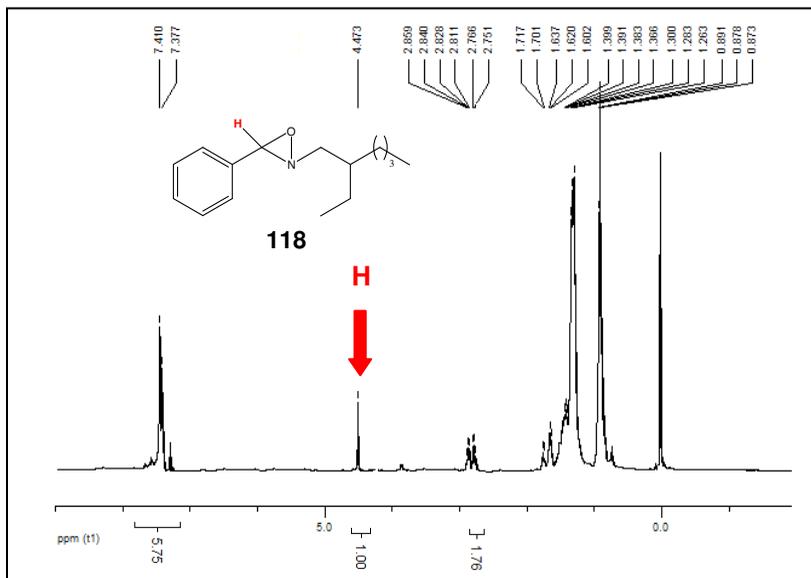


**Figura 59.** Cromatograma de um alíquota de reação na oxidação químio-enzimática de **85**, obtendo os produtos *E* e *Z*. [**85** (0,4 mmol), CALB (25 mg), acetonitrila, t.a., 2 h, 150 rpm]. Condições de análise descritas na Seção 3.2. p. 46].

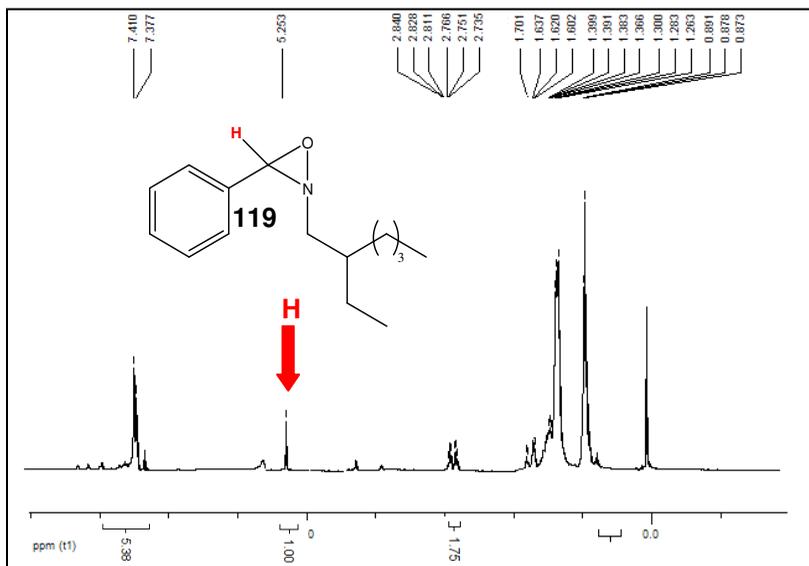
A caracterização dos produtos obtidos (mistura de isômeros *E* e *Z*) foi feita por RMN-<sup>1</sup>H. O isômero *E* apresentou um singlete na região de 3,95-4,80 ppm dependendo do substrato utilizado, e o *Z* em 5,11-5,39 ppm, referentes ao hidrogênio do anel oxazirano.

A separação dos isômeros (*E* e *Z*), foi feita por coluna cromatográfica conforme descrito na Seção 3.3.11. Para aumentar o grau de pureza e a quantidade dos compostos, o procedimento cromatográfico foi repetido quando necessário.

Os espectros de RMN-<sup>1</sup>H da (*E*)- e (*Z*)-2-etilhexil-3-feniloxaziridinas estão demonstrados nas **Figuras 60 e 61**. Os sinais indicados em vermelho nos espectros mostram os picos correspondentes aos hidrogênios do anel oxazirano que é característico para cada isômero. Em ambos os isômeros os picos dos hidrogênios aromáticos estão entre 6,47-8,26 ppm, e os da cadeia alifática ligada ao nitrogênio em 3,64-0,69 ppm.



**Figura 60.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$ , da (*E*)-2-etilhexil-3-feniloxaziridina (**118**), obtida pelo método químico-enzimático, [ $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz].

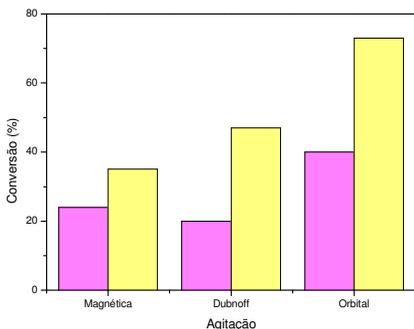


**Figura 61.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$ , da (*Z*)-2-etilhexil-3-feniloxaziridina (**119**), obtida pelo método químico-enzimático, [ $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz].

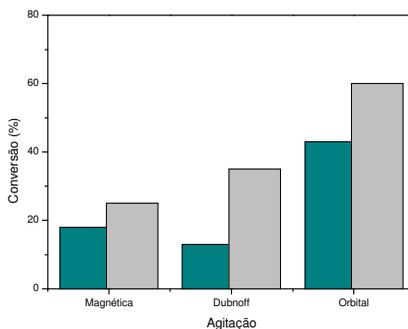
Nas análises de RMN-  $^{13}\text{C}$ , as oxaziridinas **118** e **119** apresentaram sinais em 79,9 e 80,9 ppm referentes ao carbono do anel oxazirano dos isômeros *E* e *Z*, respectivamente. Os sinais dos carbonos aromáticos encontram-se na região de 115,0-165,3 ppm, e os da parte alifática ligados ao nitrogênio estão na região de 9,00-60,0 ppm.

Em um primeiro estudo, avaliou-se a formação das oxaziridinas **118** e **119**<sup>†</sup> em função da adição de dois doadores peróxido diferentes tais como a uréia peróxido de hidrogênio (UPH) e peróxido de hidrogênio aquoso 30% (PHA) sob três formas de agitação diferentes no meio reacional (agitação tipo Dubnoff, magnética e orbital) com a CALB como biocatalisador.

Para fins comparativos, fez-se o mesmo estudo para a epoxidação químico-enzimática do cicloexeno, sob as mesmas condições. Os resultados estão demonstrados nas **Figuras 62 e 63**.



**Figura 63.** Efeito do tipo de agitação na formação da (*E,Z*)-2-etilhexil-3- feniloxazirina (**118-119**), (■) com UPH, e (■) com PHA. [ACN (5 mL), CALB (25 mg), t.a., 1 h]



**Figura 62.** Efeito do tipo de agitação na formação de óxido de cicloexeno (**104**), (■) com UPH, e (■) com PHA. [DCM (5 mL), CALB (25 mg), t.a., 1 h]

Observando os dados das **Figuras 62 e 63**, verifica-se um comportamento similar para a formação das oxaziridinas **118** e **119** e do epóxido derivado do cicloexeno. Vale ressaltar que a agitação orbital se mostrou mais eficiente utilizando ambos os substratos, obtendo-se as maiores conversões que foram de 75 e 60%, respectivamente com PHA.

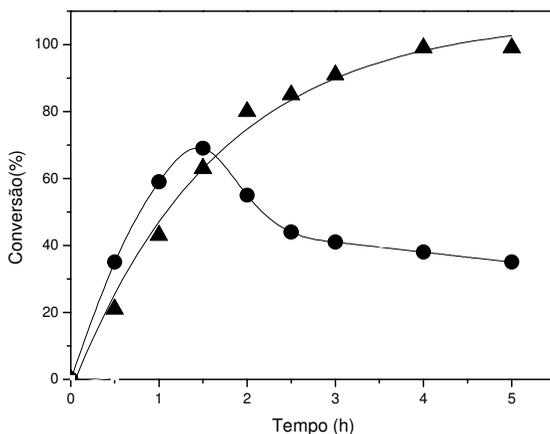
<sup>†</sup> \* Nos estudos subseqüentes, a conversão (%) em oxaziridinas expressa está baseada na mistura de isômeros obtidos (*E* e *Z*), os quais foram identificados e quantificados por CG.

A utilização de agitação do tipo Dubnoff foi pouco eficiente quando se utilizou UPH como doador peróxido, pois foi observado que o sistema demorou muito para ficar totalmente homogêneo.

O uso da agitação com barra magnética por longos períodos deixou o meio reacional com aparência turva, e impossibilitou de certa forma a recuperação total da enzima (neste caso específico, a CALB).

A partir dos resultados obtidos, a agitação orbital de 150 rpm foi utilizada nos experimentos subseqüentes.

No próximo estudo foi avaliada a influência do tempo e do tipo de doador peróxido para a obtenção das oxaziridinas **118** e **119**. Os resultados estão apresentados na **Figura 64**.



**Figura 64.** Variação da conversão em oxaziridinas (%) em função do tempo de reação utilizando (▲) UPH e (●) PHA como doadores peróxidos. [**85** (0,4 mmol), CALB (25 mg), UPH e PHA (2,0 mmol), ácido octanóico (1 mmol), ACN (5 mL), t.a., 3 h e 150 rpm].

A conversão (%) em oxaziridinas foi mais alta utilizando PHA comparando com UPH nas três primeiras horas de reação, formando os produtos com 60 e 43% de conversão, respectivamente em 1h. Ao usar a UPH, a conversão continuou aumentando e obteve-se um máximo de 96% após 5h. Na reação com PHA, após 1,5 h observou-se uma diminuição da conversão sendo que as oxaziridinas foram obtidas com 30%, após 5h. Pelas análises de CG e por comparação com padrões, verificou-se a presença de benzaldeído **83a** (40%) como um dos produtos de hidrólise da imina.

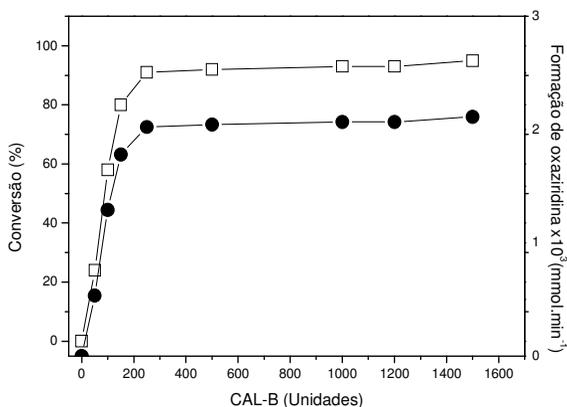
Portanto, a utilização de UPH é uma alternativa mais atraente, pois é um oxidante mais brando e é de fácil manuseio por ser sólido e menos tóxico para as lipases,<sup>133</sup> além de formar apenas traços de produtos de hidrólise (<2%).<sup>134</sup>

Baseado-se nestes resultados, a UPH foi utilizada como doador peróxido para os estudos posteriores.

Utilizando ambos doadores peróxidos, a proporção entre os isômeros *E:Z* foi de 65:35 (determinado por CG).

A conversão em oxaziridinas **118** e **119** foi também verificada em função da massa de CALB, (expresso em unidades de enzima – U -) no meio reacional, sendo de 0-150 mg (0-1500 unidades).

Os resultados estão apresentados na **Figura 65**, e mostraram que as conversões aos produtos aumentaram até 25 mg de CALB, atingindo um patamar. A partir desse valor as conversões foram de 93%, com uma taxa de formação de produtos de  $\sim 2,1 \times 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1}$ .



**Figura 65.** (□) Variação da conversão (%) e da (●) veloc. formação  $\times 10^3$  (mmol.min<sup>-1</sup>) de oxaziridinas **118** e **119** em função da quantidade da CALB (unidades) com UPH como doador peróxido. [**85** (0,4 mmol), acetonitrila, t.a., 3h e 150 rpm].

Os resultados até aqui apresentados mostraram que não há necessidade da utilização de maiores quantidades de CALB pois cerca de 25 mg de enzima por 0,4 mmol de substrato são suficientes para uma formação quantitativa de produto.

Conforme discutido anteriormente a natureza do doador acila é outro parâmetro que influencia na eficiência e velocidade da reação de

formação ao correspondente perácido e do produto oxidado. Este estudo será apresentado no próximo item.

### 4.3.1. Influência do doador acila na formação de N-alkiloxaziridinas

Neste tópico, avaliou-se a conversão (%) e a velocidade de formação da mistura dos isômeros das oxaziridinas **118** e **119** em função do tipo de doador acila empregado no meio reacional. Neste estudo, foi utilizado somente a CALB como biocatalisador e UPH como doador peróxido. Os resultados estão demonstrados na **Tabela 12**.

**Tabela 12.** Influência do tamanho da cadeia alquílica do doador acila na formação químio-enzimática das oxaziridinas 118 e 119.<sup>(a)</sup>

Doador acila <sup>(b)</sup>	Conversão (%) <sup>(c)</sup>			
	Tempo (h)			Vel. x10 <sup>3</sup> (mmol.min <sup>-1</sup> )
	0,5	1	3	
Ácido acético	n.d. <sup>(d)</sup>	7	16	0,36
Ácido propanóico	2	12	24	0,53
Ácido butanóico	8	20	29	0,64
Ácido hexanóico	12	35	67	1,48
Ácido octanóico	20	43	90	2,00
Ácido láurico	27	50	75	1,67
Ácido mirístico	18	38	70	1,56
Ácido palmítico	15	40	69	1,53
Ácido benzóico	n.d.	n.d.	n.d.	0,00
Acetato de etila	3	28	53	1,18

(a) **85** (0,4 mmol), UPH (0,4 mmol), CALB (25 mg), ACN (10 mL). (b) doador acila (1mmol), (c) determinado por CG, a partir da misturas dos produtos *E* e *Z*, t.a., 150 rpm. (d) n.d.- não detectado.

Os resultados mostram que a conversão em produtos foi dependente da estrutura do doador acila. Estes dados apresentaram a mesma tendência dos valores de conversão obtidos na epoxidação do cicloexeno e do (+)-3-careno. Os correspondentes óxidos foram obtidos com conversões >99% utilizando o ácido octanóico.<sup>71,130</sup>

Os dados apresentados acima mostram que as conversões são similares quando utilizam-se ácidos carboxílicos com cadeias alquílicas maiores que seis carbonos (ácidos hexanóico, octanóico, láurico, mirís-

tico e palmítico) obtendo-se conversões de 67-90% em 3h. Ao utilizar os ácidos com cadeias alquílicas menores (ácidos acético, propanóico e o butanóico), as conversões diminuíram sendo de 16-29% em 3h de reação.

Estes resultados podem ser explicados, considerando que a etapa enzimática envolve a estabilização do intermediário tetraédrico acil-enzima, e depende diretamente do tamanho da cadeia alquílica do doador acila.<sup>8</sup> Além disso, ácidos carboxílicos menores apresentam maior efeito de toxicidade para as lipases diminuindo a atividade catalítica, o que pode ser observado pela diminuição sensível na conversão em produtos.<sup>135</sup>

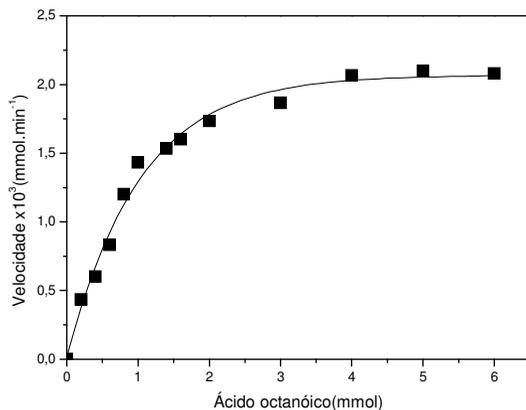
Ao utilizar o ácido benzóico não foi observado a formação das oxaziridinas. Este resultado é esperado em função da estrutura deste composto.

Ao utilizar o acetato de etila, a conversão em oxaziridinas foi de 53%. Entretanto as análises de CG das alíquotas da reação demonstraram um aumento bastante expressivo na formação do benzaldeído, após 3h de reação.

A partir destes resultados, o ácido octanóico foi selecionado como doador acila para estudos posteriores.

A seguir, fêz-se um estudo para avaliar a velocidade de formação da oxaziridinas **118** e **119** em função de concentração de ácido octanóico no meio reacional. Os resultados obtidos estão demonstrados na **Figura 66**.

Os dados mostraram que a taxa de conversão em oxaziridinas foi dependente da concentração de ácido octanóico alcançando  $\sim 1,7 \times 10^{-3}$  mmol.min<sup>-1</sup> com 2 mmol do doador acila. Embora, as conversões não tenham alterado significativamente após este valor, a purificação dos produtos finais foi dificultada devido à retirada do ácido do meio reacional. Isso ocorreu porque uma quantidade maior de ácido no meio, requer o uso de mais solução de saturada de bicarbonato de sódio e tem-se como conseqüência um aumento na formação de produtos de hidrólise (benzaldeído e amina).



**Figura 66.** Variação da velocidade de formação de oxaziridinas em função da concentração do ácido octanóico usando UPH como doador peróxido. Condições reacionais estão descritas na **Tabela 12**.

Estes resultados demonstraram que a escolha do doador acila é bastante importante nestas reações. Quanto mais perácido formado na etapa enzimática, maior é a possibilidade de formação de oxaziridinas na 2<sup>a</sup> etapa da reação.

Outro ponto importante é que a concentração de ácido carboxílico no meio reacional não deve ser muito alta, para evitar a inibição enzimática,<sup>131</sup> e é também desejável que o doador acila seja solúvel no meio reacional. Além disso, este deve ser de fácil extração para não dificultar o isolamento do produto final desejado.

#### 4.3.2. Efeito do solvente e do biocatalisador na formação das N-alquiloxaziridinas

As lipases são amplamente conhecidas por serem bastante sensíveis ao meio reacional ao qual estão inseridas. O solvente é um parâmetro de relativa importância, pois se deve levar em consideração a estabilidade do biocatalisador no meio, solubilidade dos substratos, volatilidade e o grau de toxicidade.<sup>136</sup>

O parâmetro mais freqüentemente utilizado para descrever quantitativamente o efeito do solvente em reações catalisadas por enzimas é

o log *P*, definido como logaritmo do coeficiente de partição do solvente no sistema octanol/água.<sup>137</sup>

Neste estudo foi avaliado o efeito do solvente e a procedência do biocatalisador na conversão em oxaziridinas **118** e **119** derivadas da imina **85**.

As conversões em produtos em função da polaridade do solvente e da fonte das lipases estão demonstradas na **Tabela 13**.

**Tabela 13.** Efeito do solvente e procedência das lipases na formação químio-enzimática das N-oxaziridinas derivadas de **85**.

Solvente	Log <i>P</i>	Lipases		
		Conversão (%) <sup>(a)(b)</sup>		
		<i>C. antartica</i> B (CALB)	<i>Pseudomonas</i> sp. (LPS)	<i>R. oryzae</i> (LRO)
etanol	-0,31	26 <sup>(d)</sup>	n.d. <sup>(e)</sup>	n.d.
acetonitrila	-0,33	91	16	8
éter etílico	0,83	26	<5	10
MTBE <sup>(f)</sup>	1,43	76	<5	<5
diclorometano	1,50	60	23	<5
clorofórmio	2,00	61	10	<5
tolueno	2,50	60	<5	<5
<i>n</i> -hexano	3,50	73	<5	<5

(a) Determinado por CG a partir da mistura dos isômeros E/Z. (b) solvente orgânico (10 mL), UPH (0,4 mmol), lipases (25 mg). (c) 3 h, t.a. e 150 rpm. (d) 24 h. (e) n.d. – não detectado. (f) éter *t*-butimetílico

Os dados apresentados na **Tabela 13**, não demonstraram uma relação linear entre a polaridade do solvente (expresso pelos valores de log *P*) e a conversão aos isômeros **118** e **119**. Utilizando a CALB, foram obtidas as maiores conversões com a acetonitrila, MTBE e *n*-hexano, sendo de 91, 76 e 73%, respectivamente. Com este mesmo biocatalisador, ao usar diclorometano, clorofórmio e tolueno as conversões foram de 60-61%. Um resultado interessante foi obtido com etanol, obtendo-se os produtos em 26% de conversão em 24 h. Neste caso a seletividade para o isômero *E* foi de 70%. Com os outros solventes, a seletividade foi de 65% para o mesmo isômero.

Ao usar a LPS como biocatalisador as maiores conversões em oxaziridinas foram de 23% e 16% em diclorometano e acetonitrila, res-

pectivamente. Com a LPS e a LRO, os valores de conversão foram baixos sendo de 10 ou <5 %.

Os resultados demonstraram que CALB foi o melhor biocatalisador neste estudo. Isto pode ser explicado porque esta enzima está imobilizada em resina aniônica, ao contrário das lipases LPS e LRO que foram empregadas na forma livre, isto é sem proteção física com relação aos solventes orgânicos.

Portanto, é evidente que o meio reacional pode alterar a atividade das lipases, e em especial na presença de agentes oxidantes.

A partir desses resultados as CALB e LPS foram selecionadas para avaliar a influência da adição de líquidos iônicos derivados do 1-butilmetilimidazólio ([BMIm][X], onde X = PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, SCN<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>) em diferentes proporções na obtenção destas oxaziridinas.

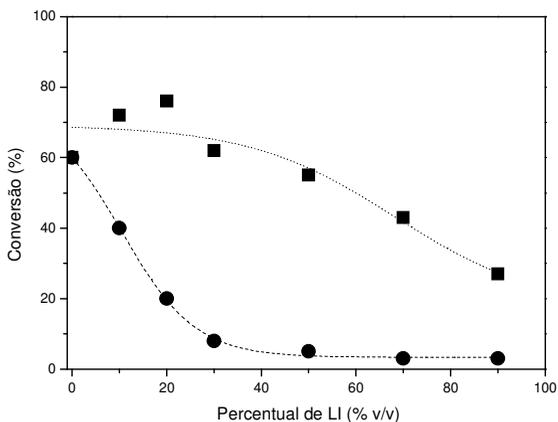
#### **4.3.3. Influência da adição de diferentes líquidos iônicos (LIs) como co-solventes.**

Existem estudos que revelam que os líquidos iônicos atuam como suporte para as enzimas, pois são espécies carregadas e que interagem muito fortemente com a superfície externa, podendo em alguns casos manter ou até mesmo aumentar a atividade catalítica destes biocatalisadores.<sup>84</sup>

Para avaliar a influência da adição de LIs no meio reacional em função da conversão e seletividade dos produtos formados, foram utilizados inicialmente o tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIm][BF<sub>4</sub>] e hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIm][PF<sub>6</sub>] em misturas com diclorometano e acetonitrila, utilizando como biocatalisadores a CALB e LPS.

A quantidade de LIs adicionado variou de 0 à 90% v/v e os valores de conversão estão demonstrados na **Figura 67**.

Como já previamente apresentado, utilizando diclorometano puro (DCM), obteve-se o produto com conversão de 60% com a CALB. (ver **Tabela 13**)



**Figura 67.** Efeito da adição de LI como co-solvente na oxidação químio-enzimática da N-benziliden-2-etilhexilamina, (■) [BMIm][PF<sub>6</sub>] e (●) [BMIm][BF<sub>4</sub>]. [85 (0,4 mmol) CALB (25 mg), diclorometano, t.a., 3 h e 150 rpm]

Estes resultados mostram a dependência do tipo e proporção de LI na conversão em produtos. Utilizando [BMIm][PF<sub>6</sub>], a maior conversão foi obtida com a mistura de LI 80:20 v/v, obtendo-se 76% dos produtos. Utilizando a mistura de DCM:LI 70:30 v/v a conversão foi de 62%, sendo similar a obtida com solvente orgânico puro (Tabela 13). Com o aumento da quantidade destes LI no meio reacional, ocorreu uma diminuição na conversão em **118** e **119**, obtendo-se apenas 27% com a mistura DCM:LI de 10:90 v/v.

Uma possível razão para este resultado é que [BMIm][PF<sub>6</sub>] pode interagir de forma mais efetiva com grupos eletricamente carregados da enzima, seja no sítio ativo ou mesmo na sua “periferia”, possivelmente causando mudanças conformacionais, as quais alteram sensivelmente a atividade da enzima com o aumento da concentração no meio. Outro efeito que deve ser considerado é o fato de que com o aumento da concentração deste LI tanto a viscosidade quanto a força iônica também aumentam. Assim, pode ocorrer a inativação da enzima. Além disto, a difusão do substrato e produtos pode ser dificultada, tendo como consequência a diminuição nos valores de conversão a partir de misturas com proporções maiores que 50% de LI.<sup>81,82,83</sup>

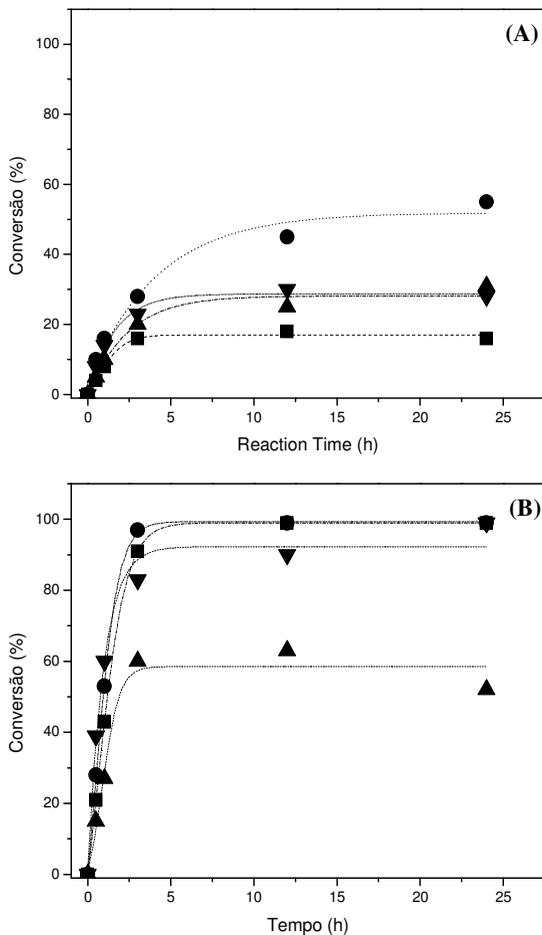
Ao avaliar a influência da concentração de [BMIm][BF<sub>4</sub>], os resultados mostraram uma diminuição na conversão em função do aumento da quantidade deste LI em todas as proporções. Utilizando 30 e 50% deste LI, os percentuais de conversão foram de apenas 8 e 5% respectivamente. Utilizando proporções de LI na faixa de 70-90%, as conversões em **118** e **119**, foram de 3%.

