



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
ESTÁGIO SUPERVISIONADO II (QMC 5512)**



**PREPARAÇÃO DE BASES DE SCHIFF E SÍNTESE QUÍMIO-  
ENZIMÁTICA DE OXAZIRIDINAS**

**Simone Farias**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria da Graça Nascimento  
Co-orientador: Thiago Bergler Bitencourt

**Florianópolis, novembro de 2009**

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

**Simone Farias**

**PREPARAÇÃO DE BASES DE SCHIFF E SÍNTESE QUÍMIO-  
ENZIMÁTICA DE OXAZIRIDINAS**

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

**Florianópolis, novembro de 2009**

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

**Simone Farias**

**PREPARAÇÃO DE BASES DE SCHIFF E SÍNTESE QUÍMIO-  
ENZIMÁTICA DE OXAZIRIDINAS**

---

Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente  
Coordenadora de Estágios do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria da Graça Nascimento  
Orientadora

---

Prof. Dr. Antônio Luiz Braga

---

Prof. Dr. Tiago Antônio da Silva Brandão

**Florianópolis, novembro de 2009.**

## AGRADECIMENTOS

- ✓ A Deus, por estar sempre presente em minha vida.
- ✓ A minha família por todo o amor e compreensão que recebi. Em especial a minha mãe Lourdes por te sempre me apoiado em todos os momentos
- ✓ A professora Maria da Graça Nascimento pela amizade e paciência na orientação deste trabalho.
- ✓ Aos doutorandos Thiago Bergler Bitencourt e Vanessa Dutra Silva pela amizade e paciência e por me ajudar em todos os momentos de dificuldade na realização deste trabalho.
- ✓ Aos colegas do laboratório 301/306 Damianni, Thiago, Vanessa, Geovanni, Kamila, Rosana, Isabel, Cristiane, Marcelo, Flávia e André.
- ✓ A todos os amigos que fiz durante minha vida acadêmica em especial aos que estiveram sempre ao meu lado em todos os momentos (Maitê, Aline, Ludmila e Gustavo).
- ✓ Aos Professores de (Química, Física e Cálculo) que colaboraram para minha formação acadêmica.
- ✓ Aos técnicos dos laboratórios do departamento de química (Nesi, Marilene, Salete e Ligia), pela ajuda nas disciplinas experimentais da graduação.
- ✓ Aos monitores de Física e Cálculo, pela ajuda em várias matérias.
- ✓ Aos funcionários da central de análise pela realização das análises de RMN-<sup>1</sup>H e IV.
- ✓ A Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de iniciação científica PIBIC-UFSC e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.
- ✓ Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina pelo suporte na realização deste trabalho.
- ✓ A Amano e Novozymes pela doação das lipase.

## ÍNDICE GERAL

|  |     |
|--|-----|
| ÍNDICE GERAL.....  | i   |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....   | iii |
| ÍNDICE DE TABELAS.....   | v   |
| LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS.....   | vi  |
| RESUMO.....  | vii |
| 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....   | 1   |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....   | 2   |
| 2.1. Enzimas.....  | 2   |
| 2.2. Modos de ação das enzimas.....  | 3   |
| 2.3. Classificação das enzimas.....  | 4   |
| 2.4. Estrutura espacial das proteínas.....   | 5   |
| 2.5. Lipases.....  | 7   |
| 2.6. Bases de Schiff (Iminas).....   | 9   |
| 2.7. Oxaziridinas.....   | 9   |
| 2.8. Peroxiácido .....   | 10  |
| 3. OBJETIVOS.....  | 12  |
| 3.1. Objetivos geral .....   | 12  |
| 3.2. Objetivos específicos.....  | 12  |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS.....  | 13  |
| 4.1. Reagentes, solventes e enzimas utilizados.....                                    | 13  |
| 4.2. Equipamentos.. .....  | 13  |
| 4.3. Procedimento geral para a preparação de iminas (Bases de Schiff).....             | 14  |
| 4.4. Procedimento geral para a preparação de oxaziridinas.....                         | 17  |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 18  |
| 5.1. Preparação de iminas.....   | 18  |
| 5.2. Preparação das oxaziridinas.....  | 22  |
| 5.3. Influência da lipase na formação das oxaziridinas <b>(22)</b> e <b>(24)</b> ..... | 24  |