Estes resultados refletem a natureza do [BMIm][BF<sub>4</sub>], que é particularmente hidrofílico. De acordo com o que é proposto por Zhao *et al.*<sup>138</sup>, foi observado que líquidos iônicos com o ânion BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, não se ionizam na ausência de água no meio reacional sendo este fato decisivo para a diminuição da atividade enzimática e queda na conversão em produto.<sup>138</sup>

Com o uso de ambos os LIs no meio reacional, a razão *E:Z* dos produtos formados foi de 65:35.

Considerando estes resultados, a mistura de solvente orgânico:LI 90:10 v/v foi selecionada para a avaliação da procedência do biocatalisador neste meio e também a influência de diferentes ânions nos LIs derivados do 1-butil-3-metilimidazólio na conversão e seletividade em oxaziridinas.

A seguir, foi investigada a formação das oxaziridinas 118 e 119 em função do tempo de reação, utilizando as LPS e CALB em misturas de 10% de [BMIm][PF<sub>6</sub>] com acetonitrila (ACN) ou diclorometano (DCM). Os valores de conversão nas oxaziridinas **118** e **119**, estão descritos na **Figura 68**.



**Figura 68.** Variação da conversão em oxaziridinas em função do tempo de reação com (A) LPS e (B) CALB em (▼) DCM:LI 10% v/v, (▲) DCM, (●) ACN:LI 10% v/v, (■) ACN. [85 (0,4 mmol), LI = [BMIm][PF<sub>6</sub>], ácido octanóico (1 mmol), UPH (0,4 mmol), lipases (25 mg), Solvente (9 mL), LI (1 mL), t.a., 150 rpm].

Os resultados mostraram que com o uso de misturas de acetonitrila ou diclorometano com [BMIm][PF<sub>6</sub>] 10% v/v, houve um aumento na conversão em produtos, utilizando ambas as lipases.

Com o uso da LPS como biocatalisador (**Figura 68 A**), a conversão total em produtos foi de 18% em acetonitrila e 45% com mistura

acetonitrila:LI. O mesmo comportamento foi observado usando diclorometano, sendo que as conversões aumentaram de 25 para 30% quando adicionou-se 10% de LI à mistura reacional em 12h de reação.

Em todos estes experimentos, a proporção entre os isômeros manteve-se praticamente constante sendo de 65:35 para os isômeros *E* e *Z*, respectivamente, independente do meio reacional.

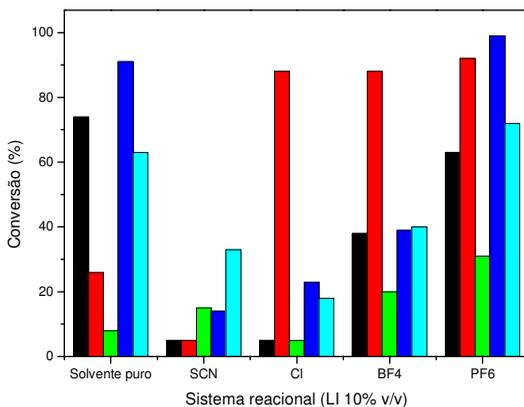
Um comportamento similar foi observado utilizando a CALB como biocatalisador (**Figura 68 B**). As conversões em produtos aumentaram com a adição de 10 % de [BMIm][PF<sub>6</sub>]. Em 3h as conversões aumentaram de 81% para 97% e de 60% para 83% usando misturas de ACN: [BMIm][PF<sub>6</sub>] e DCM: [BMIm][PF<sub>6</sub>], respectivamente. A conversão máxima foi >99% após 5h de reação utilizando ACN:LI.

A seletividade dos produtos formados utilizando a CALB foi a mesma obtida anteriormente utilizando a LPS, sendo a razão *E*:*Z* de 65:35.

Estes dados mostraram que o uso de misturas de [BMIm][PF<sub>6</sub>] com ACN ou DCM na presença de CALB ou LPS, favoreceu a formação dos produtos. Todavia, não foram observadas mudanças com relação à seletividade dos produtos formados.

O uso de diferentes solventes orgânicos pode influenciar na velocidade de reação e seletividade, especialmente no que se refere à formação de oxaziridinas. Portanto, foram selecionados mais três solventes, sendo o *n*-hexano, éter etílico e etanol em misturas com diferentes LIs derivados do 1-butil-metilimidazólio com diferentes ânions ([BMIm][X]) onde X= BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, SCN<sup>-</sup> e Cl<sup>-</sup>) na proporção de 10% para avaliar as possíveis influências destes LIs com relação à conversão e seletividade.

As reações foram monitoradas em função do tempo por CG, e os resultados obtidos com relação à conversão (%) e seletividade (% do isômero *E*) em função dos diferentes LIs e dos solventes orgânicos estão demonstrados nas **Figura 69** e **Tabela 14**, respectivamente.



**Figura 69.** Influência da adição de LIs na formação químio-enzimática de N-alquinoxaziridinas **118** e **119** usando a CALB. Reações em (■) n-hexano, (■) éter etílico, (■) etanol, (■) acetonitrila, e (■) diclorometano em misturas com [BMIm][SCN], [BMIm][Cl], [BMIm][BF<sub>4</sub>]

**Tabela 14.** Efeito da adição de [BMIm][X]<sup>(a)</sup> na formação de (E)-2-N-benziliden-3-etilhexil oxaziridina (**118**).

Meio reacional <sup>(c)</sup>	Seletividade (isômero E %) <sup>(b)</sup>				
	hexano	etanol	éter etílico	acetonitrila	diclorometano
[SCN <sup>-</sup> ]	100	100	100	100	100
[Cl <sup>-</sup> ]	100	100	80	80	70
[BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	80	100	60	65	65
[PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	80	100	50	70	70
hexano <sup>(d)</sup>	65	-	-	-	-
etanol	-	70	-	-	-
éter etílico	-	-	60	-	-
acetonitrila	-	-	-	65	-
diclorometano	-	-	-	-	65

(a) LIs 10% v/v. (b) seletividade determinada por CG. (c) solventes orgânicos (9 mL), LI (1 mL) [BMIm][X], onde X= BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, SCN<sup>-</sup> e Cl<sup>-</sup>, (d) solvente orgânico (10 mL).

Os resultados apresentados na **Figura 69** mostraram que a conversão em **118** e **119**, foi dependente do solvente orgânico e do ânion do líquido iônico. Isso provavelmente ocorreu, porque diferentes ânions podem de certa forma apresentar interações distintas com a estrutura da lipase causando mudanças conformacionais bastante significativas, e conseqüentemente alterar a atividade catalítica.<sup>81,82,83</sup>

Por se tratar de uma cadeia de proteínas, onde a configuração tridimensional é determinada por inúmeras interações hidrofílicas e hidrofóbicas, os ânions poderão interferir na estrutura terciária da proteína e com isso causar mudanças conformacionais.<sup>139,140</sup> Esse efeito portanto, pode influenciar nos valores de conversão obtidos em função dos diferentes sistemas empregados.

Segundo Zhao *et al.*<sup>139</sup> os ânions presentes no meio reacional podem atuar como estabilizante ou desestabilizantes de uma enzima seguindo a série de Hofmeister<sup>141</sup>, que demonstra a ordem dos íons que possuem maior ou menor afinidade/interação com a superfície do biocatalisador (ordem chamada de kosmotropicidade).

A utilização de LIs em misturas com *n*-hexano não foi eficiente para a obtenção das oxaziridinas **118** e **119**. Os resultados mostraram que houve diminuição na conversão em produto comparado com o uso de *n*-hexano puro (73% em 12h de reação). Por exemplo, ao utilizar o [BMIm][SCN] e [BMIm][Cl], no meio reacional as conversões em produtos foram de <5% e com [BMIm][BF<sub>4</sub>] e [BMIm][PF<sub>6</sub>] foram de 35% e 64%, respectivamente.

A utilização de líquido iônico em mistura com éter etílico foi eficiente, obtendo-se 90% de conversão em produtos usando os LIs com os ânions Cl<sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup> e BF<sub>4</sub><sup>-</sup>. Porém, ao usar [BMIm][SCN], a conversão foi de apenas 5%.

Utilizando éter etílico puro obteve-se 26% de produtos em 12h. Outro resultado bastante interessante é que a seletividade do produto variou de acordo com o tipo de líquido iônico, obtendo-se 100% do isômero *E* na presença de [BMIm][SCN], 80% com o Cl<sup>-</sup>, 60% com BF<sub>4</sub><sup>-</sup> e uma mistura de 50% de cada isômero utilizando o [BMIm][PF<sub>6</sub>]. Estes resultados estão apresentados na **Tabela 14**.

Utilizando os diferentes LIs com etanol, as conversões em geral, foram maiores quando comparadas com o solvente puro (com exceção do uso de [BMIm][Cl]) sendo de 12% em 12h. As conversões em oxaziridinas foram de 5, 15, 20 e 31% ao utilizar os LIs com os ânions Cl<sup>-</sup>, SCN<sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, e PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, respectivamente.

Pode-se destacar também que o uso de etanol em misturas com LIs, favoreceu a formação de 100% do isômero *E*. Quando utilizou etanol puro, a razão isomérica de *E:Z* foi de 70:30.

Conforme já discutido anteriormente, a utilização de acetonitrila e diclorometano com [BMIm][PF<sub>6</sub>], favoreceu um aumento na conversão em produtos (99% e 70% respectivamente). Porém, com o uso desses solventes em misturas com [BMIm][BF<sub>4</sub>], [BMIm][SCN] e [BMIm][Cl], foi observado diminuição nas conversões em **118** e **119**, sendo de 14-40%.

De maneira geral as conversões em oxaziridinas foram muito baixas quando se utilizou o [BMIm][SCN] como co-solvente. Estes resultados podem estar relacionados à baixa kosmotropicidade do ânion SCN<sup>-</sup>, que é responsável pela alta inibição enzimática.<sup>141</sup>

Observando estes resultados, nota-se que a adição de LIs é interessante, porque em diferentes meios é possível obter um aumento na conversão em produtos e também na seletividade, em especial com o uso de etanol.

O fato da seletividade com relação aos isômeros *E* e *Z* apresentar valores diferentes em função do LI empregado deve-se possivelmente à interação dos íons presentes em solução com o substrato, favorecendo a estabilização predominante do isômero *E*.

Este comportamento foi similar aos resultados obtidos por Kraiem *et al.*<sup>113</sup> e Mohajer *et al.*<sup>114</sup> na formação de N-alkiloxaziridinas em meios com tricloroacetonitrila e Oxona, respectivamente.

Outros trabalhos na literatura mostraram de forma bastante similar o aumento na seletividade e de rendimentos em produtos a partir da adição de LIs no meio reacional. Destaca-se os estudos de Chiappe *et al.*, que demonstraram que o uso de [BMIm][PF<sub>6</sub>] em reações de hidrólise de óxidos de 4-cloro-estireno com epóxido hidrolases de *Aspergillus niger*, favoreceu a formação do diol-*R* com *ee* >98%.<sup>142</sup>

Em um outro trabalho, Chen *et al.* utilizaram diferentes líquidos iônicos na abertura regioselectiva de epóxidos utilizando tiofenóis obtendo-se excelentes conversões (83-97%) em função do tipo de substrato e em condições brandas de reação.<sup>143</sup>

Outro fator que pode alterar sensivelmente a seletividade dos produtos formados está relacionado aos grupos substituintes ligados ao nitrogênio imínico.<sup>113, 114</sup>

Deve-se mencionar também a possível isomerização da imina no processo de oxidação devido a protonação e conseqüente rotação da ligação C-N,<sup>106,114</sup> ou até mesmo a auto isomerização da oxaziridina depois de formada.

A partir destas considerações, nos próximos estudos será avaliada a influência de diferentes grupos ligados ao nitrogênio e ao anel aromático do benzaldeído.

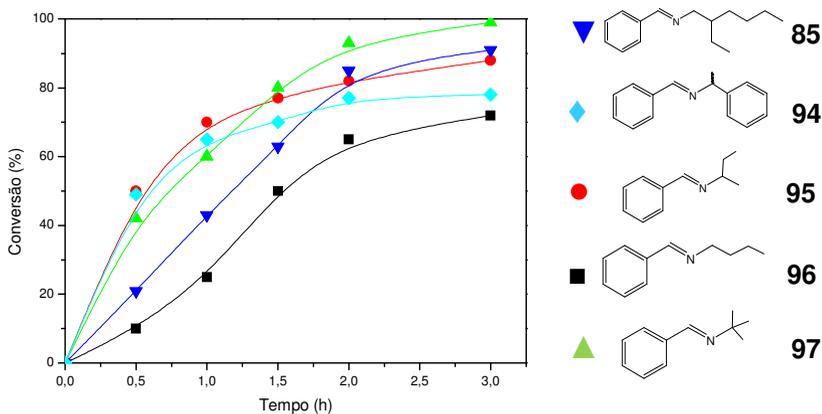
#### 4.3.4. Influência de grupos substituintes na conversão e seletividade em N-alquinoxaziridinas.

##### 4.3.4.1. Influência de grupos ligados ao nitrogênio imínico.

A oxidação de iminas, utilizando diferentes oxidantes vem sendo amplamente estudada, pois as oxaziridinas são compostos que possuem muitas aplicações em síntese orgânica. Um detalhe curioso é que a oxidação dessas iminas pode levar a formação de N-alquinoxaziridinas com proporções distintas dos isômeros *E* e *Z*. A proporção entre esses isômeros depende muitas vezes da polaridade do meio onde as reações ocorrem, além da própria estabilidade energética do isômero.<sup>114</sup>

Portanto, inicialmente fêz-se um estudo para avaliar o percentual de isômeros obtidos em função do tamanho da cadeia alquílica ligado ao nitrogênio imínico.

Para estes estudos utilizaram-se as iminas **85**, **94**, **95**, **96** e **97**. As conversões nas correspondentes oxaziridinas em função do tempo estão demonstradas na **Figura 70**.



**Figura 70.** Variação da conversão (%) em oxaziridinas em função do tempo reacional, utilizando os substratos **85**, **94**, **95**, **96**, e **97**. [Iminas (0,4

mmol), ACN (5 mL), UPH (0,4 mmol), ácido octanóico (1 mmol), CALB (25 mg), determinado por CG].

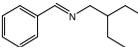
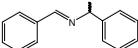
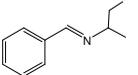
Os resultados obtidos mostraram que as conversões foram maiores com o aumento do volume do grupo ligado ao nitrogênio, como pode ser verificado a partir das estruturas dos substratos. Utilizando a imina **97**, a conversão na correspondente oxaziridina foi >99% em 3h de reação. Com os substratos **85**, **94**, **95** e **96**, as conversões foram de 91, 88, 78 e 72%, respectivamente também após 3 h.

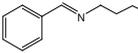
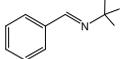
A velocidade de formação dos produtos e a seletividade (*E:Z*) do processo foram também dependentes do grupo ligado ao nitrogênio. Os dados obtidos mostraram que a reação foi favorecida (tanto em termos de conversão quanto em seletividade) pela presença de grupos mais volumosos ligados ao nitrogênio. Por exemplo, a oxidação do substrato **97** que possui um grupo volumoso como o grupo *terc*-butil, formou 100% do isômero *E*. (**Tabela 15**).

A velocidade inicial de oxidação do substrato **97** foi duas vezes maior que de **95** e cinco vezes maior em relação ao substrato **96**.

Os isômeros *E* e *Z* obtidos, foram separados por coluna cromatográfica e caracterizados por RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. Os sinais de RMN-<sup>1</sup>H relativos aos hidrogênios do anel oxazirano estão também apresentados na **Tabela 15**.

**Tabela 15.** Oxidação químio-enzimática de alquiliminas catalisada pela CALB.<sup>(a)</sup>

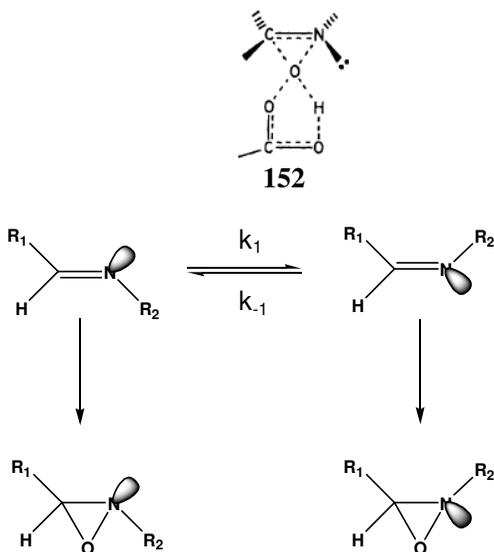
Imina	Estrutura	Oxaziridinas	c (%) <sup>(b)</sup>	<i>E:Z</i> <sup>(c)</sup>	δH (ppm)	V inicial (mmol.m <sup>-1</sup> .in <sup>-1</sup> )
<b>85</b>		<b>118/119</b>	91	65:35	4,47 ( <i>E</i> ) 5,25 ( <i>Z</i> )	0,08
<b>94</b>		<b>136/137</b>	78	80:20	4,59 ( <i>E</i> ) 5,04 ( <i>Z</i> )	0,16
<b>95</b>		<b>142</b>	88	80:20	4,48 ( <i>E</i> ) 5,14 ( <i>Z</i> )	0,09

96		143	72	70:30	4,47 (E) 5,12 (Z)	0,04
97		138	>99	100:0	4,68 (E)	0,20

(a) condições reacionais estão descritas na Seção 3.3.11 p.67. (b) conversões determinadas por CG a partir da mistura de isômeros (*E* e *Z*), 3 h. (c) determinado por CG,

De acordo com Boyd e outros autores a formação de diferentes proporções de isômeros pode ser influenciada em função dos mecanismos propostos.<sup>144</sup>

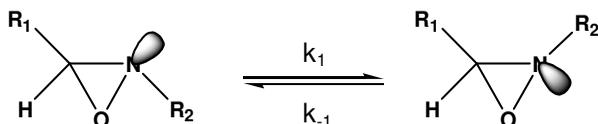
Caso a reação seja pelo mecanismo concertado, **152**, pode ocorrer inicialmente a auto-isomerização da imina no meio reacional em virtude da presença de ácidos, como apresentado no **Esquema 4**.<sup>145</sup>



**Esquema 4.** Auto-isomerização de uma imina e posterior formação de oxaziridina.

Para verificar essa hipótese, fêz-se um procedimento bastante simples. A imina **85** foi dissolvida em acetonitrila na ausência e presença dos líquidos iônicos (10% v/v) juntamente com o doador acila (ácido octanóico) por 24h. Em seguida, fez-se análise por CG, e não foi observada a isomerização da imina observado através de tempos de retenção que foram iguais. ( $t_R = 5,6$  min)

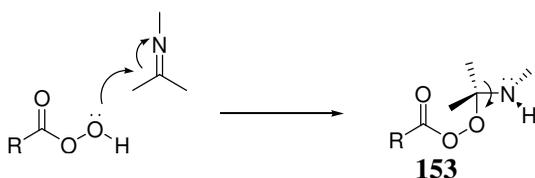
Outra hipótese apresentada é a auto-isomerização da oxaziridina depois de formada como apresentado no **Esquema 5**, onde os valores de  $k_{-1}$  devem ser maiores que os de  $k_1$ .



**Esquema 5.** Auto-isomerização de oxaziridinas.

O que pode ocorrer também no caso de um mecanismo concertado, é o ataque do perácido por um das faces da ligação C=N, levando a formação preferencial de um dos isômeros e por isso, é importante o tamanho do grupo ligado ao nitrogênio imínico na seletividade.<sup>114</sup>

Alguns autores<sup>146</sup> também consideram que a formação de oxaziridinas catalisada por perácidos pode ocorrer por mecanismo de 2 etapas, conforme apresentado no **Esquema 6**, com a formação do intermediário **153**.



**Esquema 6.** Mecanismo de oxidação de iminas em duas etapas.

Neste caso, a isomerização E/Z é verificada a partir do ataque do perácido ao carbono imínico, podendo ocorrer a rotação da ligação C-N, formando o outro isômero.

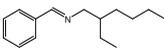
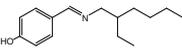
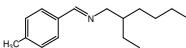
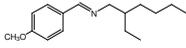
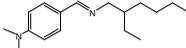
Entretanto, não se pode descartar nenhuma das duas hipóteses mecanísticas apresentadas, pois ainda não há um estudo mais preciso que comprove realmente qual mecanismo é o preferencial para a formação de oxaziridinas por oxidação com perácidos.

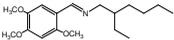
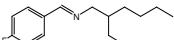
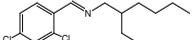
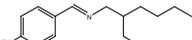
#### 4.3.4.2. Influência de grupos ligados ao anel aromático do benzaldeído

Após a otimização de alguns parâmetros descritos acima, foram utilizadas duas séries de N-alquiliminas, com diferentes grupos substituintes no anel aromático do benzaldeído para verificar a formação e a seletividade das oxaziridinas.

Na **Tabela 16** estão demonstrados os valores de conversão (%) e a seletividade das oxaziridinas formadas em função do grupo substituinte ligado ao anel aromático de uma série de N-benziliden-2-etilhexilaminas. Os resultados apresentados na **Tabela 16** mostraram alta eficiência na formação de oxaziridinas, como pode ser verificado pelos valores de conversão (28-99%).

**Tabela 16.** Oxidação químio-enzimática de alquiliminas derivadas da N-benziliden-2-etilhexilamina **85-93** catalisada pela CALB.<sup>(a)</sup>

Composto	Alquilimina	Oxaziridinas	Conv (%) <sup>(b)</sup>	E:Z <sup>(c)</sup>	$\delta$ H (ppm) <sup>(d)</sup>
<b>85</b>		<b>118/119</b>	43	65:35	4,47 (E) 5,25 (Z)
<b>86</b>		<b>120/121</b>	87	70:30	4,37 (E) 5,19 (Z)
<b>87</b>		<b>122/123</b>	90	75:25	4,44 (E) 5,21 (Z)
<b>88</b>		<b>124/125</b>	95	75:25	4,40 (E) 5,17 (Z)
<b>89</b>		<b>126/127</b>	88	70:30	4,42 (E) 5,11 (Z)

90		128/129	>99 (e)	75:25	3,95 (E) 5,27 (Z)
91		130/131	50	71:29	4,45 (E) 5,23 (Z)
92		132/133	35	80:20	4,91 (E) 5,39 (Z)
93		134/135	28	75:35	4,61 (E) 5,25 (Z)

(a) condições reacionais estão descritas na Seção 3.3.11. p.67. (b) conversões determinadas por CG a partir da mistura de isômeros em 1 h de reação, (c) determinado por <sup>1</sup>H-RMN. (d) deslocamento químico referente ao hidrogênio do anel oxazirano. (e) 20 min.

Ao utilizar substratos com grupos doadores de elétrons no anel benzênico observou-se um efeito bastante pronunciado, com o aumento das conversões aos produtos. Por exemplo, na presença de grupos substituintes tais como 4-OH (**86**), 4-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (**89**), 4-CH<sub>3</sub> (**87**) e 4-OCH<sub>3</sub> (**88**) e as conversões foram de 87, 88, 90 e 95%, respectivamente. Além disso, utilizando o substrato que possui o grupo 2,4,5-tri-OCH<sub>3</sub> no anel aromático (**90**), a conversão foi >99% em apenas 20 min de reação, mostrando que a presença de grupos substituintes doadores de elétrons fortes influenciam de maneira favorável na formação da correspondente oxaziridina. Estes, foram maiores quando comparados com o obtido para o substrato com hidrogênio (**85**) cuja conversão foi de apenas 43% em 1h de reação.

Utilizando os substratos com grupos retiradores de elétrons, tais como o 4-F (**91**), 2,4-Cl (**92**), e 4-NO<sub>2</sub> (**93**), os valores de conversão foram menores sendo de 50, 35, e 28%, respectivamente.

Observou-se também que a razão *E:Z* praticamente manteve-se constante independente da natureza e da posição do grupo ligado ao anel aromático, sendo de aproximadamente 70:30%.

Portanto, conforme observado, o parâmetro que causou maior efeito na seletividade dos produtos foi principalmente o tamanho dos

grupos ligados ao nitrogênio imínico e o meio reacional (principalmente com a adição de líquidos iônicos).

As conversões obtidas em função do tipo de substituinte mostraram que provavelmente o mecanismo mais favorável ocorreu de modo concertado, pois o aumento na densidade eletrônica na ligação imínica pela presença de grupos doadores de elétrons favoreceu o ataque da ligação ao oxigênio eletrofílico do perácido. Este mecanismo é similar ao da epoxidação eletrofílica de alcenos.<sup>113,114</sup>

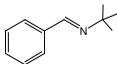
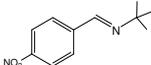
Porém, não se pode descartar a hipótese do mecanismo ocorrer em duas etapas (**Esquema 6**), pois conforme descrito nos itens 4.3.3. e 4.3.4., a seletividade pode ser favorecida pela rotação da ligação C-N, formada pelo ataque do perácido ao carbono imínico. Este mecanismo foi sugerido por Davis *et al.* na oxidação de sulfoniliminas com *m*-CPBA.<sup>147</sup>

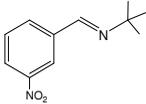
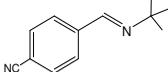
Em outro estudo, utilizou-se uma série de N-alquiliminas derivadas da N-benziliden-*tert*-butilamina (**97-100**). Os dados de conversão estão apresentados na **Tabela 17**.

Analisando estes dados, pode-se observar que as oxaziridinas **138-141** foram obtidas com boas conversões (31-60%) e formação de 100% do isômero *E* em apenas 1h de reação, independente do grupo substituinte e da posição no anel aromático.

Comparando os valores de conversões em oxaziridinas, pode-se notar que a presença de grupos retiradores de elétrons tais como, 4-CN, 3- e 4-NO<sub>2</sub> desfavoreceram a formação dos produtos desejados e estes foram obtidos com conversões de 56, 34 e 31%, respectivamente.

**Tabela 17.** Oxidação químio-enzimática de alquiliminas derivadas da N-benziliden-*tert*-butilamina **97-100** catalisada pela CALB.<sup>(a)</sup>

Imina	Estrutura	Oxaziridina	Conv (%) <sup>(b)</sup>	<i>E:Z</i> <sup>(c)</sup>	$\delta\text{H}$ (ppm) <sup>(d)</sup>
<b>97</b>		<b>138</b>	60	100:0	4.68 ( <i>E</i> )
<b>98</b>		<b>139</b>	34	100:0	4.70 ( <i>E</i> )

<b>99</b>		<b>140</b>	31	100:0	4.73 (E)
<b>100</b>		<b>141</b>	56	100:0	4.80 (E)

(a) condições reacionais estão descritas na Seção 3.3.11. p. 67. (b) conversões determinadas por CG em 1 h. (c) determinado por <sup>1</sup>H-RMN. (d) deslocamento químico referente ao hidrogênio do anel oxazirano.

Os resultados apresentados neste capítulo mostraram que diferentes oxaziridinas podem ser obtidas de forma eficiente a partir do método empregado. A formação químio-enzimática destes compostos é bastante interessante, pois trata-se de uma metodologia que usa condições brandas, isto é, não são necessárias a utilização de oxidantes fortes ou de temperaturas elevadas.

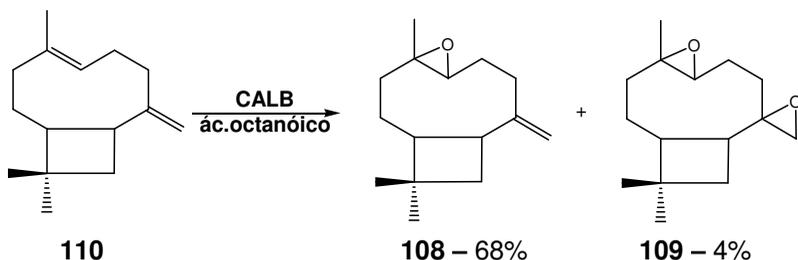
A síntese de peróxi-ácidos de cadeias longas pelo método químico tradicional requer o uso de ácidos minerais e condições reacionais mais drásticas, fatores estes que limitam o uso deste reagente devido ao grau de toxicidade e a formação de subprodutos na reação.<sup>61,62,63,71</sup>

Porém, uma desvantagem desta metodologia é o custo do biocatalisador. Vários estudos vêm sendo realizados com o intuito de utilizar diferentes suportes para a imobilização de enzimas e com isso manter ou aumentar sua atividade em solventes orgânicos e em temperaturas mais elevadas. Como o desenvolvimento da engenharia genética e a descoberta de biocatalisadores mais resistentes surgem novas oportunidades para aumentar a eficiência dos processos de biotransformação.<sup>12-15</sup>

#### 4.4. EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DO $\alpha$ -CARIOFILENO (110)

O  $\alpha$ -cariofileno (110) foi selecionado com o substrato de interesse por apresentar em sua estrutura dois tipos de ligações duplas, uma endocíclica e outra exocíclica terminal.

Nos estudos iniciais, avaliou-se a formação do epóxido em função do tempo de reação. Na **Figura 71**, está apresentada a equação química para a reação de epoxidação de 110, e obtenção dos correspondentes epóxidos.



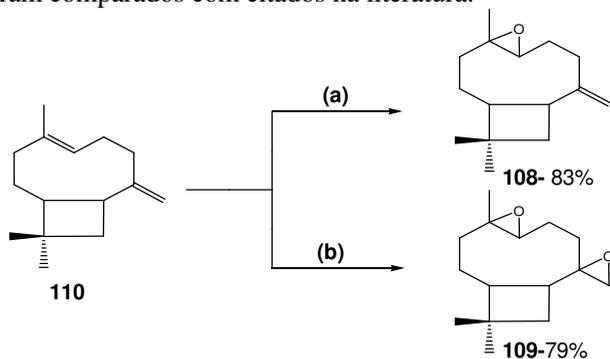
**Figura 71.** Epoxidação químio-enzimática do  $\alpha$ -cariofileno (**110**) [**110** (2,5 mmol), CALB (50 mg) , PHA (5 mmol), ácido octanóico (1 mmol), 4 h, t.a, 150 rpm].

Através de análises de cromatografia gasosa, pode-se observar que inicialmente formou o epóxido **108** nas duas primeiras horas de reação. Em seguida, observou-se a formação do di-epóxido **109** sendo este o único produto obtido após 24 h, com 79 % de rendimento.

Porém, quando se utilizou UPH como doador peróxido, observou-se somente a formação do mono-epóxido **108**, com rendimento de 83% em 24 h.

Na **Figura 72**, estão apresentados os produtos formados em função do doador peróxido utilizado.

A formação destes compostos foi confirmada por espectrometria de massas com base nos íons dos picos moleculares, sendo de 220 e 236 para os produtos **108** e **109**, respectivamente. Posteriormente, esses dados foram comparados com citados na literatura.<sup>123</sup>

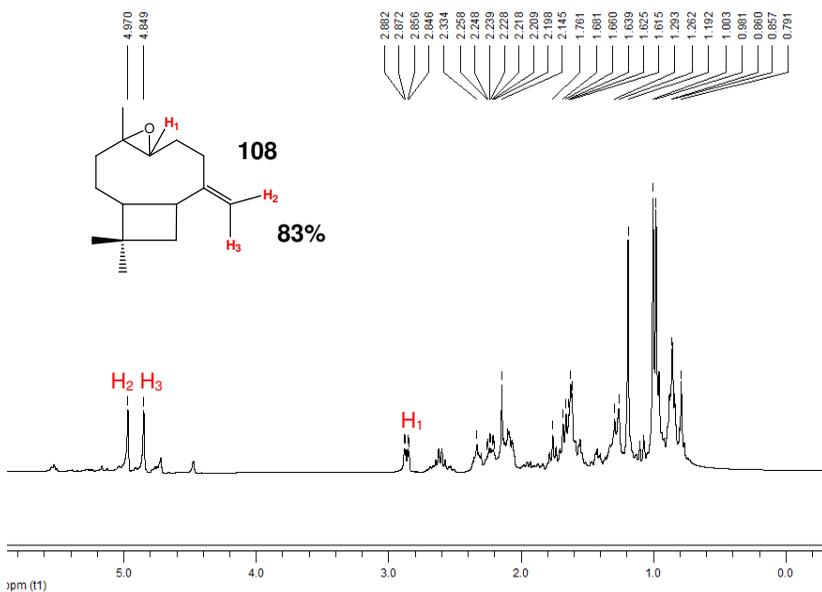


**Figura 72.** Epoxidação químio-enzimática do **110** utilizando dois diferentes doadores peróxidos. [**101** (2,5 mmol), CALB (50 mg), ácido octanóico (1 mmol), 24 h, t.a, DCM. em (a) UPH (5 mmol) e (b) PHA (5 mmol)].

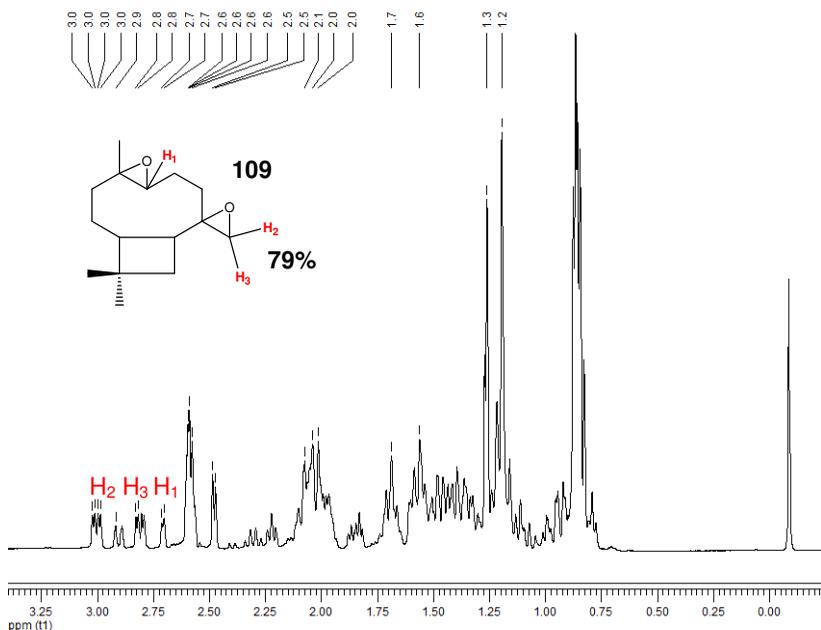
Os compostos **108** e **109** foram isolados conforme procedimento descrito na Seção 3.3.9. p.60 e caracterizados por e RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. Nas **Figuras 73** e **77** estão demonstrados os espectros de RMN-<sup>1</sup>H do mono e di epóxidos derivados do □-cariofileno.

No espectro de RMN-<sup>1</sup>H do composto **108**, observou-se um quarteto em 2,88 ppm (H<sub>1</sub>) que corresponde ao hidrogênio do anel epóxido, e os picos em 4,97 e 4,84 ppm (H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub>) dos hidrogênios ligados ao carbono da ligação dupla exocíclica (**Figura 76**).

O diepóxido derivado do cariofileno **109**, foi identificado no espectro de RMN-<sup>1</sup>H pelos sinais na região de 3,00 ppm à 2,80 ppm, que são referentes aos hidrogênios dos dois anéis oxiranos (**Figura 74**).



**Figura 73.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H ampliado de 0,0-5,5 ppm do **108**. [**110** (2,5 mmol), UPH (5 mmol) CALB (50 mg), t.a., acetonitrila, 24 h. (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)]



**Figura 74.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H ampliado de 0,0-3,25 ppm do **109**. [**110** (2,5 mmol), PHA (5 mmol), CALB (50 mg), t.a., acetonitrila, 24 h. (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)].

Com este estudo, pode-se demonstrar que a escolha do doador peróxido é importante. Ao utilizar o UPH que é um oxidante mais brando, observou-se um aumento na regioseletividade da reação. Porém, a mesma reação ocorreu em um tempo maior quando comparada com a reação com PHA.

Com relação à escolha do doador peróxido pode-se citar alguns trabalhos na literatura. Por exemplo, nos estudos feitos por Ankudey *et al.* na epoxidação químico-enzimática do fenilcicloexeno em acetonitrila com UPH e CALB, obteve-se o correspondente epóxido com 42 % em 5 h e não foi detectada a formação de produtos de hidrólise. O autor também citou que o uso de UPH favoreceu a reutilização da CALB quando comparado com PHA, sendo que a conversão ao produto diminuiu drasticamente com a reutilização do biocatalisador.<sup>133</sup>

Além do doador peróxido, a procedência das lipases e a forma de sua imobilização são importantes, pois em muitos casos observa-se um aumento da resistência física e química do biocatalisador além da possi-

bilidade de reutilização. As lipases imobilizadas, em geral são mais eficientes neste processo, como é o caso da CALB.

No estudo a seguir, será avaliada a influência da imobilização na epoxidação da (-)-carvona, usando a LPS como biocatalisador.

#### 4.5. EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DA (-)-CARVONA (**101**).

Um dos grandes problemas no uso de enzimas era o seu uso restrito quanto ao meio em que era empregado devido às interações com os solventes orgânicos, podendo em alguns casos ocorrer a inativação. Para minimizar este problemas, os biocatalisadores podem ser imobilizados em suportes sólidos, para conferir maior resistência mecânica e química, em diferentes meios reacionais, e em especial na presença de agentes oxidantes.<sup>115,128</sup>

Neste experimento, utilizou-se a LPS imobilizada em diferentes suportes tais como filmes de amido de cará (AC) e inhame (AI), caseinato de sódio (CS), álcool polivinílico (PVA), gelatina (G) e em montmorilonita (K10) na epoxidação da (-)-carvona (**101**), com o ácido octanóico e PHA e UPH (**Figura 75**).

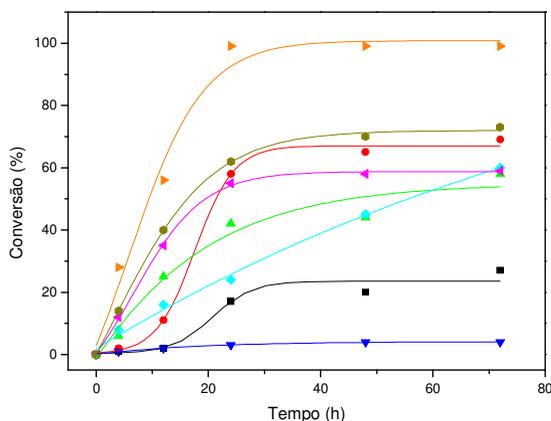


**Figura 75.** Epoxidação químio-enzimática da (-)-carvona. [**101** (2,5 mmol), LPS imobilizada (50 mg), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, (10 mL), PHA e UPH (5 mmol), ácido octanóico (2,5 mmol), t.a., 150 rpm]

Ao utilizar o PHA (30%), não foi observada a formação do produto **102** utilizando a LPS imobilizada em todos os suportes. Este resultado provavelmente é devido a presença de água no meio reacional proveniente do PHA. Os suportes poliméricos formaram um aglomerado de difícil manuseio, o que dificultou a difusão dos substratos para o sítio catalítico da enzima, e assim a reação não foi observada.

Um comportamento diferente foi observado nas reações feitas com UPH. Todos os suportes utilizados se mantiveram intactos e o epóxido derivado da (-)-carvona foi obtido com conversões que variam de 2 à 60 % em 24 h de reação. Os produtos foram quantificados por CG e caracterizados por RMN-<sup>1</sup>H.

Na **Figura 76** estão apresentados os valores de conversão em **102** em função do tempo de reação ao utilizar a LPS imobilizada em diferentes suportes no intervalo de 0-72 h. Para fins comparativos, fez-se a reação utilizando a LPS na forma livre e a CALB.



**Figura 76.** Variação da conversão em **102** (%) em função do tempo, utilizando a LPS imobilizada em (●) AI, (●) AC, (▲) CS, (◄) PVA, (◆) G, (▼) K10, (■) na forma livre e (▶) CALB como biocatalisadores. [**101** (2,5 mmol), UPH (5 mmol), ácido octanóico (2,5 mmol), DCM (10 mL), CALB e LPS (50 mg), 72 h, t.a. 150 rpm].

Os resultados mostraram que, em geral, o processo de imobilização da LPS foi eficiente, considerando que houve um aumento das conversões em **102** sendo na faixa de 5 à 40% a partir de 12h de reação. Com o uso da mesma na forma livre, foi de apenas 17% em 24h.

A utilização de amido de diferentes fontes se mostrou um suporte estável e eficiente para estas reações. As conversões em **102** foram de 59 e 62%, em 24 h ao utilizar os amidos de cará e inhame, respectivamente. O PVA também foi eficiente como suporte para a LPS, e o produto foi obtido com 57% de conversão em 24h. A partir desse tempo, a conversão manteve-se praticamente constante (57-59%).

Utilizando o caseinato de sódio como suporte, a conversão em **102** foi de 40% em 24h.

Quando a gelatina foi utilizada para a imobilização da LPS a conversão em **102** foi de 22% em 72h. Neste caso, não foi possível retirar o filme do meio reacional devido à alteração na sua consistência, formando um aglomerado de difícil manuseio.

Utilizando a CALB como biocatalisador, as conversões em **102** foram quantitativas (>99%) a partir de 24 h de reação.

Com o emprego de K10, as conversões foram baixas sendo <4% em até 72h de reação. Apesar da aparência intacta no meio reacional, este suporte com a enzima não foi eficiente nesta reação.

Na literatura alguns trabalhos relatam a eficiência do uso de K10 como suporte em reações biocatalisadas. Por exemplo, este suporte foi usado para a imobilização da lipase de *Aspergillus niger* na resolução de (*R,S*)-ibuprofeno com 1-propanol. O produto foi obtido com conversão de 32% ,  $ee_p$  34,8% e  $E = 10$ .<sup>149</sup>

Os resultados apresentados demonstraram a eficiência do processo de imobilização da LPS como pode ser observado pelo aumento das conversões quando comparadas com o uso da enzima livre. A exposição prolongada do biocatalisador ao doador peróxido contribuiu para a diminuição da atividade da enzima. Portanto, nestes sistemas, a imobilização protegeu a LPS do meio orgânico externo favorecendo a formação de produtos.

Outros trabalhos citados na literatura reportaram a aplicação de enzimas imobilizadas. O PVA foi usado em blendas com poli-siloxanas (POS-PVA) para imobilizar a lipase de *C. antarctica* na preparação de lauratos de glicerila. Os resultados mostraram que a produtividade do composto com a lipase imobilizada ( $0.82 \text{ mmol.h}^{-1}$ ), foi similar ao da CALB. A conversão em produto foi de 80%.<sup>150</sup>

O processo de imobilização de enzimas é importante devido ao aumento da estabilidade do biocatalisador no meio reacional, podendo ser aplicado em escalas industriais e com relativa redução de custo, já que o biocatalisador pode ser reutilizado.

#### 4.6. EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DE DERIVADOS DE CICLOEXADIENODIENÓIS.

Uma outra classe de compostos de interesse em síntese orgânica são os derivados de cicloexadienodienóis, pois são intermediários para a preparação de inositóis e ciclitóis, que possuem muitas aplicações biológicas.<sup>125</sup>

Inicialmente utilizou-se os substratos **112**, **113**, e **116** na epoxidação pelo método químico-enzimático com a CALB.

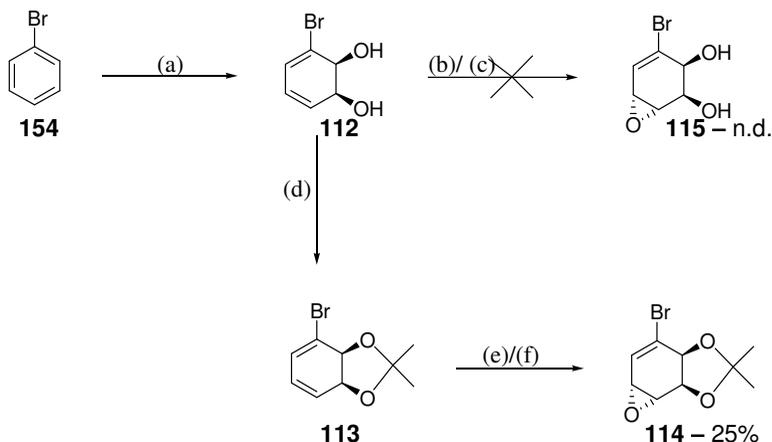
Para preparar estes compostos, utilizou-se uma cepa mutante de *Pseudomonas putida* F39/D que expressa enzimas do tipo tolueno dióxigenase para a oxidação do composto **154**, fornecendo o produto **112**.<sup>151</sup>

Este microorganismo tem sido amplamente usado em síntese orgânica para a preparação de compostos com alta funcionalidade e pureza enantiomérica.<sup>151</sup>

O grande desafio neste estudo é a epoxidação direta do composto **112** para a formação do composto **115**, pois o mesmo não é epoxidado nem mesmo com as metodologias convencionais e com o uso de *m*-CPBA.<sup>125</sup>

Foram testadas várias condições na tentativa de efetuar a epoxidação químico-enzimática de **112**. Porém, os testes mostraram que **112** não pode ser epoxidado nestas condições (**Esquema 7**).

Pelas análises de RMN-<sup>1</sup>H foram identificados somente compostos oriundos da aromatização do reagente, como por exemplo, o bromobenzeno **154**.



(a) – *Pseudomonas putida* F/39D

(b) – *m*-CPBA 1:1,2 eq, DCM, 12 h

(c) – CALB, ACN, ácido octanóico, 7 dias.

(d) – DMP, acetona, 30 min, 65 %

(e) – CALB (50 mg), acetato de etila (15 mL), UPH (0,5 mmol), 12 h, – n.d.

(f) – CALB (50 mg), acetonitrila (15 mL) UPH (0,5 mmol), ácido octanóico (0,2 mmol), 12 h – 25%

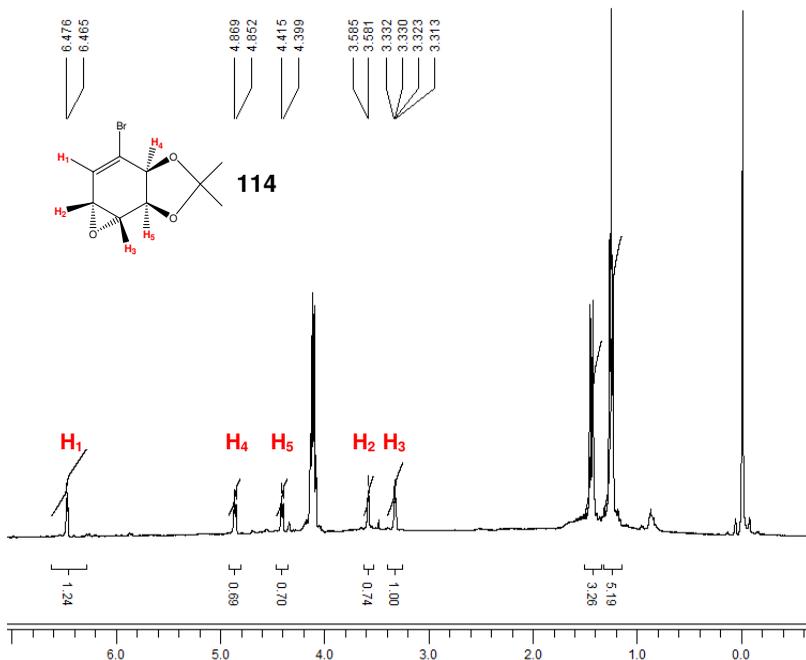
**Esquema 7.** Epoxidação químico-enzimática de derivados de cicloexadieno-dienóis.

A epoxidação químico-enzimática somente foi possível após a proteção do composto **112** com 1,2-dimetóxi propanol (DMP) em acetona, formando o composto **113** com 65% de rendimento.

Em seguida, o composto **113** foi epoxidado pelo método químico-enzimático, utilizando a CALB e o ácido octanóico. A reação foi monitorada por CCD, utilizando hexano:acetato de etila 50:50 v/v (Rf = 0,60).

Após 12 h de reação, fez-se uma filtragem para retirar a CALB, e em seguida adicionou-se clorofórmio para precipitar o UPH. O composto **114** foi purificado por cromatografia de coluna para retirar o ácido octanóico e o reagente **113**.

O composto obtido foi pesado, calculado o rendimento (25 %) e caracterizado por RMN-<sup>1</sup>H, e o espectro está apresentado na **Figura 77**, com a atribuição de todos os hidrogênios. Os picos relativos aos hidrogênios do anel oxirano são observados em 3,58 e 3,33 ppm.

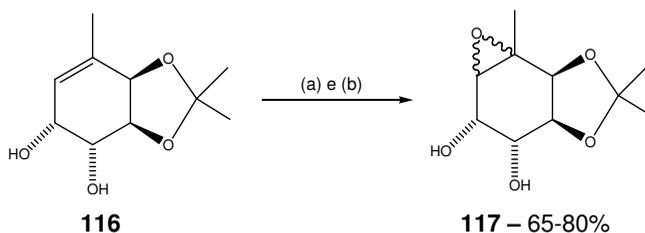


**Figura 77.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de **114** obtido pelo método químico-enzimático. [**113** (2,7 mmol), CALB (50 mg), t.a., acetonitrila, 12 h, (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).]

Foram utilizados tempos maiores de reação para verificar o possível aumento na conversão em **114**. Observou-se por CCD a formação de subprodutos com  $R_f = 0,70-0,92$ , devido à exposição do composto de partida com vários outros reagentes, e não foi possível obter o produto com maiores rendimentos. Outras condições reacionais deverão ser testadas, pois os resultados iniciais obtidos são promissores.

A seguir, foi testado outro derivado de cicloexadienodienóis. O composto **116** foi preparado pelo grupo de Biotatálise e Biotransformações (LBB) da Universidad de La Republica (UdeLaR), Montevideu (Uruguai).

A obtenção do produto epoxidado **117** foi feita conforme procedimento descrito na Seção 3.3.10 p. 63 e monitorada por CCD ( $R_f = 0,42$ ). (**Figura 78**).

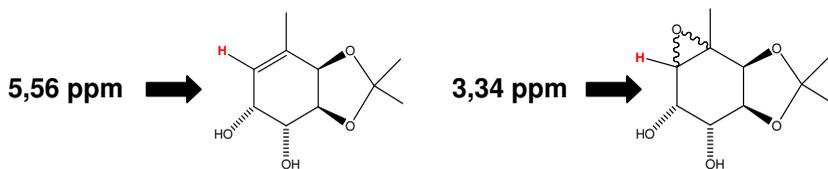


**Figura 78.** Epoxidação químio-enzimática de **110**. [(a) **116** (0,4 mmol), CALB (50 mg), acetato de etila (15 mL), UPH (0,5 mmol), 24 h, t.a. 150 rpm – 65%. (b) **116** (0,4 mmol), CALB (50 mg), acetonitrila (15 mL), UPH (0,5 mmol), ácido octanóico (0,2 mmol), 24 h, t.a. 150 rpm – 80%].