|   |    |
|---|----|
| 5.4. Influência da massa de CALB na formação da oxaziridina <b>(22)</b> ..... | 26 |
| 5.5. Influência da massa de CALB na reutilização do biocatalisador.....       | 27 |
| 5.6. Influência da temperatura.....   | 28 |
| 5.7. Influência do efeito do solvente.....                                    | 29 |
| 5.8. Influência dos diferentes grupos substituintes.....                      | 31 |
| 6. CONCLUSÕES.....  | 32 |
| 7. PERSPECTIVAS.....  | 33 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 34 |
| 9. ANEXOS.....  | 37 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 1  | Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de <i>Candida antartica</i> obtida por cristalografia de raios-X.....  | 2  |
| Figura 2  | Representação esquemática do mecanismo geral de catálise enzimática.....   | 3  |
| Figura 3  | Representação esquemática da reação de catálise enzimática.....  | 4  |
| Figura 4  | Diferentes níveis organizacionais da estrutura das proteínas.....  | 6  |
| Figura 5  | Representação esquemática da molécula de hemoglobina.....  | 6  |
| Figura 6  | Hidrólise enantiosseletiva da ( <i>R,S</i> )-acetamida.....  | 8  |
| Figura 7  | Produção de biodiesel através de transesterificação do óleo de soja com metanol.....   | 8  |
| Figura 8  | Formação de iminas.....  | 9  |
| Figura 9  | Síntese de oxaziridinas <i>via</i> tricloro-acetonitrila e peróxido de hidrogênio.....   | 10 |
| Figura 10 | Usos de perácidos em processos de síntese orgânica.....  | 11 |
| Figura 11 | Preparação de iminas derivadas de benzaldeídos substituídos.....   | 18 |
| Figura 12 | Preparação da N-cinemalidenanilina.....  | 19 |
| Figura 13 | Espectro de IV da imina <i>p</i> -nitro- <i>N</i> -benziliden- <i>t</i> -butilamina ( <b>16</b> ) (KBr).....   | 21 |
| Figura 14 | Espectro de RMN-1H da <i>p</i> -nitro- <i>N</i> -benziliden- <i>t</i> -butilamina ( <b>16</b> ) [400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ].....   | 21 |
| Figura 15 | Preparação químio-enzimática de oxaziridinas.....  | 22 |
| Figura 16 | Cromatograma de uma alíquota da reação <i>via</i> químio-enzimática da <i>p</i> -nitro- <i>N</i> -benziliden- <i>t</i> -butilamina <b>16</b> catalisada pela CALB na presença de ácido octanoíco e UHP para formar a 3-(4-nitrofenil)-2- <i>t</i> -butil-oxaziridina <b>22</b> . [acetonitrila, 24h, t.ambiente. Conv. 52%]..... | 23 |
| Figura 17 | Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de uma alíquota da reação de formação da 3-(4-nitro-fenil)-2- <i>t</i> -butil-oxaziridina. [CDCl <sub>3</sub> , 400MHz] [acetonitrila, 2h, t.ambiente. 27%].....   | 24 |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 18 | Influência da massa da CALB 10mg(■), 30mg(●), 50mg(▲) e do tempo na reação químio-enzimática da imina <b>(16)</b> . [1mmol ácido octanóico, 1,5 mmol UHP, 25° C, acetonitrila].....  | 26 |
| Figura 19 | Influência da massa de CALB 10mg (■), 30mg (●), 50mg (▲) e do tempo na reação químio-enzimática da imina <b>(16)</b> , na primeira reutilização do biocatalisador. [1mmol ácido octanóico, 1,5mmol UHP, t.ambiente, acetonitrila].....   | 27 |
| Figura 20 | Influência da temperatura 25 °C <b>(A)</b> e 35 °C <b>(B)</b> , na reação químio-enzimática das iminas, <b>(15)</b> <i>m</i> -nitro (●), <b>(16)</b> <i>p</i> -nitro (▲), <b>(17)</b> <i>o</i> -nitro (■) [2 mmol de substrato, 3 mmol ácido octanóico, 3,0 mmol UHP, 35 °C, acetonitrila].....  | 28 |
| Figura 21 | Influência dos grupos substituintes na reação químio-enzimática das iminas, <b>(21)</b> <i>m</i> -nitro (◀), <b>(22)</b> <i>p</i> -nitro (▲), <b>(23)</b> <i>o</i> -nitro (▼), <b>(24)</b> <i>p</i> -ciano (●), <b>(25)</b> <i>p</i> -metil (■). [2 mmol de substrato, 3 mmol ácido octanóico, 3,0 mmol UHP, 25 °C, acetonitrila]..... | 31 |