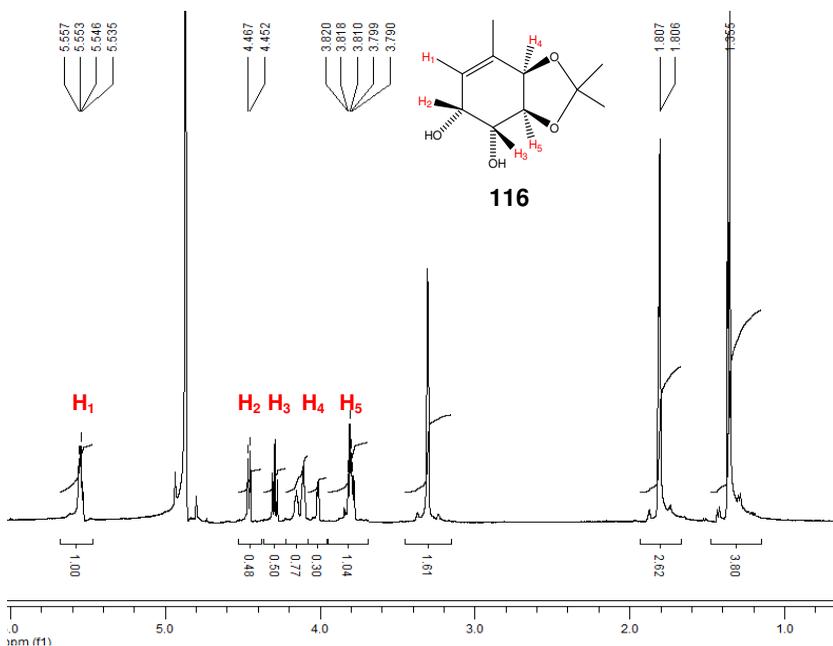
O produto obtido foi caracterizado por RMN- $^1\text{H}$ , e comparado com o espectro do reagente de partida **116** (**Figura 80**).

Analisando os espectros das **Figuras 80 e 81**, foi confirmada a formação do epóxido devido a presença do pico em 3,34 ppm referente ao hidrogênio do anel oxirano, além da ausência do pico em 5,56 ppm que corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono da ligação dupla do composto **116**.

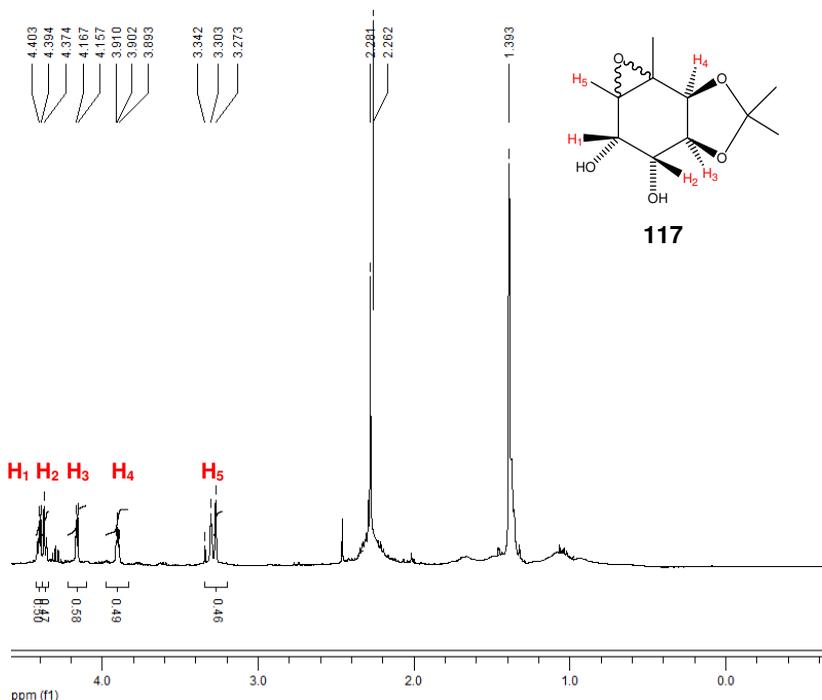
Os valores em ppm dos hidrogênios correspondentes estão demonstrados na **Figura 79**.



**Figura 79.** Atribuição dos sinais de RMN-<sup>1</sup>H referentes aos hidrogênios da ligação dupla do composto **116** e do anel oxirano **117**.



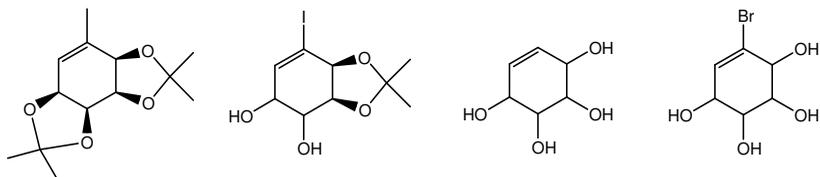
**Figura 80.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do **116**. (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz).



**Figura 81.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  do **117** obtido pelo método químio-enzimático. [**116** (0,4 mmol), CALB (50 mg), acetato de etila (15 mL), UPH (0,5 mmol), 24 h, t.a., ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).]

A epoxidação químio-enzimática de compostos derivados de cicloexadienodienóis é bastante promissora. Estes compostos são em geral, instáveis, mas a metodologia aplicada não demanda condições mais enérgicas de reação, evitando assim a sua decomposição.

Posteriormente, outros substratos de interesse poderão ser epoxidados com a mesma metodologia, (**Figura 82**).



**Figura 82.** Potenciais derivados de cicloexadienodienóis para serem usados em reações de epoxidação.

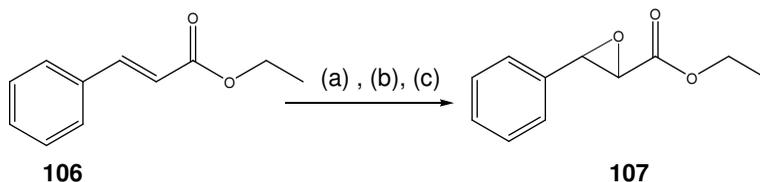
#### 4.7. EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DO (E)-CINAMATO DE ETILA

A epoxidação de substratos  $\square\square\square$  insaturados têm sido amplamente explorada pelo fato da baixa reatividade da ligação dupla C=C frente à reagentes oxidantes eletrofilicos.<sup>101</sup>

Em estudos iniciais com este substrato, utilizou-se metodologia químio-enzimática na tentativa de epoxidar o cinamato de etila (**106**) (**Figura 83**).

Os estudos demonstraram que não houve formação de **107** com a metodologia tradicional mesmo com a variação de diversos parâmetros, já usados em estudos anteriores.

Como se trata de um substrato com uma ligação dupla deficiente de elétrons, optou-se por fazer a reação em meio nucleofílico. As reações foram feitas em sistema bifásico com tampão fosfato de potássio pH 9,0 e tolueno e bicarbonato de sódio sólido. Como biocatalisadores foram utilizados a CALB, LPS e LRO.



**Figura 83.** Epoxidação nucleofílica químio-enzimática do cinamato de etila **106**. [(a) **106** (1 mmol), CALB, LPS ou LRO (150 mg), PHA ou UPH (5 mmol), sistema bifásico (15 mL), ác. octanóico (1 mmol). Condições reacionais descritas na **Tabela 18**.

Em uma primeira etapa as reações foram realizadas com dois sistemas bifásicos de água/solvente orgânico e tampão fosfato de potássio pH=9,0 (1M)/solvente orgânico e na presença de  $\text{NaHCO}_3$ .

Os resultados obtidos para a epoxidação do cinamato de etila em diferentes condições experimentais estão apresentados na **Tabela 18**.

**Tabela 18.** Epoxidação do cinamato de etila em diferentes condições experimentais.<sup>(a)</sup>

Lipase	Conversão (%) <sup>(b)</sup>			
	Sistema bifásico			
	água/tolueno		tampão fosfato pH=9,0(1M)/tolueno <sup>(c)</sup>	
	UPH	PHA	UPH	PHA
LPS	n.d. <sup>(d)</sup>	n.d. <sup>(d)</sup>	n.d. <sup>(d)</sup>	n.d. <sup>(d)</sup>
LRO	n.d. <sup>(d)</sup>	n.d. <sup>(d)</sup>	n.d. <sup>(d)</sup>	n.d. <sup>(d)</sup>
CALB	n.d. <sup>(d)</sup>	n.d. <sup>(d)</sup>	n.d. <sup>(d)</sup>	21

(a) reações realizadas com 1mmol de cinamato de etila, 10 mmol de ácido octanoico, 5 mmol de doador peróxido (UPH ou PHA), 150 mg de lipase, sistema bifásico água/tolueno (15 mL 50 %) à 30 °C por 96 h. (b) determinada por RMN-<sup>1</sup>H. (c) adição de 300 mg de NaHCO<sub>3</sub>. (d) n.d. - produto não detectado.

Através da análise dos dados da **Tabela 18**, observa-se que utilizando o sistema bifásico água/tolueno não houve a formação do produto **107**. Isto provavelmente se deve a baixa reatividade da ligação dupla de alcenos  $\alpha$ - $\beta$  insaturados para esta reação conforme já discutido.

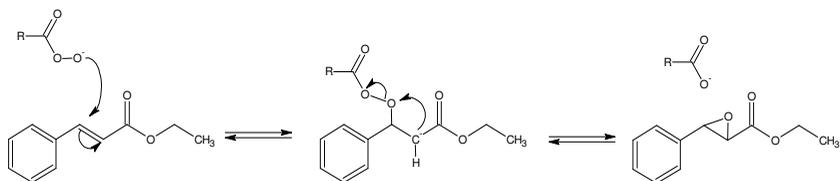
Em geral, a epoxidação de olefinas ricas em elétrons é eficiente e o processo é bastante conhecido envolvendo o mecanismo concertado de adição eletrofílica do oxigênio do perácido à ligação dupla carbono-carbono.<sup>100, 101</sup>

Baseando-se nos trabalhos de Garcia Ruano *et al.*,<sup>101</sup> no que se refere a importância do meio alcalino nestas reações, foi utilizado o sistema bifásico formado por tampão fosfato de potássio pH=9,0 e tolueno na presença de NaHCO<sub>3</sub>. Com a utilização destas condições, a conversão em epóxido foi de 21% com a CALB e PHA. Este valor foi determinado por RMN-<sup>1</sup>H conforme descrito na Seção 3.3.7. p. 57-59.

Em todas as condições experimentais testadas e utilizando o UPH, não foi detectado a formação do produto. Utilizando a LPS e LRO, o resultado obtido foi o mesmo ou seja não foi detectada a formação do produto.

Uma explicação para a obtenção do epóxido utilizando somente a CALB está pelo fato desta enzima estar imobilizada, sendo portanto mais resistente à exposição direta e prolongada ao pH mais alcalino (pH 9,0), enquanto que as lipases LPS e LRO foram empregadas na forma livre.

A função do tampão fosfato de potássio e do NaHCO<sub>3</sub> é favorecer, após a formação do perácido pela enzima, a desprotonação do mesmo gerando um íon RCOO<sup>-</sup> que se adiciona ao carbono da ligação dupla resultando na formação de um carbânion, que ataca o oxigênio, ciclizando e formando um anel oxirano. (**Esquema 8**)



**Esquema 8.** Mecanismo de epoxidação nucleofílica.

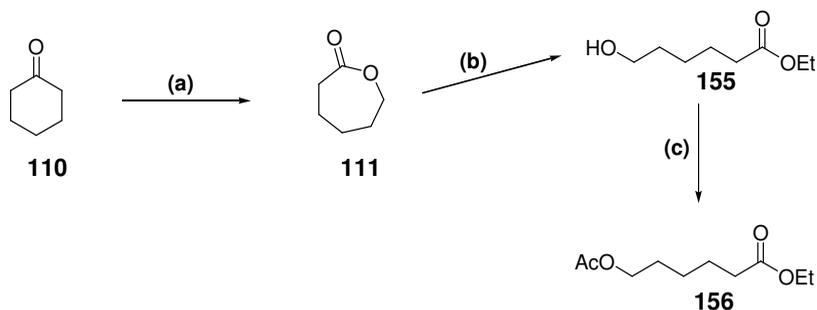
Geller *et al.* recentemente demonstraram de maneira bastante eficiente o uso de sistemas  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaOH}$  em poli(L-leucina) na epoxidação de cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas obtendo conversões de 59% em 1,5 h com *ee* de 91%. Neste estudo, a poli(L-leucina) atuou como uma “enzima artificial”, pois induziu a enantiosseletividade do processo (epoxidação de Juliá-Colonna).<sup>152</sup>

Apesar das conversões em óxido derivado do cinamato de etila terem sido baixas, outros estudos serão realizados com o intuito de aperfeiçoar as melhores condições reacionais, como por exemplo o controle de temperatura, proporção de tampão e o pH da reação, visando obter o produto em maiores conversões.

#### 4.8. OXIDAÇÃO DE BAEYER-VILLIGER UTILIZANDO A CALB

Além da formação de epóxidos, os perácidos gerados pelo método enzimático podem ser utilizados em oxidações de Bayer-Villiger, isto é, na formação de ésteres ou lactonas, a partir das respectivas cetonas.<sup>93</sup>

Nestes estudos utilizou-se a cicloexanona (**110**) para a obtenção preferencial de  $\epsilon$ -caprolactonas (**111**). (**Esquema 9**)



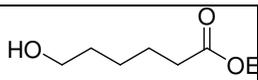
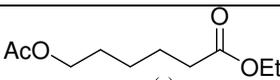
**Esquema 9.** Oxidação da cicloexanona (**110**) sob diferentes metodologias conforme já descritas na Seção 3.3.9. [(a) condições experimentais descritas na Tabela 19. (b) CALB, EtOH, (c) CALB, EtOAc]

As reações foram feitas sob dez condições experimentais diferentes. Em quatro destas metodologias empregou-se a CALB como catalisador.

Procurou-se avaliar nestes estudos a formação preferencial do composto **111**, e também a possível obtenção de subprodutos. As porcentagens de conversões obtidas (%) usando diferentes metodologias estão demonstradas na **Tabela 19**.

Os produtos obtidos foram quantificados e identificados por cromatografia gasosa acoplado em um espectrômetro de massas e comparados com dados já publicados na literatura.<sup>124</sup>

**Tabela 19.** Oxidação de Baeyer-Villiger da cicloexanona em diferentes metodologias.<sup>(a)</sup>

Entrada	Conversão (%) <sup>(b)</sup>		
	 <b>111</b>	 <b>155<sup>(c)</sup></b>	 <b>156<sup>(c)</sup></b>
1	-	-	-
2	-	-	-
3	30(35) <sup>(d)</sup>	-	-
4	60	-	-
5	45	-	-
6	90	-	-
7	38	-	-
8	42	4(8) <sup>(d)</sup>	-
9	56	10(19)	6(22)
10	68(42)	10(29)	5(21)

(a) 1- UPH, 60 °C, 24 h, 2- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(30 %), 60 °C, 24 h, 3- UPH, (AlCl<sub>3</sub>), 60 °C, 24 h, 4- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%), AlCl<sub>3</sub>, 60 °C, 24 h, 5- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %), alumina, 24 h, 6- m-CPBA, KHCO<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, refluxo, 12 h, 7- CALB, ACN, ac. octanóico, UPH, 48 h, 8- CALB, ACN, ac. octanóico, PHA, 48 h, 9- CALB, acetato de etila, UPH (30 %), 48 h, 10-CALB, acetato de etila PHA (30%), 48 h. (b) determinado por CG. (c) produtos confirmados por CG-EM. (d)48 h de reação.

Observa-se de forma geral, que as reações com a CALB (entradas 7-10), foram mais eficientes quando comparados com a maioria dos processos não enzimáticos (entradas 1-5).

A metodologia que emprega o *m*-CPBA (entrada 6) como oxidante foi bastante eficiente formando o **111**, com conversões de 90%, mas com sistema de refluxo por 12 h.

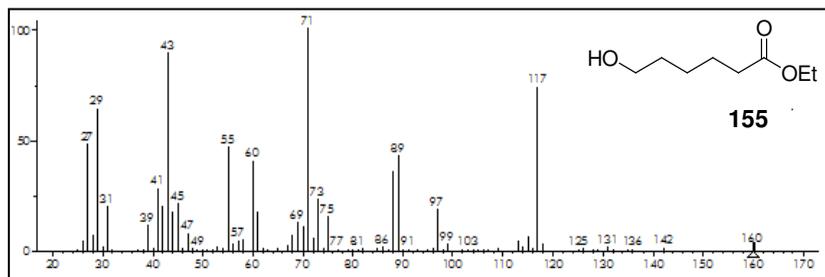
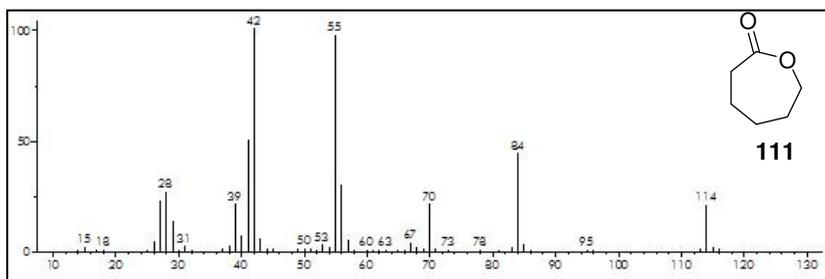
Com relação às metodologias enzimáticas, pode-se observar que com o uso de UPH e PHA e ácido octanóico, as conversões em **111** foram de 38 e 42% respectivamente, à temperatura ambiente.

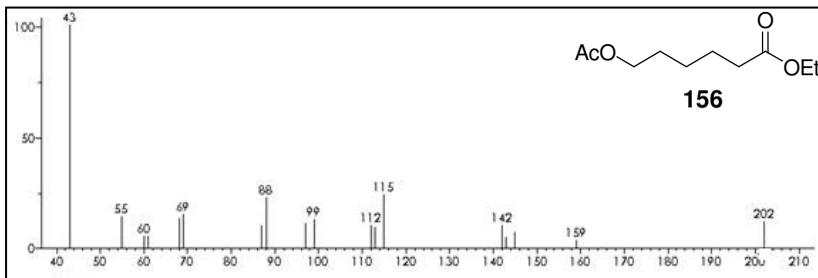
Porém, utilizando o acetato de etila como doador acila, as conversões em **111** foram de 56 e 68%, ao utilizar o UPH e PHA, respectivamente e foi também observada a formação de outros produtos tais como o **155** proveniente da hidrólise e esterificação do **111** e o **156** resultado da acetilação do **155** pela CALB. (Esquema 9).

A formação de outros produtos é ainda maior quando se utiliza o PHA, obtendo-se 50 % total de formação de **155** e **156**.

Os compostos foram identificados através de CG-EM, e comparados com padrões disponíveis na literatura.

Na **Figura 84** estão demonstrados os espectros de massas dos compostos **111**, **155**, e **156** obtidos usando as condições experimentais descritas na **Tabela 20**, entrada 10.





**Figura 84.** Espectros de massas dos compostos obtidos a partir da reação de oxidação de Baeyer-Villiger químico-enzimática da ciclohexanona (**110**). [CALB, ACN, acetato de etila PHA (30%), 48h.]

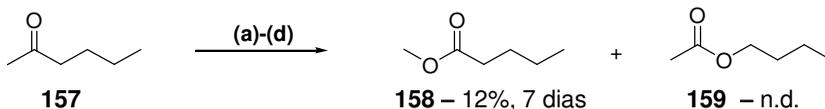
Analisando os espectros de massas, observam-se os picos dos íons moleculares ( $m/z^+$ ) dos compostos **111**, **155** e **156** sendo de 114, 160 e 202, respectivamente.

Os resultados apresentados na **Tabela 21** mostram que as conversões em  $\epsilon$ -caprolactonas, de certa forma, foram mais eficientes pelo método químico-enzimático. Estas reações foram feitas sob condições mais brandas, e na ausência de oxidantes fortes ou ácidos de Lewis, como o *m*-CPBA ou  $AlCl_3$  e sem o uso de altas temperaturas ou sistemas de refluxo.

Outro dado interessante é que a escolha adequada do doador acila ou peróxido pode minimizar a formação de produtos de hidrólise, como por exemplo, as usadas nas entradas 7 e 8.

O acetato de etila sofreu peridrólise para a formação do ácido peracético e etanol com subproduto. O etanol formado atuou como nucleófilo promovendo a abertura do anel da lactona, gerando o composto **155**.

Com o objetivo de expandir estes estudos com outras cetonas, utilizou-se a 2-hexanona (**157**) para investigar a formação preferencial do éster **158** ou **159** (**Figura 85**). As reações foram realizadas utilizando UPH e PHA e acetato de etila e ácido octanóico como doadores acila.

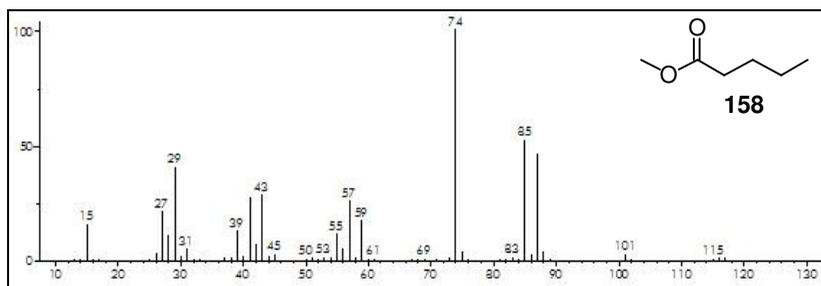


**Figura 85.** Oxidação químico-enzimática da 2-hexanona (**157**). [**157** (1 mmol), CALB (50 mg) (a) PHA (2 mmol), ácido octanóico (1 mmol), DCM (10 mL) n.d. (b) PHA (2 mmol), acetato de etila (10 mL), (c) PHA (2 mmol), ácido octanóico (1 mmol), DCM (10 mL) n.d. (d) PHA (2 mmol), acetato de etila (10 mL) - 12%, 7 dias.]

Neste caso, o método químico-enzimático não se mostrou eficiente, pois, foi detectada somente a formação do composto **158** com 12 % de conversão após sete dias de reação, utilizando o acetato de etila e PHA. Com a utilização de UPH não foi observado a formação de produtos no mesmo intervalo de tempo.

A identificação do composto **158** foi feita por análises de CG-EM, sendo observado o pico do íon molecular ( $m/z^+ = 116$ ) e o pico base ( $m/z^+ = 74$ ) que corresponde ao fragmento  $C_4H_{10}O^+$  (**Figura 86**).

Por análises de RMN- $^1H$ , pode-se identificar o composto através da presença de um singlete em 4,3 ppm referente ao grupamento metílico do éster. O espectro de RMN- $^1H$  obtido foi comparado com compostos similares publicados.<sup>153</sup>



**Figura 86.** Espectro de massas do produto **158** obtido na reação de oxidação de **157** pelo método químico-enzimático.

Utilizando o ácido octanóico, não foi detectada a formação do produto **159**, com ambos doadores peróxidos.

Bicalho *et al.* demonstraram o uso de microrganismos que expressam enzimas do tipo Baeyer-Villiger monooxigenases, e que estes podem ser usados na preparação de ésteres e/ou lactonas. Porém, ainda é difícil encontrar as condições reacionais adequadas para este tipo de reação, e deve-se considerar também o custo de produção do biocatalisador.<sup>154</sup>

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram, a grande aplicação da oxidação químico-enzimática para diferentes substratos. A otimização dos processos pode formar inúmeros compostos de interesse e conseqüentemente contribuir de forma positiva na síntese orgânica moderna, onde se prioriza menores custos de produção e condições mais suaves de reação indo de encontro a “Química Verde”.

## 5. CONCLUSÕES FINAIS

A partir dos resultados experimentais obtidos no presente trabalho as seguintes conclusões podem ser descritas:

### **Preparação de perácidos *via* enzimática:**

- As maiores conversões em perácidos pelo método enzimático foram obtidas ao utilizar ácidos carboxílicos com cadeias alquílicas maiores que seis carbonos. A CALB foi o biocatalisador mais eficiente.
- Os dados das análises dos perácidos por titulação iodométrica e eletroforese capilar de zona foram concordantes e mostraram a mesma tendência quanto aos melhores doadores acila.

### **Formação químio-enzimática de oxaziridinas:**

- Foi preparada uma série de oxaziridinas derivadas de N-benzilidenalquilaminas com conversões de 35-99%. A agitação orbital foi a mais eficiente.
- Ao utilizar UPH, obtiveram-se maiores conversões e somente <5% de produtos de hidrólise. Com o uso de PHA verificou-se a formação de 40% de benzaldeído, a partir de 5h.
- A conversão em (*E,Z*)-2-etilhexil-3-feniloxaziridinas foi dependente do solvente orgânico, e o melhor resultado foi obtido em acetonitrila e CALB (91%).
- As conversões em (*E,Z*)-2-etilhexil-3-feniloxaziridinas foram maiores quando utilizou-se ácidos carboxílicos com cadeias maiores que seis carbonos (67-90%), em 3 h.
- Com o uso de acetonitrila ou diclorometano com [BMIm][PF<sub>6</sub>] 10 % v/v, as conversões foram maiores com as lipases LPS e CALB.
- As conversões foram de ~90% com os LIs [BMIm][PF<sub>6</sub>], [BMIm][BF<sub>4</sub>], e [BMIm][Cl], e <5% com o [BMIm][SCN] em éter etílico, em 12h.
- A utilização de LIs em *n*-hexano não foi eficiente na formação de oxaziridinas e os valores de conversão foram menores com relação ao solvente puro.

- Usando LIs em etanol, observou-se aumento na seletividade de formação das oxaziridinas **118** e **119**, sendo 100% do isômero *E*.
- A seletividade das oxaziridinas formadas foi dependente do tamanho do grupo ligado ao nitrogênio. Grupos mais volumosos formaram preferencialmente o isômero *E*. Na oxidação da *N*-benziliden-*terc*-butilamina obteve-se 100% do isômero *E* (conv. >99%, 3h).
- A conversão em oxaziridinas foi influenciada pela presença de grupos doadores de elétrons no anel benzênico. A maior, foi obtida com o 2,4,5-trimetóxi-*N*-benziliden-2-etilhexilamina (**90**) em 20 min (>99 %). A presença de grupos retiradores no anel aromático do benzaldeído desfavoreceu a formação das oxaziridinas (28-50%).
- Os parâmetros cinéticos de  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  obtidos foram de  $66,22 \text{ kmol.m}^{-3}.\text{min}^{-1}.\text{kg-cat}^{-1}$  e  $4966,88 \text{ kmol.m}^{-3}.\text{kg-cat}^{-1}$ , respectivamente.

### Formação químio-enzimática de epóxidos:

- A epoxidação pelo método químio-enzimático dependeu diretamente da densidade eletrônica da ligação C=C. Em geral, a ligação dupla endocíclica foi mais facilmente epoxidada.
- Na epoxidação do  $\square$ -cariofileno e com o UPH, obteve-se somente o mono epóxido correspondente (83%), e com PHA o di-epóxido (79%) em 24 h.
- A epoxidação do cinamato de etila, ocorreu em tampão fosfato de potássio, tolueno e em  $\text{NaHCO}_3$ , obtendo-se 21% do produto em 96h, com a CALB e PHA.
- A epoxidação da (-)-carvona foi avaliada em função da LPS imobilizada em diferentes suportes poliméricos com UPH e PHA. As maiores conversões em óxido de carvona foram de 62, 59 e 57% em 24h, ao utilizar a LPS imobilizada em filmes de amidos de inhame, cará e em PVA, respectivamente.
- Com o uso de PHA, não foi detectada a formação do produto utilizando a LPS imobilizada nos diferentes suportes.
- A epoxidação de derivados de cicloexadienodienóis, com a CALB, foi eficiente obtendo os epóxidos **114** e **116** com rendimentos de 25% à 80% em 12 h, em função do doador acila.

### Oxidação de cetonas pelo método químio-enzimático:

- As metodologias enzimáticas mostraram-se mais eficientes quando comparadas às não-enzimáticas, com valores de conversão de 38-68% (24 h).
- Na oxidação da ciclohexanona **110** (24 h) com acetato de etila como doador acila, obteve-se outros produtos (**155** e **156**) que foram identificados por CG-EM.
- Na oxidação da 2-hexanona e utilizando o acetato de etila, CALB e PHA, obteve-se o pentanoato de metila (**158**) com 12% (7 dias).

Os resultados apresentados evidenciam a aplicabilidade da metodologia químio-enzimática utilizando lipases livres ou imobilizadas na epoxidação de diferentes substratos contendo as ligações C=N e C=C, e em condições suaves de reação.

As reações de oxidação químio-enzimática foram influenciadas pelos parâmetros tais como solvente, adição de LIs, doadores acila e peróxidos e procedência e forma de emprego das lipases.

As reações biocatalisadas podem ser de grande utilidade e aplicação em síntese orgânica.



## 6. PERSPECTIVAS

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

- Realizar um estudo mais aprofundado no que se refere à epoxidação químio-enzimática de compostos  $\alpha,\beta$ -insaturados, por exemplo, derivados de chalconas.
- Avaliar a epoxidação químio-enzimática com outros substratos, utilizando para isso, lipases de diferentes fontes, outros agentes oxidantes e doadores peróxidos.
- Utilizar sulfoniliminas para a obtenção das correspondentes sulfonil oxaziridinas.
- Estudar reações de Baeyer-Villiger com substratos quirais para a verificação de enantiosseletividade do processo, utilizando para isso, ácidos com grupos volumosos que atuem como indutores quirais.
- Estudar outras reações de oxidação utilizando perácidos, na oxidação de sulfetos à sulfóxidos.
- Avaliar de forma mais sistemática e detalhada outros parâmetros cinéticos que influenciam a formação químio-enzimática de oxaziridinas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. (a) Van Arnum, S. D.; *J. Chem. Educ.*, 82, 11, 1689-1692, **2005**.
2. (a) Brady, D, Jordaan, J., *Biotechnol. Lett.*, 31, 11, 1639-1650, **2009**.  
(b) Bussamara, R; Fuentefria, A. M.; de Oliveira, de Oliveira E. S., Broetto, L., Simcikova, M., Valente, P., Schrank, A., Vainstein, M. H.; *Bioresour. Technol.*, 101, 1, 268-275, **2010**.
3. (a) 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**. (b) Andrade, L. H.; Piovan, L.; Pasquini, M. D., *Tetrahedron Asymm.*, 20, 13, 1521-1525, **2009**.
4. Meunier, S. M.; Legge, R. L., *J. Mol. Catal., Enzym.*, 62, 1, 54-58, **2010**.
5. Chakroun, H.; Sayadi, S.; Mechichi, T., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 84, 10, 1527-1532, **2009**.
6. Grunwald P., *Biocatalysis: Biochemical Fundamentals and Applications, (University of Hamburg, Germany)*, 2009.
7. Schneider, R. D. S.; Lara, L. R. S.; Bitencourt, T. B., Nascimento, M. G., Nunes, M.; *J. Braz. Chem. Soc.*, 20, 8, 1473-1477, **2009**.
8. (a) Faber, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, New York, 2000. (b) Cabral, J. M. S.; Aires-Barros, M. R.; Gama, M.; *Engenharia Enzimática*, LIDEL-Edições Técnicas, Ltda, 2003.
9. Nelson, D. L.; Cox, M. M.; Lehninger: *Principles of Biochemistry*, 3<sup>rd</sup> Ed. USA, Saunders Publishing College, 2000.
10. <http://legacy.owensboro.kctcs.edu/gcaplan/anat/Notes/Image522.gif> acessado em janeiro de 2010.
11. Murray, R. K.; Granner, D. K; Harper, *Bioquímica*, Atheneus SP, 6<sup>a</sup> Ed. Cap. 7. 1990.
12. Azad, M. A. K.; Bae, J.H.; Kim, J.S., *New Biotechnol.*, 26, 3-4, 143-149, **2009**.
13. Power, S. D.; Shaw, A.; *New thermostable chimeric alpha-amylase having specific amino acid sequence and having N- and C-terminals containing sequences from N- and C-terminals of AmyL amylase and AmyS amylase, respectively, useful for e.g. cleaning applications*  
Patente número: WO2009134670-A2, 2009, Canadá.
14. Gunda, S.; Malisetty, V. S.; Meshram, H. M., *Process for preparation of new thermostable protease enzyme from Clostridium species*. Patente Número: IN190989-B Assignee: COUNCIL SCI&IND RES INDIA, **2009**.

15. Santa-Maria, M. C.; Chou, C. J.; Yench, G. C., *Biotechnol. Bioeng.*, 104, 5, 947-956, **2009**.
16. Kosman, D. J., *J. Biol. Inorg. Chem.*, 15, 1, 15-28, **2010**.
17. Dierkers, A. T.; Niks, D.; Schlichting, I., *Biochem. J.*, 48, 46, 10997-11010, **2009**.
18. Caescu, C. I.; Jeschke, G. R.; Turk, B. E., *Biochem., J.*, 424, 79-88, **2009**.
19. Pavlova, M.; Klvana, M.; Prokop, Z., *Nat. Chem. Biol.*, 5, 10, 727-733, **2009**.
20. 66.99.255.20/cms/biochem/glucksman.html acessado em janeiro de 2010.
21. 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 janeiro de 2010.
22. Andrade, L.H.; Barcellos, T.; *Org., Lett.*, 11, 14, 3052-3055, **2009**.
23. Pesquisa feita no <http://apps.isiknowledge.com/> (Web of Science), utilizando a palavra-chave “enzymes”, no período de 1950-1985..
24. Witayakran, S.; Ragauskas, A.J., *Adv. Synth. Catal.*, 351, 9, 1187-1209, **2009**.
25. Wang, Z. Z.; Jiao, W.; He, G.Y.; *Monatshefte Fur Chemie*, 140, 1, 79-81, **2009**.
26. Donnez, D.; Jeandel, P.; Clement, C.; Courrot, E.; *Trends Biotechnol.*, 27, 12, 706-713, **2009**.
27. Hudlicky, T.; Reed, J. W., *Chem. Rev.*, 38, 11, 3117-3132, **2009**.
28. Park, Y.C.; Shaffer, C.E.H.; Bennett, G.N., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85, 1, 13-25, **2009**.
29. Pesquisa feita no <http://apps.isiknowledge.com/> (Web of Science), utilizando a palavra-chave “enzymes and reactions” no período de 1960-2009.
30. Faber, K.; Kroutil, W.; *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 9, (2): 181-187, **2005**.
31. Loughlin, W.; *Bioresour. Technol.* 74, 49-62, **2000**.
32. (a) The Enzyme Technical Association, disponível em [http://www.enzymetechnicalassoc.org/benefits\\_paper.pdf](http://www.enzymetechnicalassoc.org/benefits_paper.pdf), acessado em janeiro de 2010. (b) GENENCOR, disponível em <http://www.genencor.com>, acessado em janeiro de 2010.
33. Brady, D.; Jordaan, J.; *Biotechnol. Lett.*, 31, 11, 1639-1650, **2009**.
34. Puskas, J. E., Sen, M.Y., Mustafa, Y., Seo, K. S., *J. Pol. Sci. A: Pol. Chem.*, 47, 12, 2959-2976, **2009**.

- 35.(a) Bialkowska, A.M.; Cieslinski, H.; Nowakowska, K.M., *Arch. Microbiol.*, 191, 11, 825-835, **2009**. (b) Salameh, M.A.; Wiegel, J., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 10, 1281-1287, **2009**.
- 36.(a) Pieretti, G.; Nicolaus, B.; Poli, A., *Carbohydrate Research*, 344, 15, 2051-2055, **2009**. (b) Royter, M.; Schmidt, M.; Elend, C., *Extremophiles*, 13, 5, 769-783, **2009**.
37. Vilaseca, L. A.; Quillaguaman, J.; Fuentes, L.; *Planta Medica*, 75, 9, 1079-1080, **2009**.
38. Tawaki, S.; Klibanov, A. M.; *Biocat. Biotrans.*, 8, 1, 3-19, **1993**.
39. Sharma, N.; Kumar, R., *Org. Lett.*, 11, 21, 4846-4848, **2009**.
40. Cotteril, I. C.; Sutherland, A.G.; Roberts, S.M.; *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.*, 1, 6, 1365-1368, **1991**.
41. Zanotto, S. P.; Romano, I. P.; Lisboa, L. U. S., Duvoisin Jr, S.; Martins, M. K., Lima, F. A., Silva, S. F., Albuquerque, P. M., *J. Braz. Chem. Soc.*, 20, 6, 1046-1059, **2009**.
42. Campos, P. R. B.; Oliveira, B. F.; Noffs, M. D. A.; Carvalho, P. O.; *Lecta*, 20, 7, **2002**.
43. Carvalho, P.O.; Campos, P. R. B.; Noffs, M. D.; Oliveira, J. G.; Shimizu, M. T.; Silva, D. M.; *Quim. Nova*, 26, 75, **2003**.
44. Carvalho, P. O.; Pastore, G. M.; *Food Biotechnol.*, 12, 57-71, **1998**.
45. Vallin, K. S. A.; Posaric, D.W.; Hamersak, Z.; Svensson, M. A.; Minidis, A. B. E.; *J. Org. Chem.*, 74, 24, 9328-9336, **2009**.
46. Cherif, S.; Fendri, A.; Miled, N.; Trabelsi, H.; Mejdoub, H.; Gargouri, Y.; *Biochimie*, 89, 8, 1012-1018, **2007**.
47. Joseph, B.; Arntek, P. W.; Thomas, G.; *Biotechnol. Adv.*, 26, 5, 457-470, **2008**.
- 48.(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., Mitchell, D. A., Fontana, J. D.; *Biochem. Eng. J.*, 18 (1), 65-71, **2004**. (c) Silva, W. O. B., Mitidieri, S., Schrank, A., Vainstein, M. H.; *Process Biochem.*, 40, 1, 321-326, **2005**. (d) Carvalho, P. O.; Calafatti, M. M., Silva, D. M.; Contesini, F. J.; Bizaco, R.; *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 4, 614-621, **2005**.
- 49.(a) Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C., *Biotechnol. Adv.*, 19, 627-662, **2001**. (b) Haki, G. D., Rakshit, S.K., *Biores. Technol.*, 89, 17-34, **2003**.

50. (a) The Novozymes Latin America Ltda disponível em <http://www.novozymes.com.br>. (b) Amano Enzym Inc. disponível em <http://www.amano-enzyme.co.jp>.
51. Paques, F.W.; Macedo, G. A.; *Quím. Nova*, 29, 1, 93-99, **2006**.
52. <http://www.biotech.rwth-aachen.de/biokat/english/Hydrolases.htm>, acessada em janeiro de 2010.
53. 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**.
54. Pesquisa feita no Web of Science (<http://apps.isiknowledge.com/>), utilizando a palavra-chave “lipases” no período de 2000-2010.
55. Schoffers, E.; Kohler, L.; *Tetrahedron Asymm.*, 20, 16, 1897-1902, **2009**.
56. (a) Karabulut I.; Durmaz, G.; Hayaloglu, A. A.; *J. Agricult. Food Chem.*, 57, 21, 10466-10470, **2009**. (b) Robles-Medina, A.; Gonzalez-Moreno P.A.; Esteban-Cerdan, L.; Molina-Grima, E.; *Biotechnol. Adv.*, 27, 4, 398-408, **2009**.
57. Du, W.; Xu, Y.; Liu, D.; Zeng, J.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 30, 3-4, **2004**.
58. Quintana, P. G., Baldessari, A.; *Steroids*, 74, 13-14, 1007-1014, **2009**.
59. Acetti, D.; Brenna, E.; Fuganti, C.; Gatti, F.; Serra, S.; *Tetrahedron Lett.*, 50, 19, 2249-2251, 13, **2009**.
60. Vieira G. A. B.; Lemos, T. L. G.; Mattos, M. C.; de Oliveira, M.C.F.; Melo, V. M. M.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V.; *Tetrahedron Asymm.*, 20, 2, 214-219, **2009**.
61. Bjorkling, F., Frykman, H., Godtfredsen, S.E., *Tetrahedron*, 48, (22), 4587-4592, **1992**.
62. Bjorkling, F., Godtfredsen, S.E., Kirk, O., *Trends Biotechnol.*, 9, (10), 360-363. **1991**.
63. (a) Klaas, M. R.; Steffens, K.; Patett, N., J. A., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 19-20, 499-505, **2002**. (b) Klaas, M. R.; Warwel, S., *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 117, 311-319, **1997**.
64. Orellana-Coca, C.; Törnvall, U.; Adlercreutz, D.; Mattiasson B.; Hatti-Kaul, R.; *Biocat. Biotrans.* 23, 6, 431-437, **2005**.
65. Orellana-Coca, C.; Billakanti, J. M.; Mattiasson, B.; Hatti-Kaul, R.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 44, 133-137, **2007**.

66. Yang, R. L.; Li, N.; Li, R. F., *Bioresour. Technol.*, 101, 1, 1-5, **2010**.
67. Wu, Y.; Wang, Y. J.; Luo, G. S.; *Bioresour., Technol.*, 101, 3, 841-844, **2010**.
68. Lee, J. H. Kim, S.B.; Park, C.; *Bioresour. Technol.*, 101, S66-S70, **2010**.
69. Sulek, F.; Drogenik, M.; Habulin, M., *J. Magn. Magn. Mater.*, 322, 2, 179-185, **2010**.
70. (a) Lee, S.; Jin, L.H.; Kim, J.H.; Han, S.O.; Na, H.B.; Hyeon, T.; Koo, Y.M.; Kim, J.; Lee, J.H.; *Bioprocess. Biosys. Eng.*, 33, 1, 141-147, **2010**. (b) Pirozzi, D.; Fanelli, E.; Aronne, A.; Pernice, P.; Mingione, A.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 59, 1-3, 116-120, **2009**. (c) Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R.; *Enzym. Microb. Technol.*, 40, 1451-1463, **2007**.
71. Moreira, M. A., Bitencourt, T. B., Nascimento, M. G.; *Synth. Commun.*, 2107-2114, (5), **2005**.
72. [http://www.agen.ufl.edu/~chyn/age4660/lect/lect\\_21/FG12\\_017.GIF](http://www.agen.ufl.edu/~chyn/age4660/lect/lect_21/FG12_017.GIF) acessada em janeiro de 2010.
73. Rochefort, D., Kouisni, L., Gendron, K.; *J. Electroanal. Chem.* 617:53–63, **2008**.
74. Zhang, Y. F., Wu, H., Li, J., Li, L., Jiang, Y.J., Jiang Y., Jiang, Z.Y.; *Chem. Mater.*, 20, 1041–1048, **2008**.
75. Wang, Y., Xu, J.; Hu, Y.; Luo, G., Dai, Y.; *J. Mem. Sci.*, 281, 410–416, **2006**.
76. Biscarini, F.; Bagelova, J.; Timko, M.; Tomasovicova, N.; Valle, F.; Kopcansky, P.; Koneracka, M.; Bystrenova, E.; Bellova, A.; Gazonova, Z.; *Nanotechnology*, 21, 065, **2010**.
77. Pan, C.; Hu, B.; Li, W.; Sun, Y.; Ye, H.; Zeng, X.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 61, 3-4, 208-215, **2009**.
78. Netto, C. G. C. M.; Andrade, L. H.; Toma, H. E.; *Tetrahedron Asymm.*, 20, 19, 2299-2304, **2009**.
79. McIver, A. M.; Garikipati, S. V. B. J.; Bankole, K. S., Gyamerah, M.; Peeples, T. L.; *Biotechnol. Process*, 24, 3, 593-598, **2008**.
80. <http://ilthermo.boulder.nist.gov/> acessado em janeiro de 2010.
81. (a) Armand, M.; Endres, F.; MacFarlane, D.R.; Ohno, H.; Scrosati, B.; *Nature Mat.*, 8, 621-629, **2009**. (b) van Rantwijk, F., Sheldon, R. A., *Chem. Rev.*, 107, 6, 2757-2785, **2007**. (c) Kokorin, AI; Tran, V. A.; Vorobieva, G.A., *Appl. Magn., Reson.*, 37, 1-4, 473-481, **2010**. (d) Zhang, Z.H.; Zhao, Z.B.K., *Bioresour. Technol.*, 101, 3, 1111-1114, **2010**.

82. (a) Vafina, R. R.; Fazlyev, F.Z.; Galin, L.V.; Spirikhin, *Russian J. Org. Chem.*, 45, 4, 515–519, **2009**. (b) Fischer, A.; Sethi, T.; Woolf, J.; *Tetrahedron Lett.*, 40, 793-796, **1999**.
83. (a) Pilissão, C.; Carvalho, P. .O.; Nascimento, M. G.; *Process Biochem.*, 44, 12, 1352-1357, **2009**. (c) Banoth, L.; Singh, M.; Tekewe, A.; Banerjee, U.C.; *Biocat. Biotrans.*, 27, 4, 263-270, **2009**. (d) De Diego, T.; Lozano, P.; Abad, M.A.; Steffensky, K.; Vaultier, M.; Iborra, J.L.; *J. Biotechnol.*, 140, 3-4, 234-241, **2009**.
84. Pavlidis, I.V.; Gournis, D.; Papadopoulos, G.K.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 60, 1-2, 50-56, **2009**.
85. Oromí-Farrús, M.; Eras, J.; Sala, N.; Torres, M.; Canela, R.; *Molecules*, 14, 4275-4283; **2009**.
86. (a) Gervaise, C.; Daniellou, R.; Nugier-Chauvin, C.; Ferrières, V.; *Tetrahedron Lett.*, 50, 18, 2083-2085, **2009**. (b) Ghosh, D.; Wawrzak, Z.; Pletnev, V.Z.; Li, N.; Kaiser, R.; Pangborn, W.; Jörnvall, H.; Erman, M.; Duax, W.L.; *Structure*, 3, 279–288, **1995**.
87. (a) Jayakumar, K.A.V.; Srinivasan, T. G.; *Electrochimica Acta*, 52, 24, 7121-7127, **2007**. (b) Wu, B.; Reddy, R. G.; Rogers, R. D.; *International Solar Energy Conference*, 445–451., **2001**. (c) Lapkin, A.; Plucinski, P.K.; Cutler, M.; *J. Nat. Prod.*, **11**, 69, 1653–1664, 2006. (d) Fort, D.A.; Swatloski, R.P.; Moyna, P.; Rogers, R.D.; Moyna, G.; *Chem. Commun*, 714, **2006**. (e) Yadav, J. S.; Reddy, B. V. S.; Basak, A. K., Narsaiah, A. V., *Chem. Lett.*, 33, 3, 248, **2004**.
88. (a) 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. (b) Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; *Organic Chemistry*, 1<sup>st</sup> Ed. Oxford University Press, 2001.
89. García Mancheño, O.; Bistri, O.; Bolm, C.; *Org. Lett.*, 9, 3809-3811, **2007**.
90. Butler, J.D.; Donald, M.B; Ding, Z.S., *Tetrahedron Lett.*, 50, 36, 5110-5112, **2009**.
91. Coelho, F.; Porto, R. S.; Vasconcellos, M. L. A. A.; Ventura, E.; *Synthesis-Stuttgart*, 14, 2297-2306, **2005**.
92. Hamdani, M.; Scholler, D.; Bouquant J.; Feigenbaum, A., *Tetrahedron*, 52, 2, 605-616, **1996**.
93. (a) Rios, M. Y.; Salazar, E.; Olivo, H.F., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 54, 3-4, 61-66, **2008**. (b) Rios, M. Y.; Salazar, E.; Olivo, H. F., *Green Chem.*, 9, 5, 459-462, **2007**.
94. Treiber, A.; *J. Org. Chem.* 67, 7261-7266, **2002**.
95. Murahashi, S.; Oda, Y.; Komiya, N.; Naota, T.; *Tetrahedron Lett.* 35, 43, 7953-7956, **1994**.

96. Sarma, K.; Bhati, N.; Borthakur, N.; Goswami, A., *Tetrahedron*, 63, 8735-8741, **2007**.
97. Solomons, T. W., Graham, L., Whei, O.; Química Orgânica /T. W. Graham Solomons, 7. Ed: LTC, Rio de Janeiro, **2002**.
98. 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**.
99. Rebsdatt, S.; Mayer D.; "Ethylene Oxide" in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
100. Porter, M. J.; Skidmore, J.; *Chem. Comm.*, 1215, **2000**.
101. García Ruano, J. L.; Fajardo, C.; Fraile, A.; Martín, M. R.; *J. Org. Chem.*, 70, 4300-4306, **2005**.
102. Urlacher, V. B.; Schmid, R.D.; *Curr. Opin. Biol.*, 10, 156-161, **2006**.
103. Marsaioli, A. J.; Pinheiro, L.; de Oliveira, L. G.; *J. Mol. Catal. B:Enzym.*, 60, 3-4, 133-137, **2009**.
104. Donald, J. R.; Edwards, M. G.; Taylor, R. J. K.; *Tetrahedron Lett.*, 48 (30), 5201-5204, **2007**.
105. Wang, X. B.; Doridot, G.; Joullie, M. M.; *Org. Lett.*, 9, 6, 977-980, **2007**.
106. Emmons, W. D.; *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 608, **1956**.
107. Patai, S., The Chemistry of the Carbon-Nitrogen Double Bond, J. Wiley, **1970**.
108. (a) Evans, D. A.; Morrissey, M. M.; Dorow, R. L. *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 4346, **1985**. (b) Davis, F. A.; Sheppard, A. C.; Chen, B. C.; Haque, M. S., *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 6679, **1990**.
109. (a) Arnone, A.; Foletto, S.; Metrangolo, P.; Pregnotato, M.; Resnati, G. *Org. Lett.*, 1, 281, **1999**. (b) Choong, I. C.; Ellman, J. A., *J. Org. Chem.*, 64, 6528, **1999**.
110. Fontecave, M.; Schoumacker, S.; Hamelin, O.; Téli, S.; Pécaut, J.; *J. Org. Chem.*, 70, 301, **2005**.
111. (a) Troisi, L.; De Lorenzis, S.; Fabio, M.; Rosato, F.; Granito, C.; *Tetrahedron Assym.*, 19, 2246-2251, **2008**. (b) Rescifina, A.; Chiacchio, M.A.; Corsaro, A.; Clercq, E.; Iannazzo, D.; Mastino, A.; Piperno, A.; Romeo, G.; Romeo, R.; Valveri V.; *J. Med. Chem.*, 49, (2), 709-715, **2006**.
112. (a) Andreae, S.; Schmitz, E., *Synthesis*, 327-341, **1991**. (b) Davis, F. A.; Towson, J. C.; Weismiller, M. C.; Lal, S.; Carroll, P. J., *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 8477-8482, **1988**. (c) Widmer, J.; Schierlein, W. K., *Helv. Chim. Acta*, 57, 657-664, **1974**.

113. Kraiem, J.; Othman, R.B.; Hassine, B.B.; *C. R. Chimie*, 7 (10-11), 1119-1126, **2004**.
114. Mohajer, D.; Iranpoor, N.; Rezaeifard, A.; *Tetrahedron Lett.*, 45, 3, 631-634, **2004**.
115. Sebrão, D.; Silva, V. D., Nascimento, M. G., Moreira, M. A., *Quim. Nova*, 30, No. 5, 1182-1187, **2007**.
116. Albuquerque, P. M.; “Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* na redução de substratos carbonílicos”, Tese de Doutorado, Departamento de Química – UFSC, **2007**.
117. (a) The US Peroxide disponível em <http://www.h2o2.com/technical-library/analytical-methods/default.aspx?pid=68&name=Permanganate-Titration>, acessado em janeiro de 2010. (b) Pinkernell, U.; Karst. U.; Cammann, K.; *Anal. Chem.* 66, 2599-2602, **1994**.
118. (a) Vogel, A. I., Química Orgânica, vol. 2, 3ª Edição, 1975. (b) Vishwakarma, L. C.; Stringer, O. D.; Davis, F. A.; *Org. Synth.*, 66 201, **1987**.  
Broshears, W. C.; Esteb, J.J.; Richter, J.; *J. Chem. Educ.*, 81, (7), 1018-1019, **2004**. (c) Dikumar, E. A.; Potkin, V. I.; Kozlov, N. G.; Yuvchenko, A. P.; *Russian J. Gen. Chem.*, 76, 9, 1425-1430, **2006**.
119. Cliffe, I. A.; *Synthesis*, (12), 1138-1140, **1985**.
120. Guimond, N.; *J. Am. Chem. Soc.*, 131(34), 12050-12051, **2009**.
121. (a) Uguina, M. A.; Delgado, J. A.; Carretero, J.; *Ind. Eng. Chem. Res.*, 48, (23), 10217-10221, **2009**. (b) Uguina, M. A.; Delgado, J. A.; Rodriguez, A.; Carretero, J.; Gomez-Diaz, D., *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 1-2, 18, 208-215, **2006**.
122. Feske, B. D.; Kaluzna, I. A.; Stewart, J.D., *J. Org. Chem.*, 70(23), 9654-9657, **2005**.
123. (a) Kon, Y.; Ono, Yutaka; M.; Tomohiro; S. K.; *Synlett*, (7), 1095-1098, **2009**. (b) Awaad, A. S.; *Egypt. J. Biomed. Sci.*, 15, 42-58, **2004**. (c) AIST: Integrated Spectral Database System of Organic Compounds disponível em <http://www.aist.go.jp>. (d) Skoeld, M.; *Food Chem. Toxic.*, 44(4), 538-545, **2006**.
124. (a) Demir, A. S.; Aybey, A., *Tetrahedron*, 64, 11256–11261, **2008**. (b) Lei, Z.; Ma, G.; Wei, L.; Yang, Q.; Su, B.; *Catal. Lett.*, 124, 330–333, **2008**. (c) Peris. G., Miller, S. J., *Org. Lett.*, 10, 14, 3049-3052, **2008**.
125. (a) Vitelio, C.; Brovotto, M., Bellomo, A.; Seoane, G.; Gonzelez, D.; *Carbohydrate Res.*, 339, 1773-1778, **2004**. (b) Boyd, D. R.; Sharma, N. D.; Llamas, N. M.; Coen, G. P.; McGeehin, P. K. M.; Allen, C. C. R., *Org. Biomol. Chem.*, 5(3), 514-522, **2007**.