## ÍNDICE DE TABELAS

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Parâmetros experimentais usados nas análises de cromatografia gasosa.....                             | 14 |
| Tabela 2 | Dados analíticos e espectroscópicos das Bases de Schiff ( <b>13-20</b> ).....                         | 20 |
| Tabela 3 | Formação químio-enzimática de oxaziridinas em função da lipase utilizada.....                         | 25 |
| Tabela 4 | Formação da 3-(4-nitro fenil) 2- <i>t</i> -butil-oxaziridina ( <b>22</b> ) em função do solvente..... | 30 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

|                     |  |
|---------------------|--|
| CALB                | = lipase de <i>Candida antarctica</i>                    |
| ccd                 | = cromatografia de camada delgada                        |
| CDCl <sub>3</sub>   | = clorofórmio deuterado                                  |
| CG                  | = Cromatografia gasosa                                   |
| E.C.3.1.1.1         | = classificação das esterases                            |
| E.C.3.1.1.3         | = classificação das lipases                              |
| IV                  | =Infravermelho   |
| LPS                 | = lipase <i>Pseudomonas</i> sp                           |
| MTBE                | = éter <i>t</i> -butil metílico                          |
| nd                  | = não detectado  |
| R <sub>f</sub>      | = índice de retenção                                     |
| RMN- <sup>1</sup> H | = ressonância magnética nuclear de hidrogênio            |
| sp                  | = espécie não determinada                                |
| TMS                 | = tetrametilsilano                                       |
| UHP                 | =uréia peróxido de hidrogênio                            |
| UIBBM               | = União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular |

## RESUMO

As Bases de Schiff (iminas) são compostos que possuem ligações C=N, e que são preparadas através da condensação de um aldeído com uma amina primária. Inicialmente foram preparadas iminas derivadas de benzaldeídos substituídos e da *t*-butilamina e uma derivada do cinamaldeído e anilina, através de distintas metodologias. As *p*-nitro-*N*-benzilden-*t*-butilamina, *N*-benziliden-*t*-butilamina, e *N*-cinemalidenanilina, foram obtidas a temperatura ambiente, enquanto que as *p*-metoxi, *p*-ciano, *m*-nitro, *o*-nitro e a *p*-metil-*N*-benzilden-*t*-butilamina foram preparadas sob condições de refluxo. As reações foram feitas em etanol absoluto e ácido acético como catalisador com rendimentos de 5-95%. Após a preparação, foi feita a caracterização, obtendo-se os pontos de fusão e os dados espectrométricos de infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-<sup>1</sup>H). Para todos os compostos foi observada a banda característica da ligação C=N na região de 1625-1668 cm<sup>-1</sup>, e o pico correspondente ao próton imínico na região de 8,2-8,6 ppm. Posteriormente, as *p*-nitro e *p*-ciano-*N*-benzilden-*t*-butilamina foram utilizadas como substratos em reações de oxidação pelo método químio-enzimático para formação das correspondentes oxaziridinas catalisada pela CALB e LPS, a 25 °C. Os estudos demonstraram que a CALB foi mais eficiente na obtenção das oxaziridinas derivadas dessas iminas (>99 e 79%, respectivamente), quando comparados com o uso da LPS (< 5%) em 5 h de reação. A seguir, fez-se um estudo da oxidação da *p*-nitro-*N*-benziliden-*t*-butilamina em função de diferentes massas de CALB, sendo obtidas boas conversões com apenas 30 mg de lipase (80%). Avaliou-se também a reutilização do biocatalisador com este substrato, utilizando as mesmas condições experimentais, os resultados mostraram uma perda significativa na atividade CALB. Com 10 mg de CALB a conversão foi de apenas 7% após 24 h. Parâmetros tais como temperatura, solvente orgânico e estrutura de substrato foram investigados nestas reações. A temperatura de 25 °C foi a mais adequada para as iminas derivadas do *p*-nitro e *o*-nitro-*N*-benziliden-*t*-butilamina (99%, após 5h), e a acetonitrila e o MTBE os melhores solventes (57 e 55%, após 2 h). Os resultados mostraram que às conversões às correspondentes oxaziridinas foram dependente do grupo substituinte ligado ao anel aromático do benzaldeído. As maiores conversões foram obtidas com as *p*-nitro, *p*-metil e *o*-nitro-*N*-benziliden-*t*-butilamina respectivamente (> 99, > 99 e 81%). Finalmente, salienta-se que este método é eficiente para a obtenção de oxaziridinas em condições suaves de reação.

**Palavras-chave:** iminas, oxaziridinas, lipases.

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As transformações químicas que ocorrem nos sistemas vivos são promovidas por várias enzimas que atuam catalisando a conversão de substratos em produtos específicos. Utilizando um sistema eficiente para conversão de energia, os sistemas biológicos são ricos em catalisadores que atuam como agentes químicos ambientalmente amigáveis, com um máximo de economia de carbonos e gerando poucos resíduos. As enzimas catalisam as interconversões de inúmeras estruturas moleculares desempenhando tarefas que vão desde a fixação de nitrogênio até a biossíntese de uma rica diversidade de metabólitos que podem estar associados a inúmeras formas de comunicação. Os biocatalisadores permitem a biotransformação de compostos polifuncionalizados e sensíveis em condições amenas ao contrario das variantes químicas correspondentes que exigem condições reacionais severas. Muitas enzimas conseguem promover a transformação de vários substratos em produtos dificilmente obtidos por rotas químicas ou ainda atuar em reações nas quais não existem alternativas químicas viáveis.<sup>1</sup>

A produção enzimática dos perácidos é atraente porque fornece aos químicos orgânicos a possibilidade de síntese de uma grande variedade destes oxidantes em condições brandas (temperatura ambiente, pH neutro), permitindo inclusive a obtenção de perácidos capazes de realizar *in situ* epoxidações seletivas, sem a necessidade de isolar o oxidante.<sup>2</sup>