- 126.** (a) Jain, S. L.; Singhal, S.; Sain, B.; *J. Org. Chem.*, 692, 2930–2935, **2007**. (b) Jennings, W. B., Boyd, D. R., Watson, C.G.; Becker, E. D.; Bradley, R. B.; Jerina, D.M.; *J. Am. Chem. Soc.*, 94 (24), 8501-8504, **1972**.
- 127.** Moreira, M. A., Utilização de Lipases em Reações de Epoxidação Químio-Enzimática, Dissertação de Mestrado, **2003**, UFSC.
- 128.** Moreira, M. A., Produção Enzimática de Peróxi-Ácidos e Sua Utilização na Epoxidação de Terpenos, Tese de Doutorado, **2008**, UFSC.
- 129.** Skouridou, V.; Stamatis, H.; Kolisis, F. N.; *Biocatal. Biotransform.*, 21, (6), 285-290, **2003**.
- 130.** Moreira, M. A.; Nascimento, M. G.; *Catal. Commun.*, 8, 2049–2053, **2007**.
- 131.** Yadav, G. D.; Devi, K. M.; *Biochem. Eng. J.*, 10, 93–101, **2002**.
- 132.** Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 6. Ed. Rio de Janeiro: LTC, 460, **2000**.
- 133.** Ankudey, E.G.; Olivio, H. F.; Peeples, T. L.; *Green Chem.*, 8, 923-926, **2006**.
- 134.** Bitencourt, T.B.; “Formação de Epóxidos e Oxaziridinas via Químio-Enzimática”, Dissertação de Mestrado, Departamento de Química – UFSC, **2006**.
- 135.** Guvenç, A.; Kapucu, N.; Mehtmetoglu, U., *Process Biochem.*, 38, 379-386, **2002**.
- 136.** Costa, V. E. U.; Amorim, H. L. N.; *Quím. Nova*, 22, 6, **1999**.
- 137.** Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C., *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 81-87, **1987**.
- 138.** Zhao, H.; Campbell, S.M.; Jackson, L.; Song, Z.; Olubajo, O.; *Tetrahedron Asymm.*, **2006**, 17, 377-383.
- 139.** Zhao, H.; Campbell, S.; Solomon, J.; Song, Z.; Olubajo, O.; *Chin. J. Chem.*, 580-584, **2006**.
- 140.** Yang, Z.; Yue, Y.; Huang, W.; Zhuang, X.; Chen Z.; Xing, M.; *J. Biochem.*, 145(3):355-364, **2009**.
- 141.** Zhang, Y.; Cremer, P.S.; *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 10 (6): 658–63, **2006**.
- 142.** Chiappe, C.; Leandri, E.; Hammock, B. D.; Morisseau, C.; *Green Chem.*, 9, 162–168, **2007**.
- 143.** Chen, J.; Wu, H.; Jin, C.; Zhang, X.; Xie. Y.; SuGreen, W.; *Green Chem.*, 8, 330–332, **2006**.
- 144.** Boyd, D. R.; Neil, D. C.; Watson, C. G.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1813-1818, **1975**.

145. Madan, V.; Clapp, L. B.; *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 6078, **1969**.
146. Ogata, Y.; Sawaki, Y.; *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 4687, **1973**.
147. Davis, F. A.; Chen, B. C., *Chem. Rev.*, 92, 919, **1992**.
148. Yadav, G. D.; Borkar, I. V.; *Am. Ins. Chem. Eng.*, 52, 3, 1235-1247, **2006**.
149. Fernandes, V.C.F.; Contesini, F. J.; Carvalho, P. O.; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 949-954, **2009**.
150. Freitas, L.; Perez, V. H.; Santos, J.C., Castro, H.F., *J. Braz. Chem. Soc.*, 18, 7, 1360-1366, **2007**.
151. Lee, Y.; Roh, J.; Kim, H., *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 11, 1146-1152, **2008**.
152. Geller, T.; Gerlach, A.; Krüger, C. M.; Militzer, H. C.; *Tetrahedron Lett.*, 45, 26, 5065-5067, **2004**.
153. (a) Yeung, Dominic W. K.; *Can J. Chem.*, 58, 22, 2386-93, **1980**. (b) AIST: Integrated Spectral Database System of Organic Compounds em <http://www.aist.go.jp> acessado em janeiro de 2010.
154. Bicalho, B., Chen, L. S.; Grognum, J.; Reymond, J. Marsaioli, A. J.; *J. Braz. Chem. Soc.*, 15, 6, 911-916, **2004**.

**ANEXO A – RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C E IV DOS COMPOSTOS 118-133**

**(E)-2-etilhexil-3-fenil oxaziridina (118)**

RMN-  $^1\text{H}$  - E-1

RMN-  $^{13}\text{C}$  - E-2

IV- E-3

**(Z)-2-etilhexil-3-fenil oxaziridina (119)**

RMN-  $^1\text{H}$  - E-4

RMN-  $^{13}\text{C}$  - E-5

IV- E-6

**(E)-2-etilhexil-3-4-hidroxi fenil oxaziridina (120):**

RMN-  $^1\text{H}$  - E-7

RMN-  $^{13}\text{C}$  - E-8

IV- E-9

**(Z)-2-etilhexil-3-4-hidroxi fenil oxaziridina (121):**

RMN-  $^1\text{H}$  - E-10

RMN-  $^{13}\text{C}$  - E-11

IV- E-12

**(E)-2-etilhexil-3-4-metil fenil oxaziridina (122):**

RMN-  $^1\text{H}$  - E-13

RMN-  $^{13}\text{C}$  - E-14

IV- E-15

**(Z)-2-etilhexil-3-4-metil fenil oxaziridina (123):**

RMN-  $^1\text{H}$  - E-16

RMN-  $^{13}\text{C}$  - E-17

IV- E-18

**(E)- 2-etilhexil-3-4-metóxi fenil oxaziridina (124):**

RMN-  $^1\text{H}$  - E-19

RMN-  $^{13}\text{C}$  - E-20

IV- E-21

**(Z)-2-etilhexil-3-4-metóxi fenil oxaziridina (125):**

RMN-  $^1\text{H}$  - E-22

RMN-  $^{13}\text{C}$  - E-23

IV- E-24

**(E)- 2-etilhexil-3-4-N.N-dimetil fenil oxaziridina (126):**

RMN-  $^1\text{H}$  - E-25

RMN-  $^{13}\text{C}$ - E-26

IV- E-27

**(Z)- 2-etilhexil-3-4-N.N-dimetil fenil oxaziridina (127):**

RMN-  $^1\text{H}$  - E-28

RMN-  $^{13}\text{C}$ - E-29

IV- E-30

**(E)- 2-etilhexil-3-2,4,5-trimetóxi fenil oxaziridina (128):**

RMN-  $^1\text{H}$  - E-31

RMN-  $^{13}\text{C}$ - E-32

IV- E-33

**(Z)- 2-etilhexil-3-2,4,5-trimetóxi fenil oxaziridina (129):**

RMN-  $^1\text{H}$  - E-34

RMN-  $^{13}\text{C}$ - E-35

IV- E-36

**(E)- 2-etilhexil-3-4-flúor fenil oxaziridina (130):**

RMN-  $^1\text{H}$  - E-37

RMN-  $^{13}\text{C}$ - E-38

IV- E-39

**(Z)-2-etilhexil-3-4-flúor fenil oxaziridina (131):**

RMN-  $^1\text{H}$  - E-40

RMN-  $^{13}\text{C}$ - E-41

IV- E-42

**(E)- 2-etilhexil-3-2,4-dicloro fenil oxaziridina (132):**

RMN-  $^1\text{H}$  - E-43

RMN-  $^{13}\text{C}$ - E-44

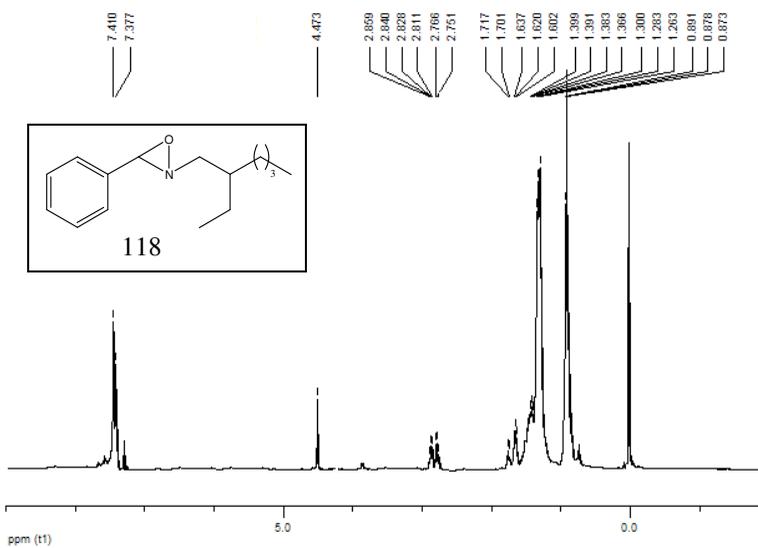
IV- E-45

**(Z)- 2-etilhexil-3-2,4-dicloro fenil oxaziridina (133):**

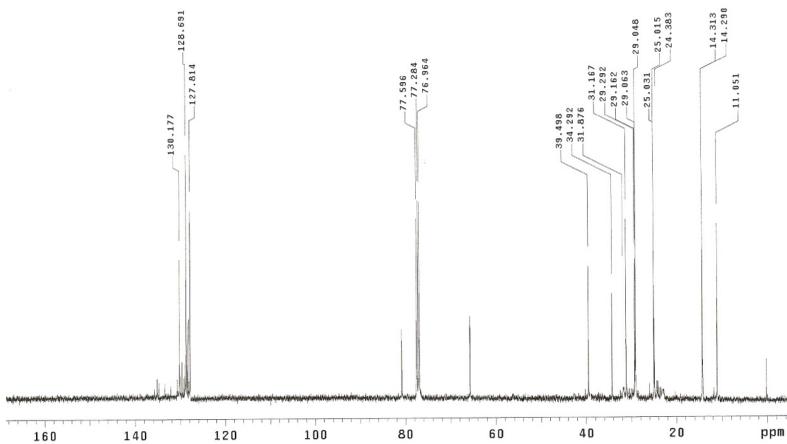
RMN-  $^1\text{H}$  - E-46

RMN-  $^{13}\text{C}$ - E-47

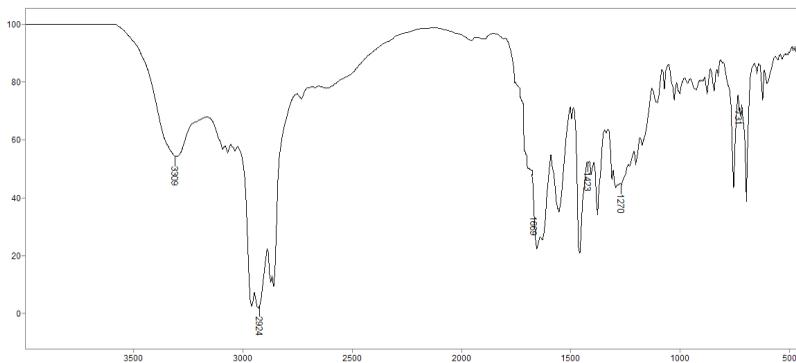
IV- E-48



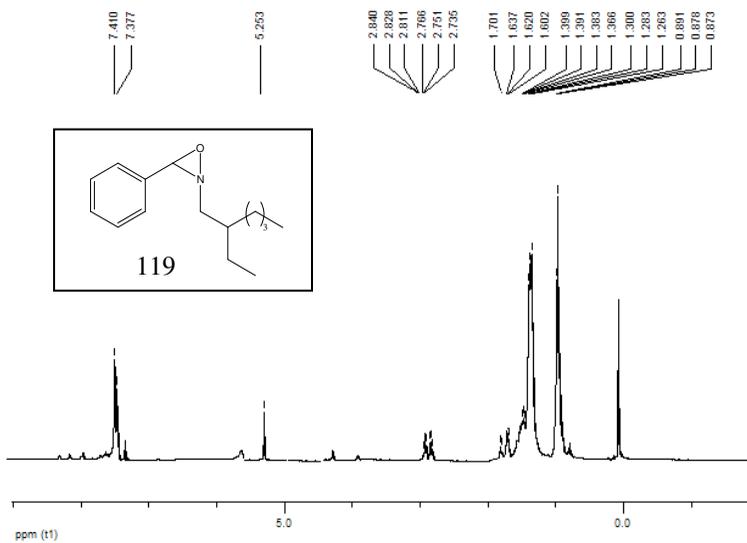
**E-1**



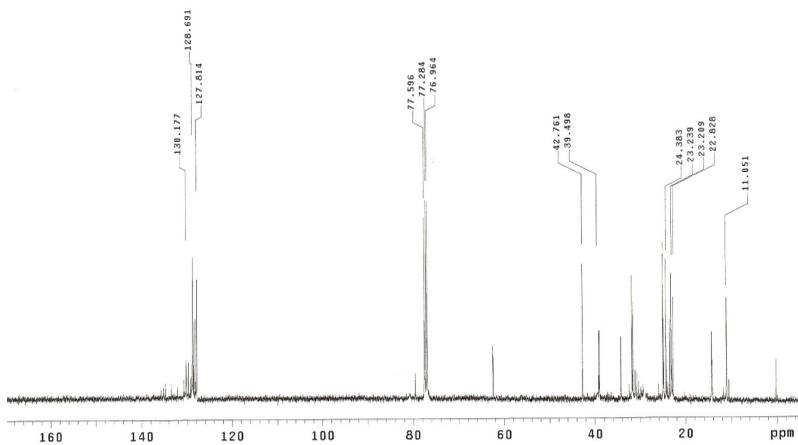
**E-2**



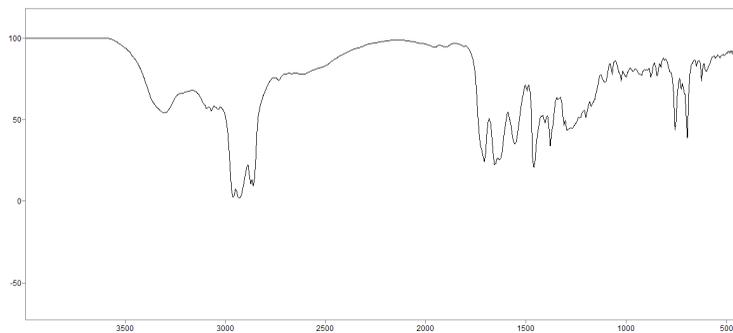
**E-3**



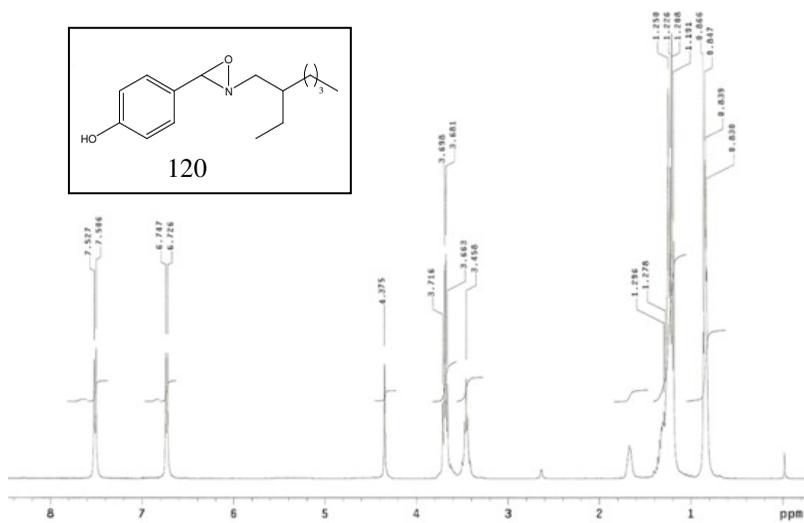
**E-4**



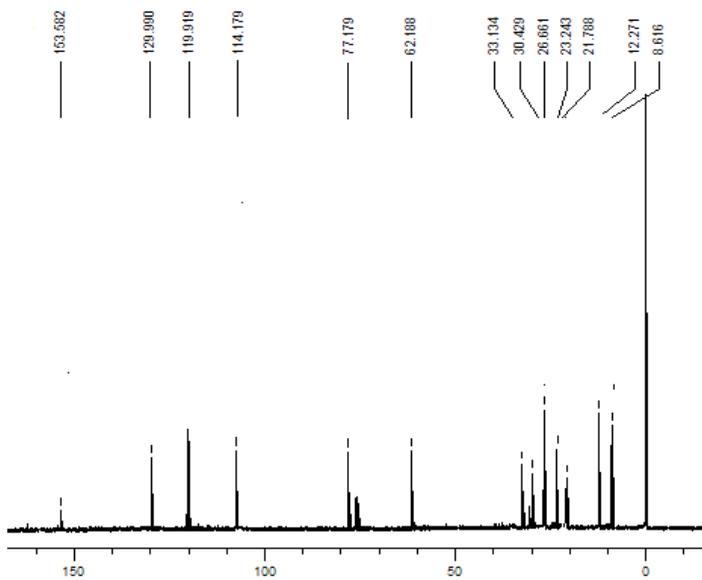
**E-5**



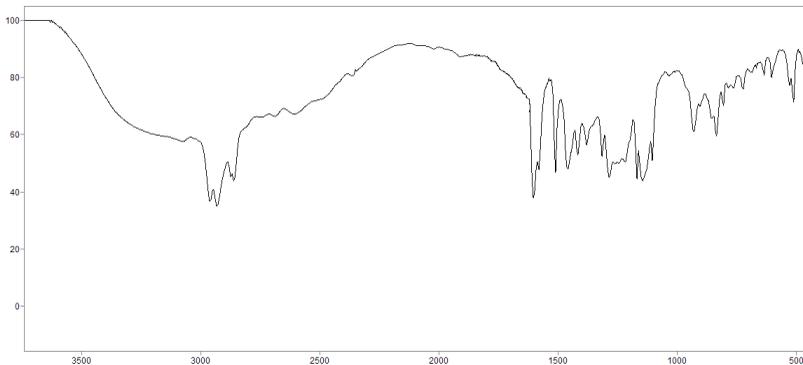
**E-6**



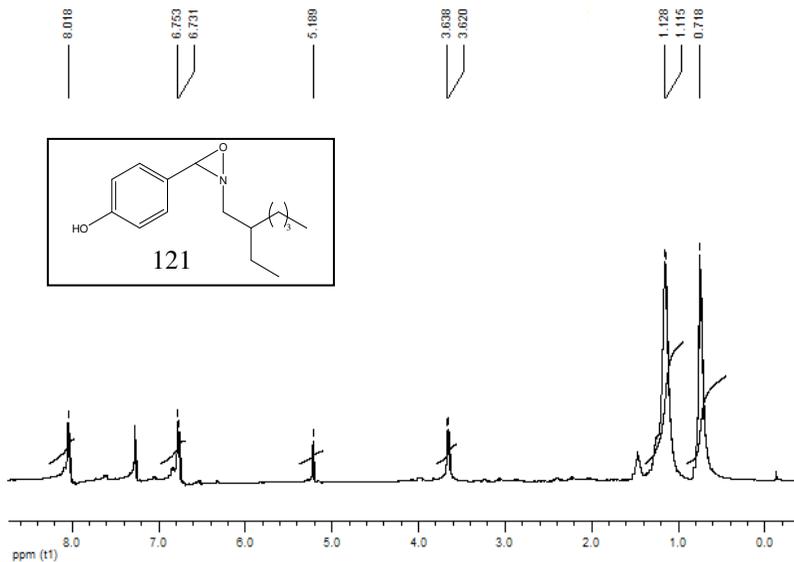
**E-7**



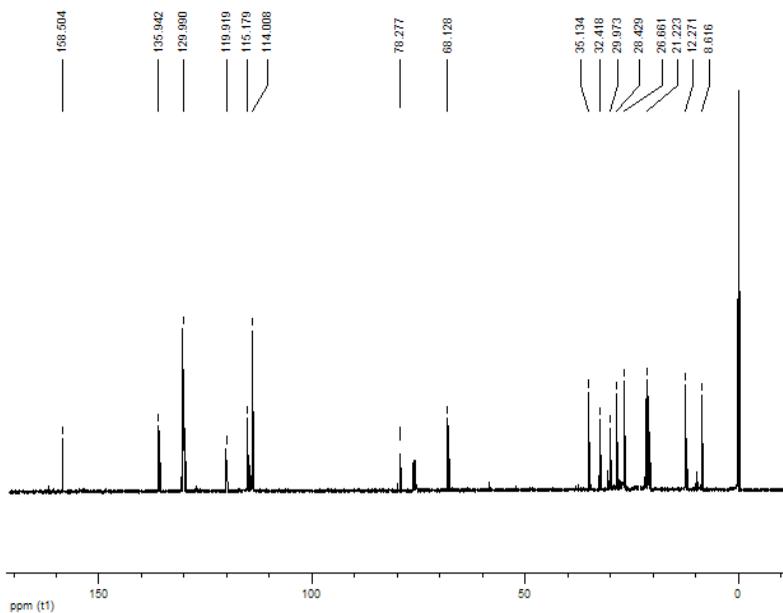
**E-8**



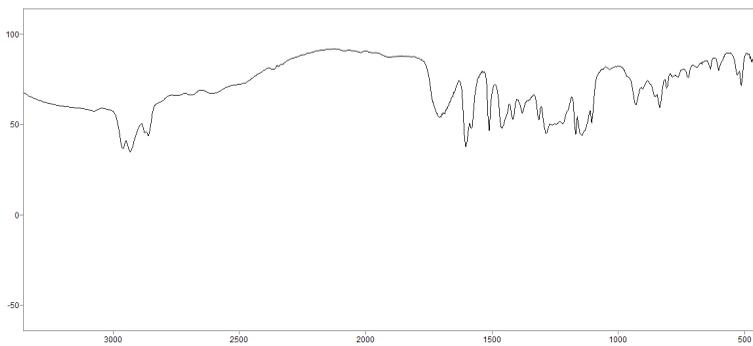
**E-9**



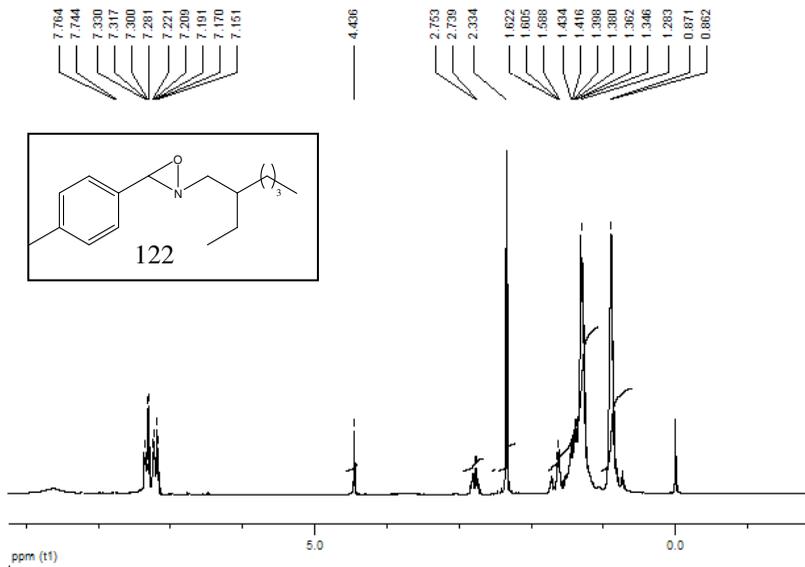
**E-10**



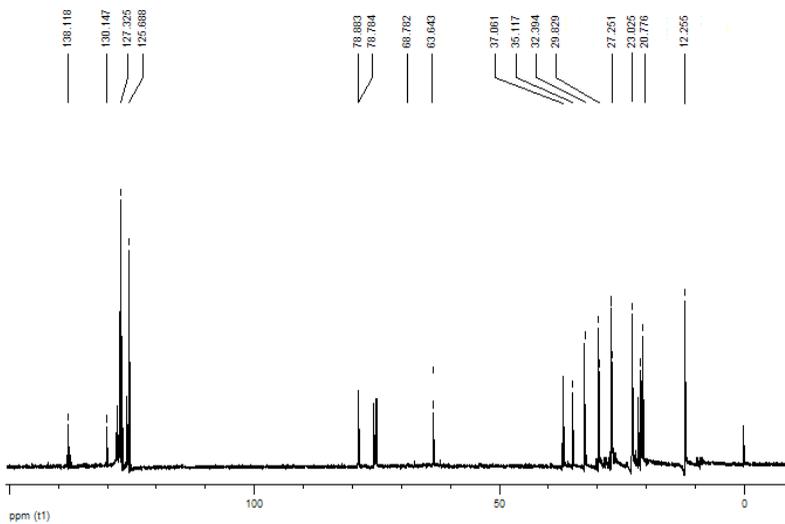
**E-11**



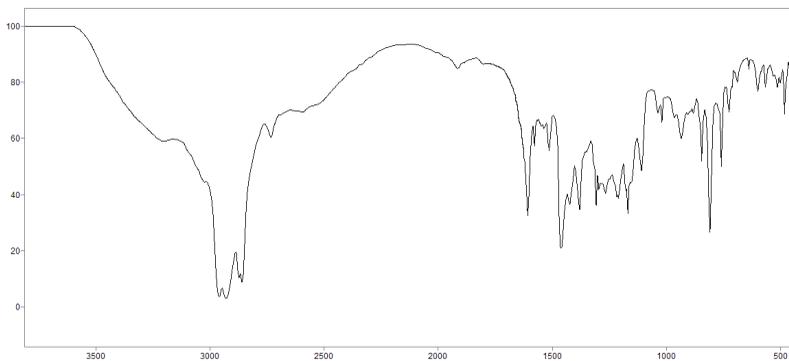
**E-12**



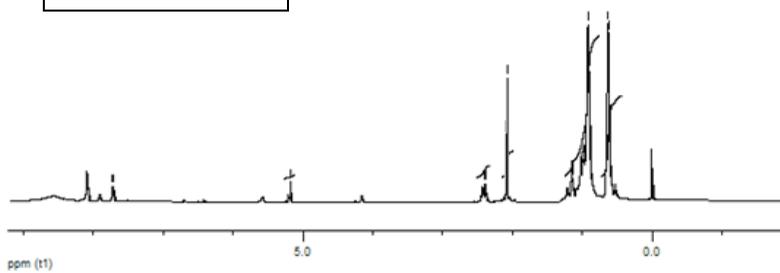
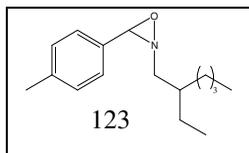
**E-13**