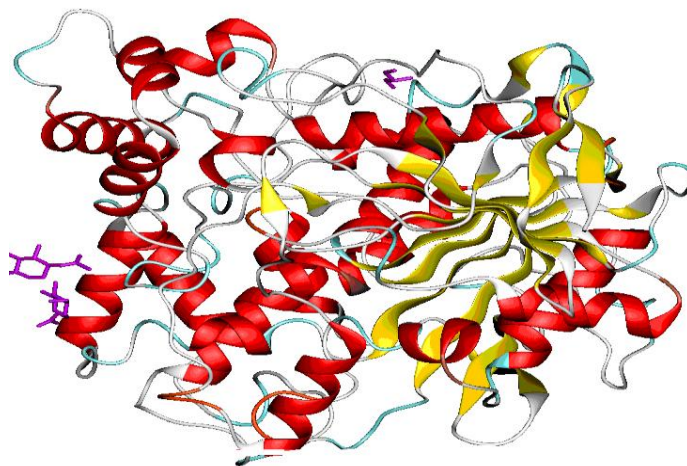
A partir destas considerações, neste trabalho serão utilizadas lipases para formar *in situ* o peroxiácido, a partir do ácido octanóico. O peroxiácido será utilizado para obtenção das correspondentes oxaziridinas derivadas de N-alkil iminas. As reações serão efetuadas a temperatura brandas (25-35 °C), e os produtos e as iminas analisados por técnicas espectrométrica de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-<sup>1</sup>H) e cromatografia gasosa (CG), além da determinação do ponto de fusão para os compostos que são sólidos a temperatura ambiente.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Enzimas

As enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas. Elas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, que são muito superiores a outros catalisadores. Enzimas são tipicamente moléculas labéis e são afetadas por condições reacionais, tais como, variação na temperatura, pH, pressão e solvente. As enzimas foram descobertas no século XIX, provavelmente por Pasteur, que concluiu que a fermentação do açúcar em álcool pela levedura é catalisada por fermentos. Ele postulou que esses fermentos (as enzimas) eram inseparáveis da estrutura das células vivas do levedo. Em 1926, James Sumner isolou a primeira enzima conhecida, a urease que é isolada dos extratos do feijão-soja, e catalisa a hidrólise da uréia em  $\text{NH}_3$  e  $\text{CO}_2$ . Sumner apresentou evidências de que os cristais eram de uma proteína, e concluiu, que as enzimas eram proteínas, o que não foi aceito imediatamente. Somente durante o período de 1930 a 1936, durante o qual J. Northrop cristalizou a pepsina, tripsina e quimiotripsina, é que a natureza protéica das enzimas foi estabelecida com os conceitos mais definitivos e aceitos até atualidade.<sup>3</sup>

A **Figura 1** mostra uma representação esquemática obtida por cristalografia de raios-X da estrutura tridimensional da lipase de *Candida antarctica*.<sup>4</sup>

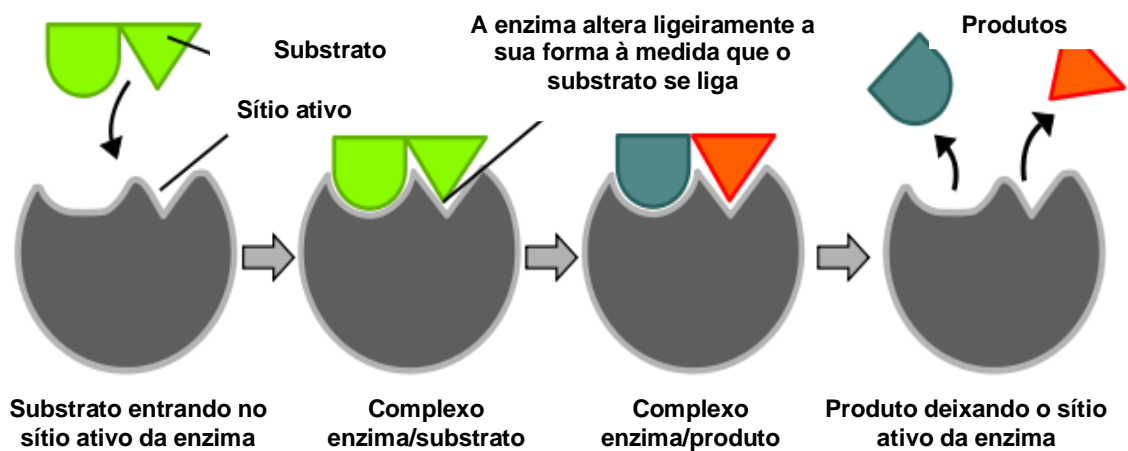


**Figura 1.** Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *Candida antarctica* obtida por cristalografia de raios-X.<sup>4</sup>

## 2.2. Modos de ação das enzimas

A efetividade de uma enzima como catalisador é denominado de atividade enzimática. A atividade está relacionada com o formato tridimensional da proteína, particularmente do seu sítio ativo o qual é responsável pela catálise. Em geral, o sítio ativo é a parte da proteína onde o substrato se liga inicialmente para posterior formação do produto. A especificidade da enzima depende em grande parte da estrutura da região do sítio ativo. Uma explicação do papel do sítio ativo é o modelo “chave e fechadura”. Nesse modelo, o encaixe estereoquímico preciso do substrato no sítio ativo é responsável pela especificidade da catálise.<sup>3,5</sup>

A **Figura 2** mostra de forma esquemática o mecanismo geral de catálise enzimática.<sup>6</sup>



**Figura 2.** Representação esquemática do mecanismo geral de catálise enzimática.<sup>6</sup>

O mecanismo de atividade enzimática é explicado pelo modelo de Michaelis-Menten. Em 1913, Leonor Michaelis e Maud Menten propuseram que a enzima (**E**) inicialmente combina-se reversivelmente com substrato (**S**), para formar o complexo enzima-substrato (**ES**), em um etapa reversível relativamente rápida. A seguir em uma etapa lenta, o complexo (**ES**) se rompe com a regeneração da enzima livre e formação do produto (**P**). A segunda etapa é a

determinante da velocidade da reação. A **Figura 3** representa de forma esquemática a reação de catálise enzimática mostrando a combinação da enzima e do substrato, o intermediário da reação, a formação do produto, e a enzima sendo regenerada após a catálise.<sup>3</sup>



**Figura 3.** Representação esquemática da reação de catálise enzimática.

As principais propriedades que caracterizam as enzimas como catalisadores são:<sup>1,3,5,9</sup>

- ✓ O aumento da velocidade das reações em  $10^{10}$  a  $10^{23}$  vezes em relação a não catalisada.
- ✓ Em geral, as reações ocorrem em condições suaves de temperatura (20 °C – 40 °C), sob pressão atmosférica e na faixa de pH de 5-8.
- ✓ A atividade catalítica pode variar de acordo com a concentração do substrato, produto ou de outras espécies do meio reacional.
- ✓ Químiosseletividade – podem atuar em somente um tipo de grupo funcional mesmo na presença de outros grupos reativos
- ✓ Regio e diasterosseletividade – as enzimas podem distinguir entre grupos funcionais com a mudança do meio reacional;
- ✓ Enantiosseletividade – são catalisadores quirais e sua especificidade pode ser explorada para sínteses seletivas e assimétricas.
- ✓ Catalisam reações em meios não-aquosos (ou aquo-restritos), embora às vezes, se observe perda de atividade enzimática.

### 2.3. Classificação das enzimas

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) classifica as enzimas em seis grandes classes, e cada uma dessas em subclasses de acordo com o tipo de reação catalisada.

As enzimas são classificadas em seis grupos, sendo:

- ✓ **Oxidoredutases:** catalisam reações de oxi-redução;

- ✓ **Transferases:** catalisam reações de transferência de grupos como acila, açúcares, fosforila e aldeído ou cetona de uma molécula para outra;
- ✓ **Hidrolases:** catalisam reações de hidrólises, de ésteres, amidas, lactonas;
- ✓ **Liases:** catalisam reações de adição, geralmente com HX a ligação dupla ou formação de ligações duplas por remoção de grupos (HX, H<sub>2</sub>O).
- ✓ **Isomerases:** catalisam a transferência de grupos dentro da molécula produzindo um isômero.
- ✓ **Ligases:** catalisam a formação de ligações C-O, C-S, C-C e de ésteres de fosfatos.