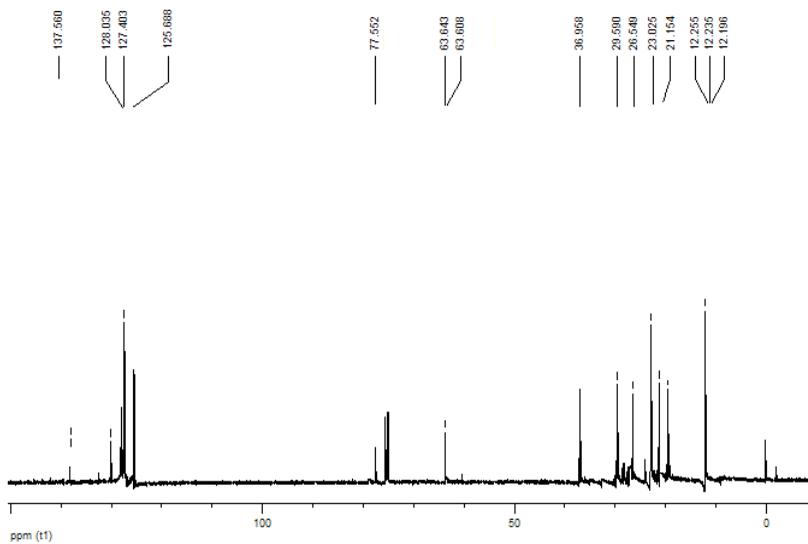
**E-14**



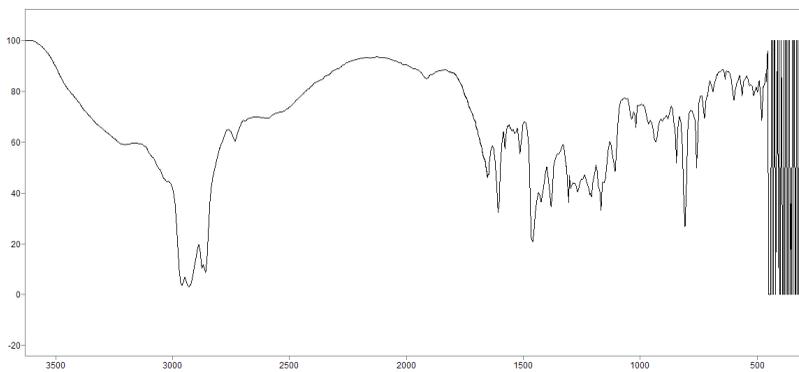
**E-15**



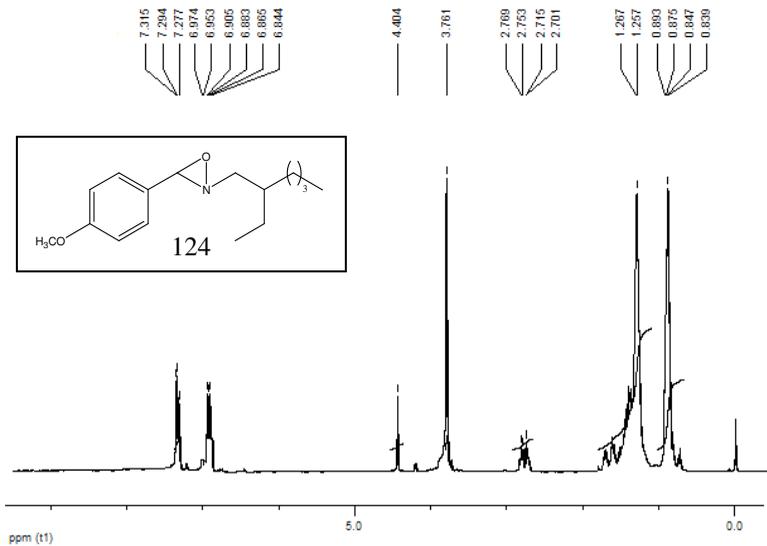
**E-16**



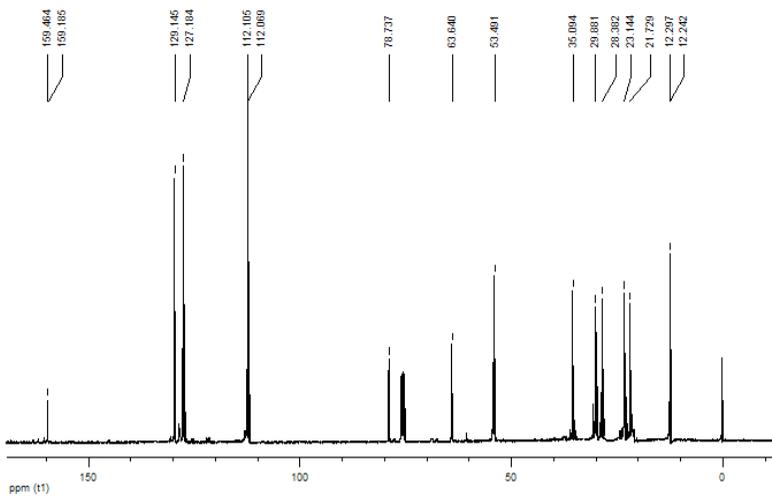
**E-17**



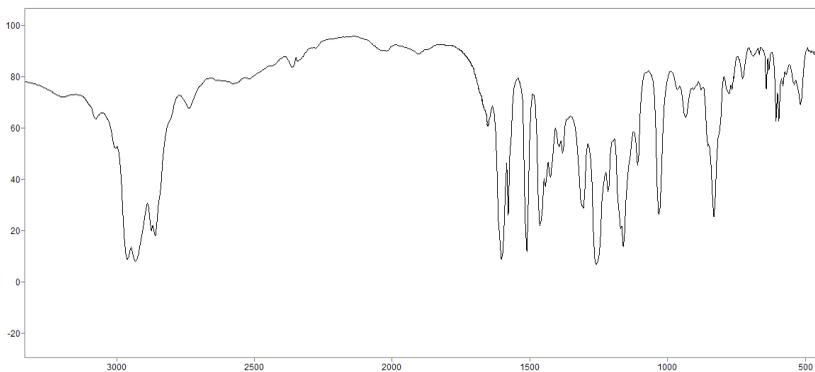
**E-18**



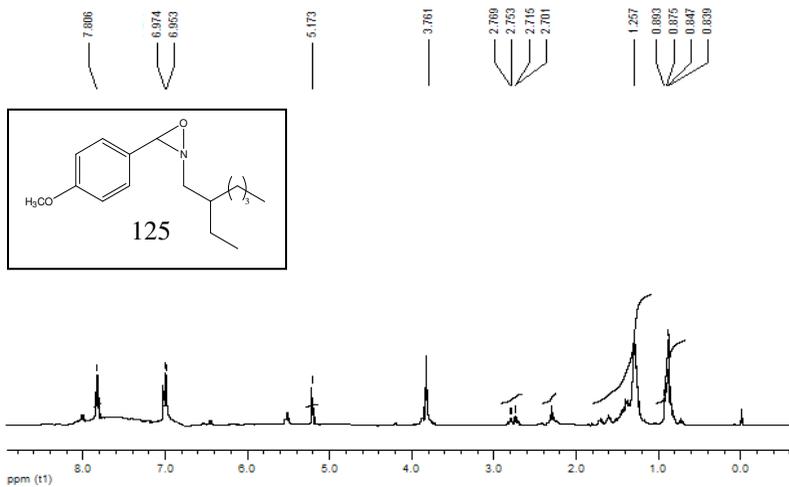
### E-19



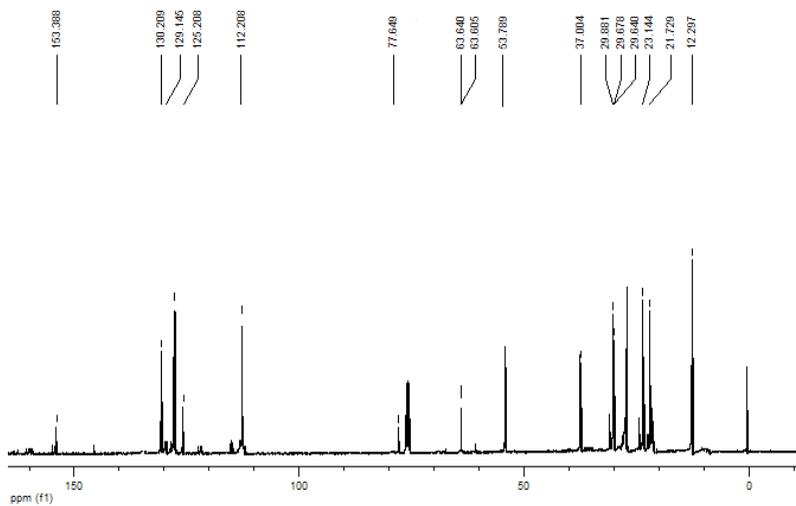
### E-20



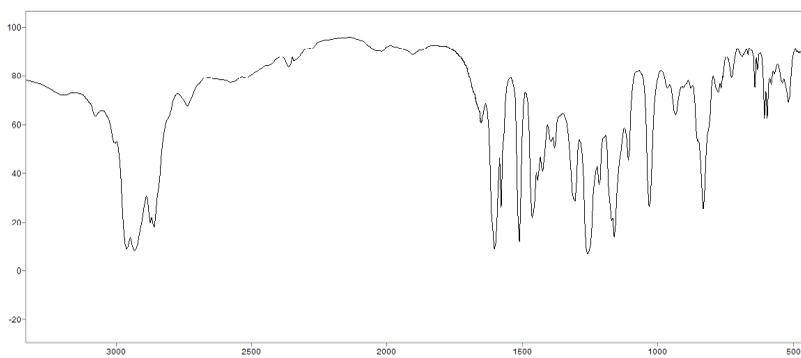
**E-21**



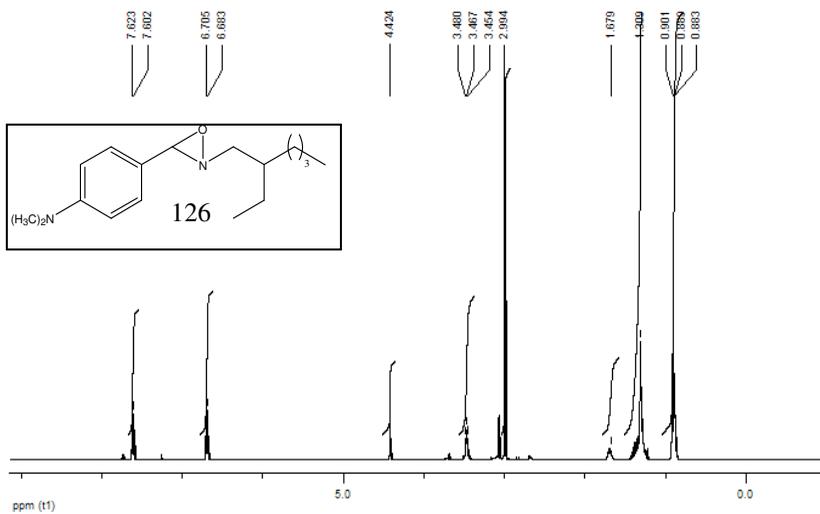
**E-22**



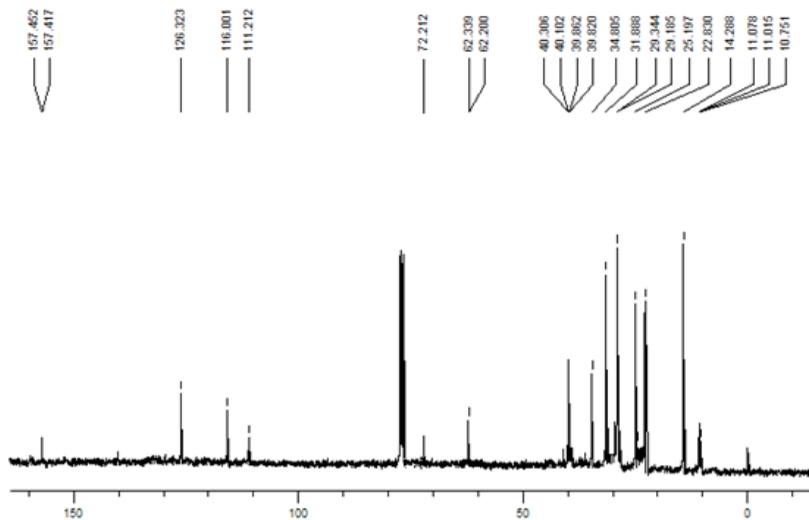
**E-23**



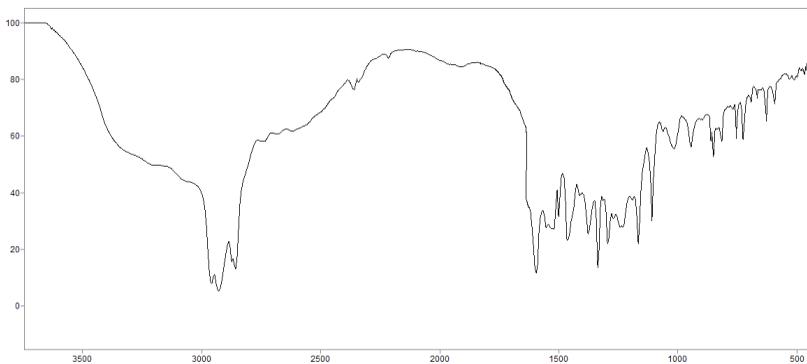
**E-24**



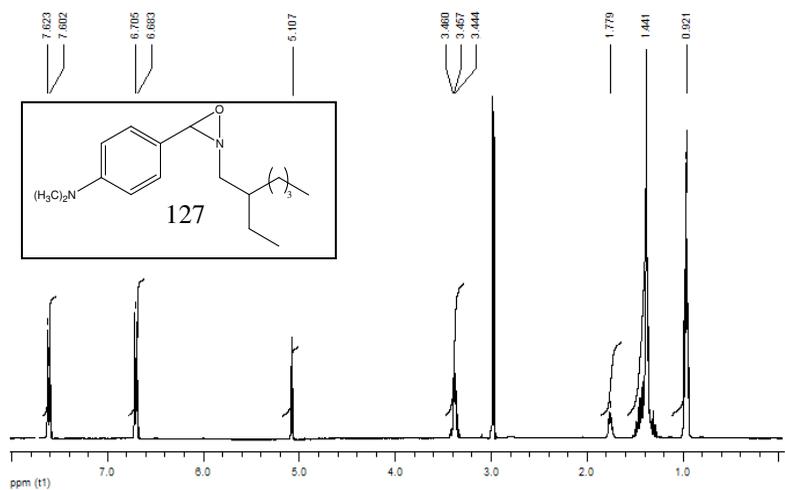
**E-25**



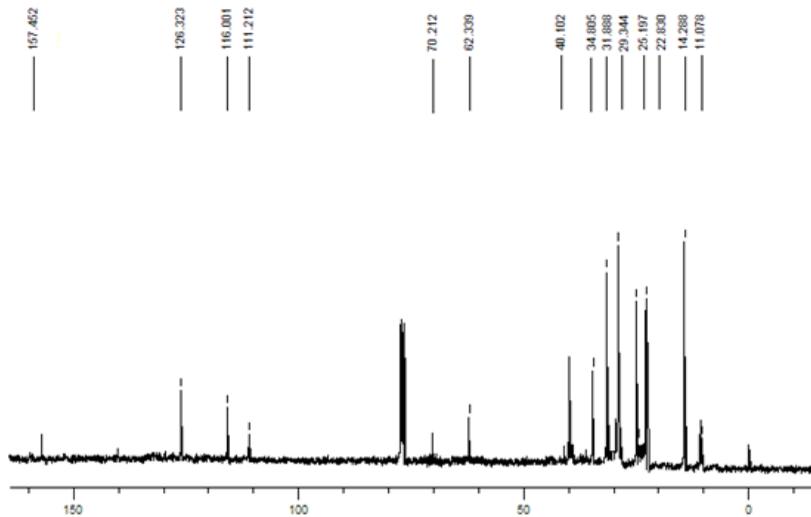
**E-26**



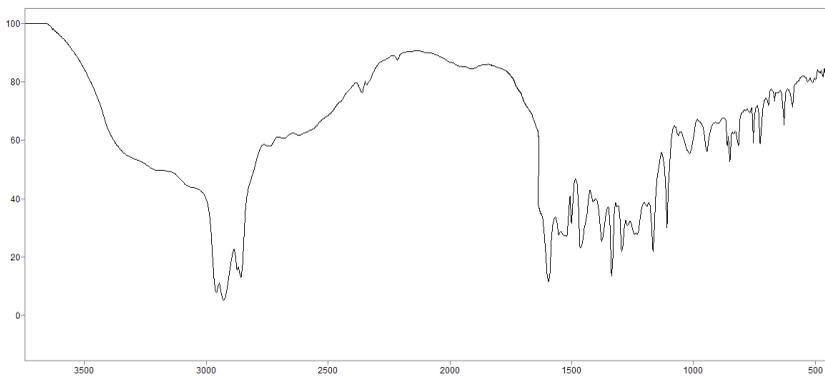
**E-27**



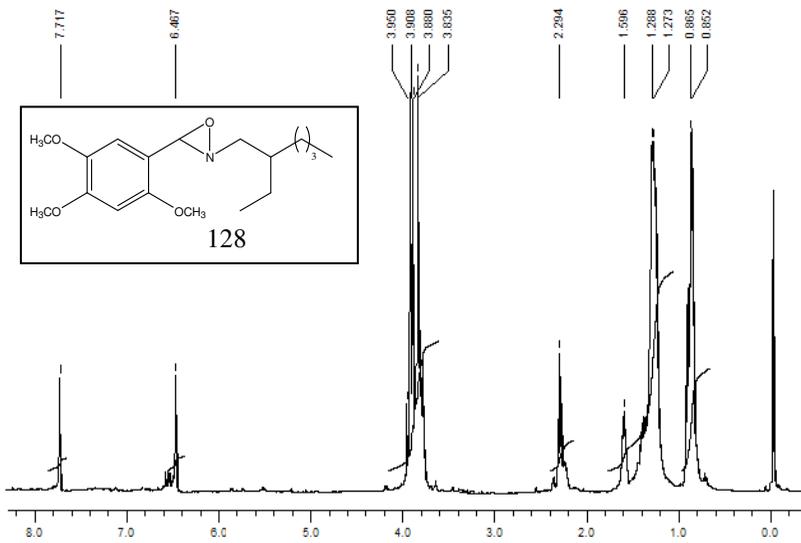
**E-28**



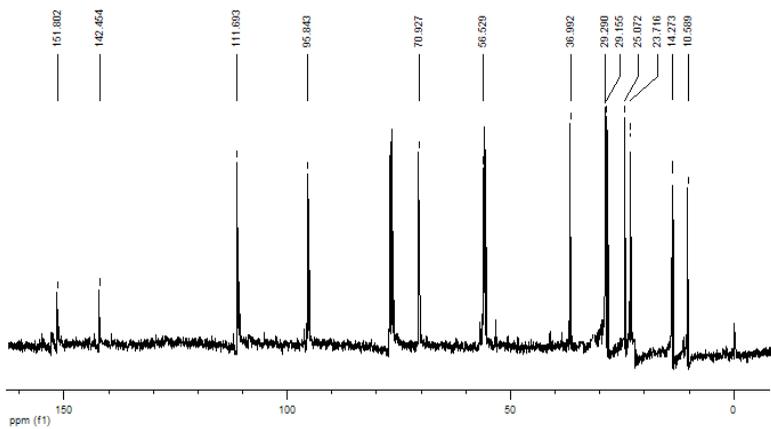
**E-29**



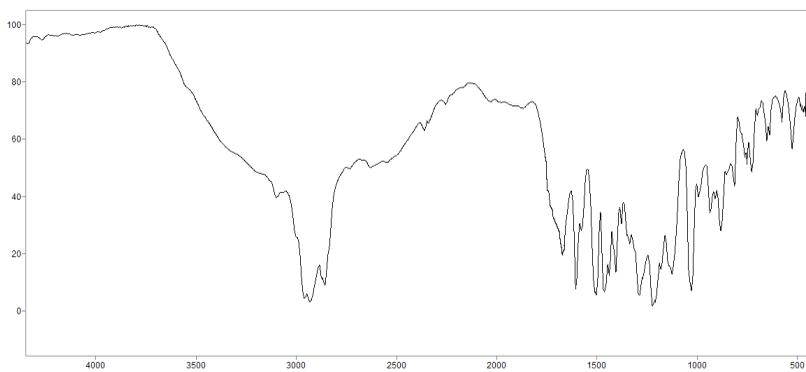
**E-30**



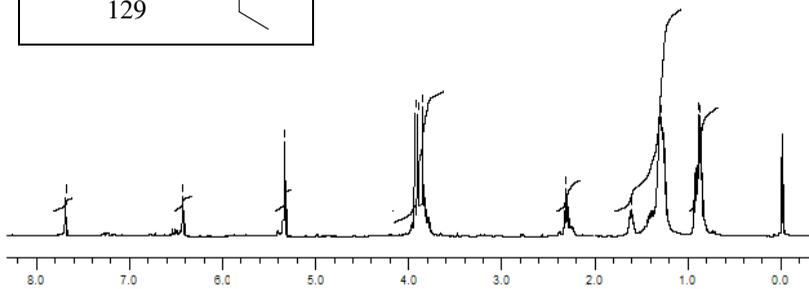
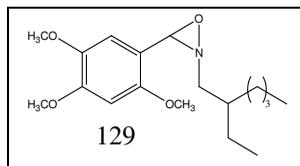
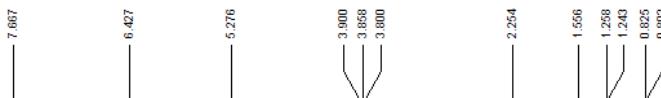
**E-31**