Em química orgânica as enzimas hidrolíticas são as mais utilizadas por não requererem o uso de cofatores.<sup>3</sup> Neste trabalho, serão usadas as lipases que são enzimas da classe das hidrolases.

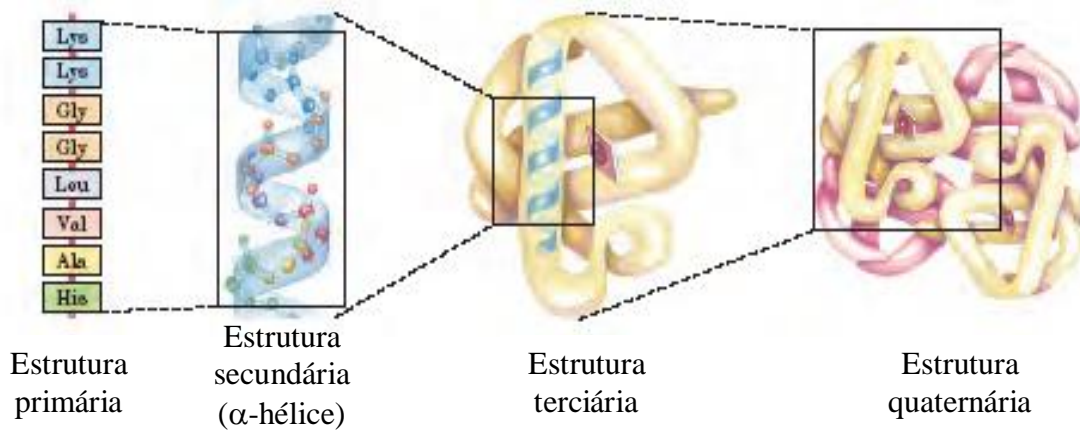
#### 2.4. Estrutura espacial das proteínas

A organização espacial das proteínas é resultado do tipo de aminoácidos que as compõem e de como eles estão dispostos uns em relação aos outros. A seqüência dos aminoácidos irá determinar o tipo de interação possível entre os, grupos R, que apresentam características de carga, volume e afinidade com água muito variáveis. Conforme sua disposição espacial as proteínas podem ser classificadas em quatro níveis organizacionais: estruturas primária, secundária, terciária e quaternária.<sup>3</sup>

A estrutura primária de uma proteína descreve a seqüência de aminoácidos ao longo da cadeia peptídica, e é específica para cada uma delas. A estrutura secundária descreve a formação de estruturas regulares pela cadeia polipeptídica. Duas organizações são particularmente estáveis: o enrolamento da cadeia em torno de um eixo formando uma hélice ( $\alpha$ -hélice) e interação lateral de segmentos de uma cadeia ou de diferentes cadeias formando pregas (folhas pregueadas ou configuração- $\beta$ ). A estrutura terciária de uma proteína refere-se à sua forma tridimensional, que é formada em conseqüência da reorganização da cadeia polipeptídica, incluindo as pontes de enxofre. A estrutura quaternária descreve a associação de duas ou mais cadeias polipeptídicas (subunidades)

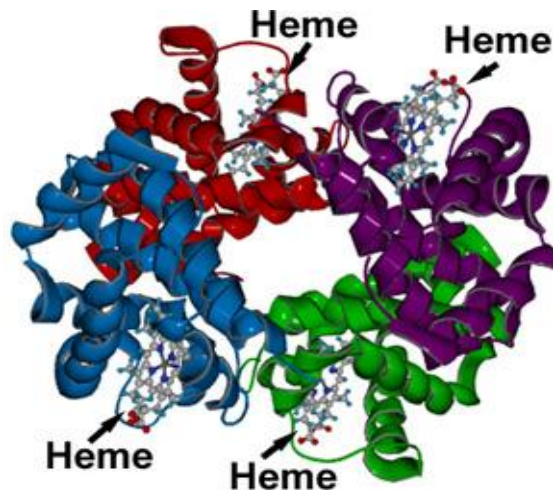


para compor uma unidade funcional que é mantida por ligações não-covalentes, e as subunidades podem ser iguais ou diferentes.<sup>3</sup> A **Figura 4** mostra de forma esquemática os níveis organizacionais das proteínas e como eles se relacionam.<sup>3</sup>