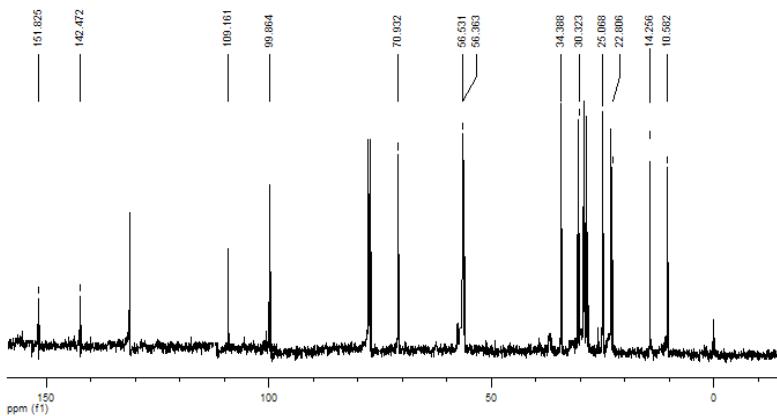
**E-32**



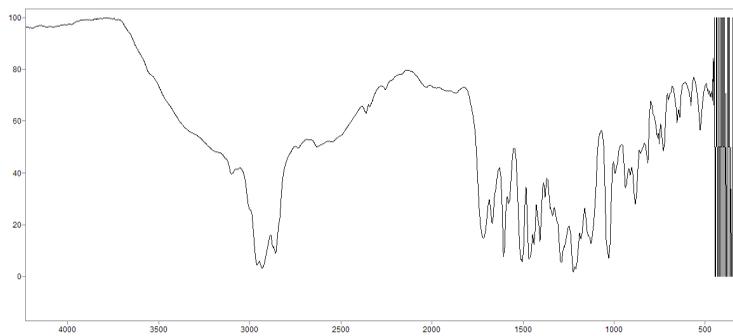
**E-33**



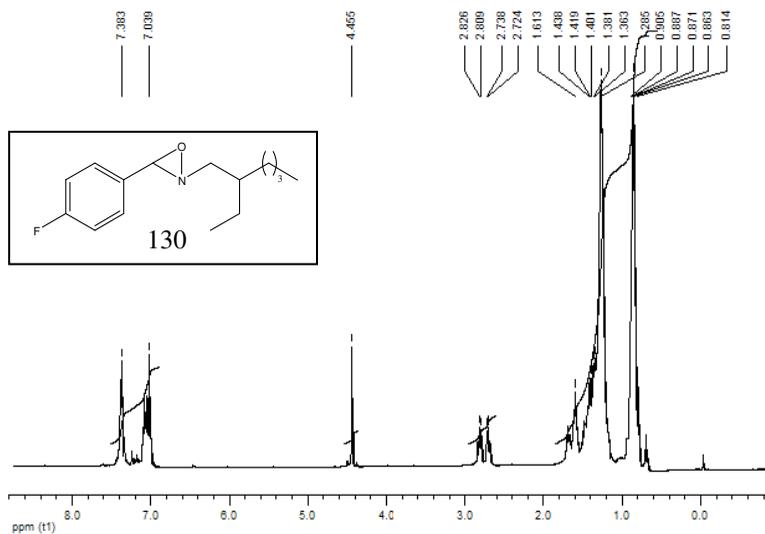
**E-34**



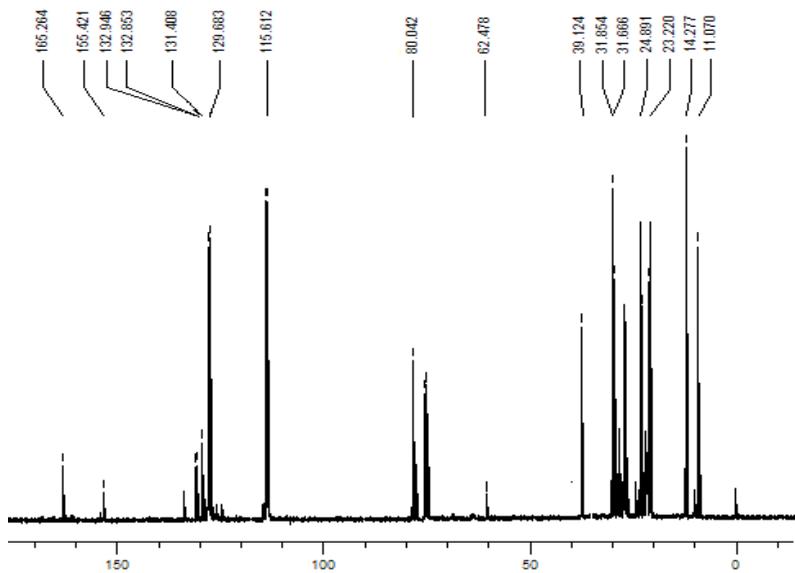
**E-35**



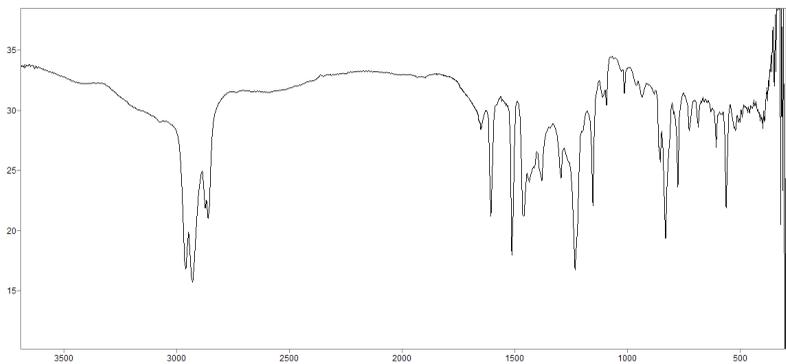
**E-36**



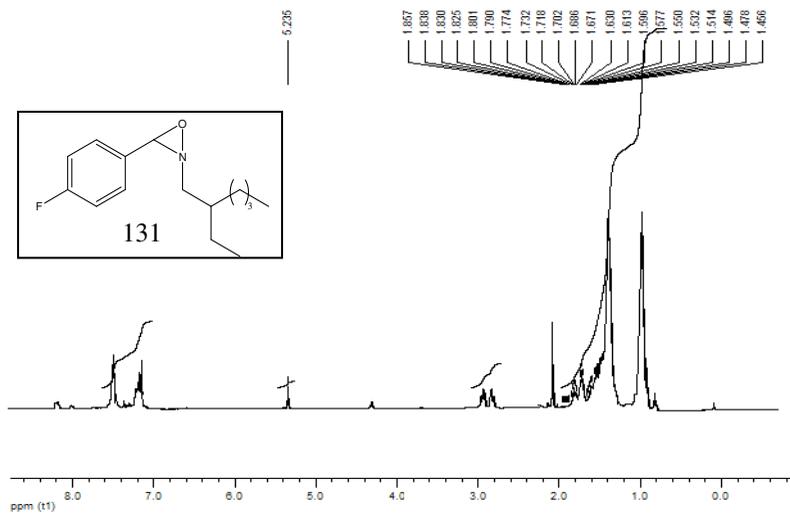
**E-37**



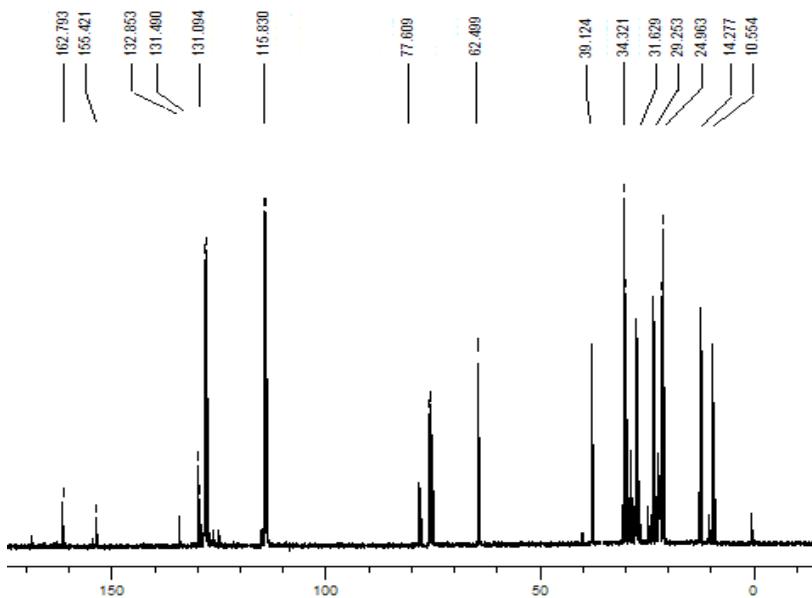
**E-38**



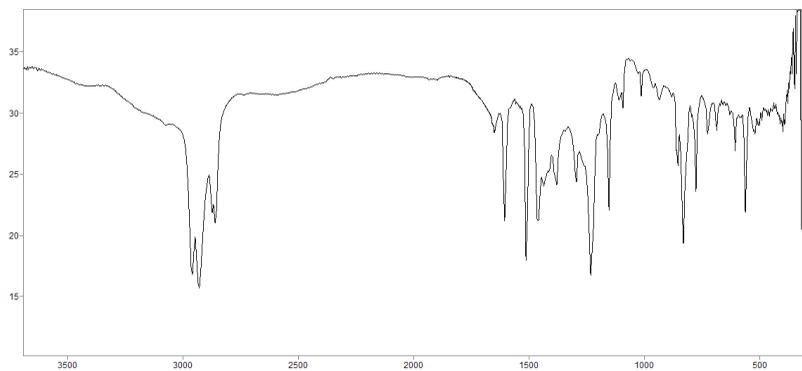
**E-39**



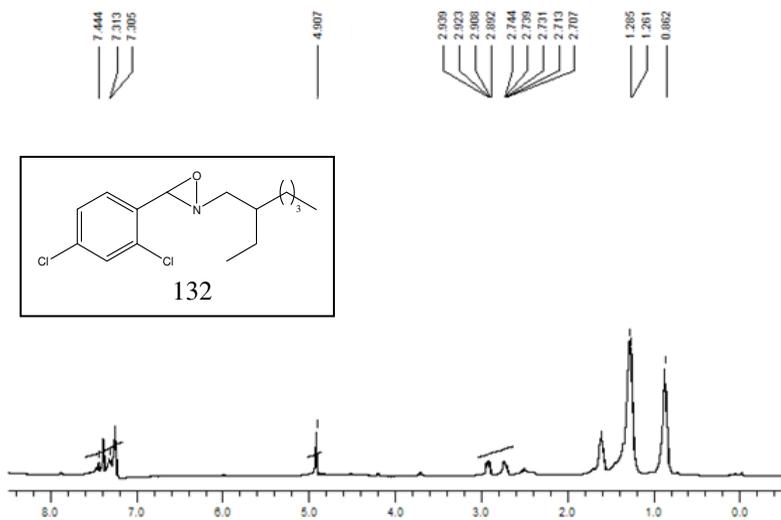
**E-40**



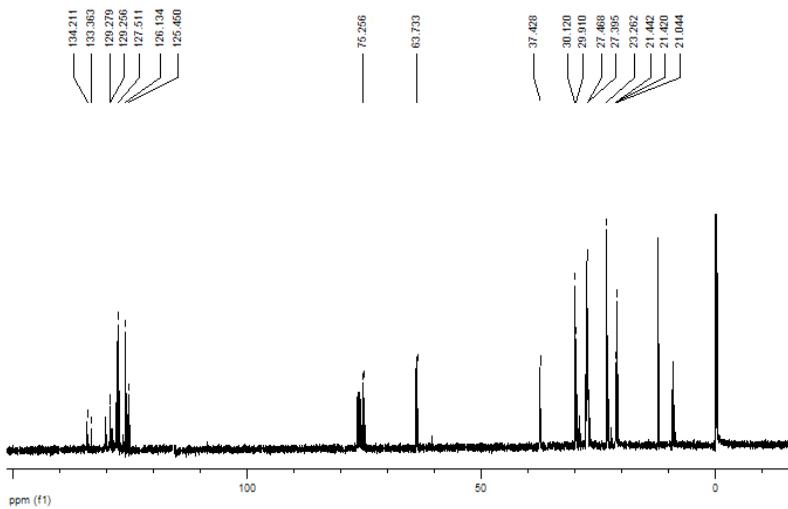
**E-41**



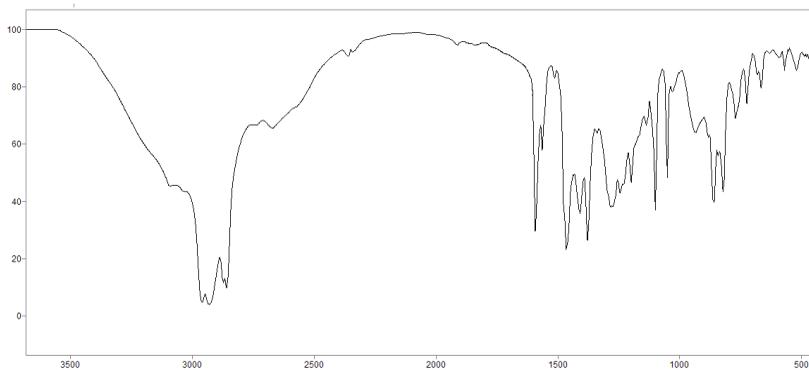
**E-42**



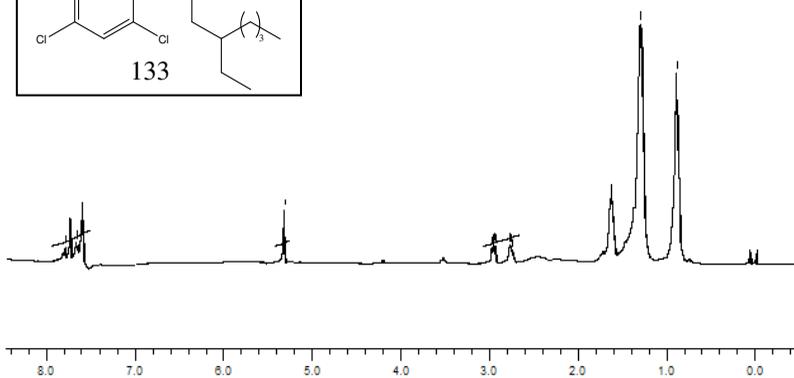
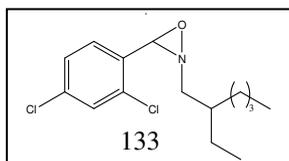
### E-43



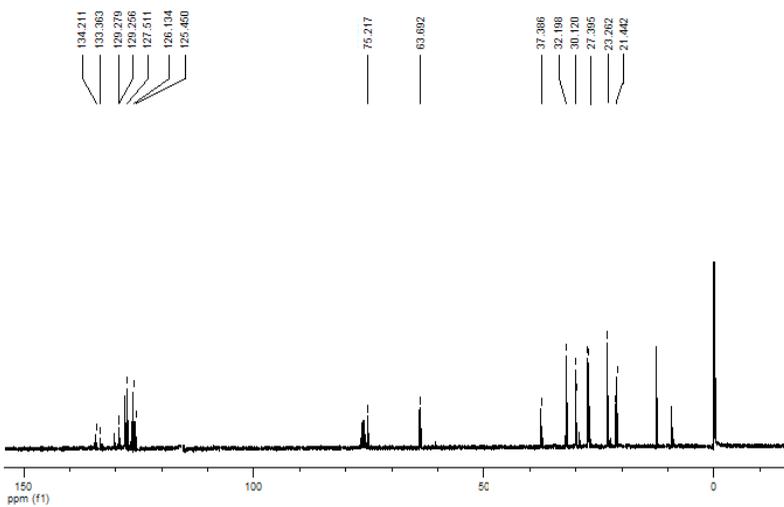
### E-44



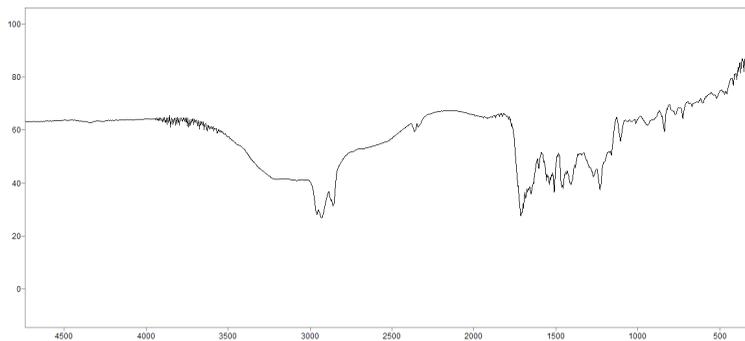
**E-45**



**E-46**



**E-47**



**E-48**



## **ANEXO B – PRODUÇÃO CIENTÍFICA 2006 - 2010**

## Artigos publicados em periódicos

1. SCHNEIDER, R. C. S., LARA, L.R. S., NASCIMENTO, M.G., NUNES, M. R., BITENCOURT, T. B.  
Chemo-enzymatic epoxidation of sunflower oil methyl esters. Journal of the Brazilian Chemical Society, 20, 1473 - 1477, 2009.
2. BITENCOURT, T. B., NASCIMENTO, M.G.  
Chemo-enzymatic synthesis of N-alkyloxaziridines mediated by lipases and urea-hydrogen peroxide. Green Chemistry. , 11, 209-214, 2009.
3. LARA, L. R. S., NASCIMENTO, M. G., NUNES, M. R., SCHNEIDER, R. C. S., BITENCOURT, T. B.  
Oleoquímica- Epoxidação Químio-Enzimática de Óleos Vegetais. Tecno-Lógica. , 10, 117- 136, 2006.
4. BITENCOURT, T. B., MOREIRA, M. A., NASCIMENTO, M. G.  
Optimization of Chemo-Enzymatic Epoxidation of Cyclohexene Mediated by Lipases. Synthetic Communications, 35, 2107 - 2114, 2005.

## Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. BITENCOURT, T. B., LARA, L. R. S., NASCIMENTO, M. G., NUNES, M. R., SCHNEIDER, R. C. S., SEVERO FILHO, W. A.  
Epoxidação Químio-Enzimática do oleato de metila e linoleato de metila em sistema bifásico In: XII Congresso Latino-Americano de óleos e gorduras, 2007, Florianópolis - SC.  
**XII Congresso Latino-Americano de óleos e gorduras. , 2007. v.único.**

## Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. BITENCOURT, T. B., NASCIMENTO, M. G.  
Ionic liquids effects on the chemo-enzymatic oxidation oh N-benziliden-2-ethylhexylamine mediated by CALB In: 10 Latin American Conference on Physical Organic Chemistry, 2009, Florianópolis - SC.  
**10 Latin American Conference on Physical Organic Chemistry. , 2009.**
2. HELLER, M., MICKE, G. A., MOREIRA, M. A., NASCIMENTO, M. G., SPUDEIT, D. A., BITENCOURT, T.

Determinação de perácidos obtidos via enzimática por eletroforese capilar de zona In: 32 Reunião Anual da SBQ, 2009, Fortaleza - CE.

**32 Reunião Anual da SBQ.** , 2009.

3. BITENCOURT, T. B., NASCIMENTO, M. G.

Influência do doador acila na formação químio-enzimática de N-alquiloxaziridinas catalisadas pela CALB In: XVII Encontro de Química da Região Sul, 2009, Rio Grande - RS.

**XVII Encontro de Química da Região Sul.** , 2009.

4. BITENCOURT, T. B., FARIAS, S., NASCIMENTO, M. G.

Formação químio-enzimática de oxaziridinas derivadas da para e meta-nitro-N-benzilen-t-butilamina In: XVII Encontro de Química da Região Sul, 2009, Rio Grande - RS.

**XVII Encontro de Química da Região Sul.** , 2009.

5. BITENCOURT, T. B., NASCIMENTO, M. G.

Síntese químio-enzimática de 2-etilhexilaminas-3-feniloxaziridinas catalisada por CALB In: XVI Encontro de Química da Região Sul, 2008, Blumenau - SC.

**XVI Encontro de Química da Região Sul.** , 2008.

6. BITENCOURT, T. B., MOREIRA, M. A., NASCIMENTO, M. G., SEBRAO, D., SILVA, V. D., HENRIQUES, R., HOFFMANN, I.

Imobilização da lipase de Burkholderia cepacia: aplicação na epoxidação químio-enzimática de (-)-carvona In: XVI Encontro de Química da Região Sul, 2008, Blumenau - SC.

**XVI Encontro de Química da Região Sul.** , 2008.

7. BITENCOURT, T. B., NASCIMENTO, M. G., SPUDEIT, D. A.

Utilização de lipases imobilizadas em filmes poliméricos na preparação químio-enzimática de epóxidos derivados da (-)-carvona In: 31 Reunião Anual da SBQ, 2008, Águas de Lindóia - SP.

**31 Reunião Anual da SBQ.** , 2008.

8. BITENCOURT, T. B., NASCIMENTO, M. G.

Efeito do doador acila na oxidação da N-benziliden-2-etihexilamina mediada pela CALB In: IV Workshop de Biotatálise, 2008, São Carlos - SP.

**IV Workshop de Biotatálise.** , 2008.

9. BITENCOURT, T. B., NASCIMENTO, M. G., SPUDEIT, D. A., MOREIRA, M. A.

Utilização de lipases imobilizadas na preparação químio-enzimática de epóxidos derivados da (-)-carvona In: IV Workshop de Biocatálise, 2008, São Carlos - SP.

**IV Workshop de Biocatálise.** , 2008.

10. BITENCOURT, T. B., LARA, L. R. S., NASCIMENTO, M. G., NUNES, M. R., SEVERO FILHO, W. A., SCHNEIDER, R. C. S.

Chemo-enzymatic synthesis of the mono and di-epoxyestearates derivatives of sunflower oil. In: 12th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2007, Itapema SC.

**12th Brazilian Meeting on Organic Synthesis.** , 2007.

11. NASCIMENTO, M. G., BITENCOURT, T. B.

Chemo-enzymatic Synthesis of Substituted alkylamines mediated by CALB and Urea-peroxide In: 12TH Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2007, Itapema.

**12TH Brazilian Meeting on Organic Synthesis.** , 2007. v.único.

12. BITENCOURT, T. B., MOREIRA, M. A., NASCIMENTO, M. G.

Epoxidação químio-enzimática de terpenos utilizando uréia-peróxido de hidrogênio mediada pela CALB In: 30 Reunião Anual da SBQ, 2007, Águas de Lindóia - SP.

**30 Reunião Anual da SBQ.** , 2007. v.único.

13. BITENCOURT, T. B., NASCIMENTO, M. G.

Síntese químio-enzimática de N-alkiloxaziridinas utilizando uréia-peróxido de hidrogênio na presença de líquido iônico [BMIm]PF<sub>6</sub> In: 30 Reunião Anual da SBQ, 2007, Águas de Lindóia - SP.

**30 Reunião Anual da SBQ.** , 2007. v.único.

14. BITENCOURT, T. B., LARA, L. R. S., NASCIMENTO, M. G., NUNES, M. R., SCHNEIDER, R. C. S., SEVERO FILHO, W. A.

Preparação de epoxiestearatos derivados do óleo de girassol com a lipase de *Candida antarctica* B In: XV Encontro de Química da Região Sul, 2007, Ponta Grossa.

**XV Encontro de Química da Região Sul.** , 2007. v.único.

15. BITENCOURT, T. B., NASCIMENTO, M. G., SPUDEIT, D. A.

Preparação químio-enzimática de derivados monossustituídos da 2-t-

butil-3-fenil-oxaziridinas In: XV Encontro de Química da Região Sul, 2007

**XV Encontro de Química da Região Sul.** , 2007.

16. BITENCOURT, T. B., NASCIMENTO, M. G.

Influência do solvente na formação químico-enzimática de 2-etilhexil-3-fenil-oxaziridinas In: XV Encontro de Química da Região Sul, 2007, Ponta Grossa - PR.

**XV Encontro de Química da Região Sul.** , 2007.

17. BITENCOURT, T. B., NASCIMENTO, M. G., NUNES, M. R., SCHNEIDER, R. C. S., LARA, L. R. S.

Avaliação da Epoxidação de ésteres metálicos de óleos vegetais em diferentes métodos catalíticos In: 58 Reunião Anual da SBPC, 2006, Florianópolis - SC.

**58 Reunião Anual da SBPC.** , 2006. v.único.

18. 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 Biocatalisis y Biotransformaciones, 2006, São Paulo SP.

**III Workshop de Biocatálise.** , 2006. v.único.

19. BITENCOURT, T. B., MOREIRA, M. A., NASCIMENTO, M. G.

Peridrólise do ácido octanóico Catalisada por lipase - epoxidação do D-limoneno In: III Workshop de Biocatálise, 2006, São Paulo - SP.

**III Workshop de Biocatálise.** , 2006. v.único.

20. BITENCOURT, T. B., SCHNEIDER, R. C. S., LARA, L. R. S., NASCIMENTO, M. G., NUNES, M. R.

Epoxidação Químico-Enzimática dos Ésteres Metálicos do Óleo de Girasol em Sistema Bifásico In: III Workshop de Biocatálise/II Encuentro Regional de Biocatalisis y Biotransformaciones, 2006, São Paulo SP.

**III Workshop de Biocatálise.** , 2006. v.Único.

21. BITENCOURT, T. B., NASCIMENTO, M. G.

Utilização de Lipases na Formação Químico-Enzimática de Oxaziridinas In: III Workshop de Biocatálise/II Encuentro Regional de Biocatalisis y Biotransformaciones, 2006, São Paulo SP.

**III Workshop de Biocatálise** , 2006. v.único.

22. BITENCOURT, T. B., ECHEVARRIA, A., SANTOS, C. E. R., NASCIMENTO, M. G.

Efeito de grupos substituintes na epoxidação químio-enzimática de cinnamatos de etila para e meta substituídos In: 29 Reunião Anual da SBQ, 2006, Águas de Lindóia - SP.

**29 Reunião Anual da SBQ.** , 2006. v.único.

23. BITENCOURT, T. B., FERRAZ, A. M., NASCIMENTO, M. G.

Esterificação do ácido láurico catalisada por lípases imobilizadas em filmes de dextrana In: 29º Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia SP.

**29º Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química.** , 2006. v.único.

24. BITENCOURT, T. B., ECHEVARRIA, A., NASCIMENTO, M. G., SANTOS, C. E. R.

Modelagem Molecular aplicada à racionalização da reação de esterificações de ácidos cinâmicos In: 29 Reunião Anual da SBQ, 2006, Águas de Lindóia - SP.

**29 Reunião Anual da SBQ.** , 2006. v.único.

25. BITENCOURT, T. B., FERRAZ, A. M., NASCIMENTO, M. G., SEBRAO, D., PIMENTEL, A., SILVA, V. D.

Reutilização da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada In: 14 Encontro de Química da Região Sul, 2006, Erechim - RS.

**14º Encontro de Química da Região Sul.** , 2006. v.único.

26. BITENCOURT, T. B., LARA, L. R. S., NASCIMENTO, M. G., NUNES, M. R., SCHNEIDER, R. C. S.

Síntese químio-enzimática de ésteres metílicos epoxidados a partir do óleo de girassol mediado por lipase de *Candida antarctica* B. In: 14º encontro de química da região sul- SBQ Sul, 2006, Erechim RS.

**14º encontro de química da região sul- SBQ Sul.** , 2006. v.único.

27. BITENCOURT, T. B., LARA, L. R. S., NASCIMENTO, M. G., NUNES, M. R., SCHNEIDER, R. C. S.

Estudo da epoxidação do 12-hidróxi-9-octadecenoato de metila via enzimática por lipase de *Candida antarctica* B. In: 14º encontro de química da região sul- SBQ Sul, 2006, Erechim RS.

**14º encontro de química da região sul- SBQ Sul.** , 2006. v.único.

28. BITENCOURT, T. B., FERRAZ, A. M., NASCIMENTO, M. G.  
Preparação do laurato de n-propila, via enzimática com lipases imobilizadas em filmes de dextrana. In: Encontro de Química da Região Sul, 2006, Erechim RS.

**14º Encontro de Química da Região Sul.**, 2006. v.único.

### **Apresentação Oral de Trabalhos**

1. BITENCOURT, T. B.

**Biocatálise: Aplicação de Enzimas e microorganismos em Síntese orgânica**, 2008. (Seminário,Apresentação de Trabalho)

2. BITENCOURT, T. B., NASCIMENTO, M. G.

**Síntese químio-enzimática de 2-etilhexilaminas-3-feniloxaziridinas catalisada por CALB**, 2008. (Seminário,Apresentação de Trabalho)

3. BITENCOURT, T. B., LARA, L. R. S., NUNES, M. R., SEVERO FILHO, W. A., SCHNEIDER, R. C. S., NASCIMENTO, M. G.

**Preparação de epoxiestearatos derivados do óleo de girassol com a lipase de Candida antarctica B**, 2007. (Seminário,Apresentação de Trabalho)

4. BITENCOURT, T. B., NASCIMENTO, M. G.

**Preparação químio-enzimática de epóxidos e oxaziridinas mediadas por lipases**, 2007. (Seminário,Apresentação de Trabalho)

5. BITENCOURT, T. B., NASCIMENTO, M. G.

**Utilização de lipases imobilizadas na formação químio-enzimática de oxaziridinas**, 2006. (Seminário,Apresentação de Trabalho)