**Figura 4.** Diferentes níveis organizacionais da estrutura das proteínas.<sup>3</sup>

Mais especificamente, a **Figura 5** mostra a representação esquemática da molécula de hemoglobina, um exemplo de estrutura quaternária.<sup>7</sup>



**Figura 5.** Representação esquemática da molécula de hemoglobina.<sup>7</sup>

A hemoglobina é uma proteína multimérica, formada por quatro cadeias polipeptídicas iguais agrupadas duas a duas ( $\alpha$  e  $\beta$ ), por meio de interações hidrofóbicas, e cada unidade apresenta um grupo heme, uma estrutura formada por quatro anéis pirrólicos ligados a um átomo de Fe (II) no centro.<sup>3</sup>

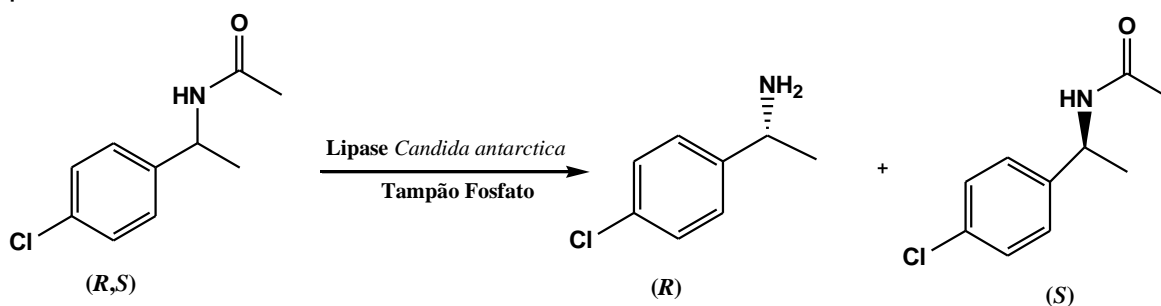
## 2.5. Lipases

As lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são classificadas como hidrolases e atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, constituindo uma classe especial de esterases. A diferenciação entre uma lipase e uma esterase (EC. 3.1.1.1) está no fato de que a primeira catalisa reações de substratos insolúveis em água, enquanto que uma esterase age em substratos solúveis.<sup>10</sup> As lipases são encontradas em tecidos de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de microorganismos tais como os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum* sp, *Achromobacter* sp e *Staphylococcus* sp. Destes microorganismos, as lipases *Aspergillus* sp, *Mucor* sp, *Rhizopus* e *Candida* sp estão comercialmente disponíveis. Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases de microorganismos são preferíveis às de fontes animais e plantas devido ao alto custo do seu isolamento.<sup>10,11</sup> As lipases podem ser usadas para fazer bioconversões em reações de esterificação, transesterificação (acidólise, interesterificação, alcoolise), aminólise e tiotransesterificação. Entre suas características mais importantes cita-se a estereo especificidade, regioseletividade e habilidade de catalisar reações heterogêneas na interface da água e em sistemas insolúveis. Essas enzimas também têm sido extremamente investigadas com relação às suas propriedades bioquímicas e fisiológicas e mais recentemente para aplicações industriais.<sup>10,12,13</sup>

Porém algumas desvantagens são relacionadas ao se tratar da utilização de enzimas como catalisadores, em especial em meio orgânico.<sup>9,14</sup>

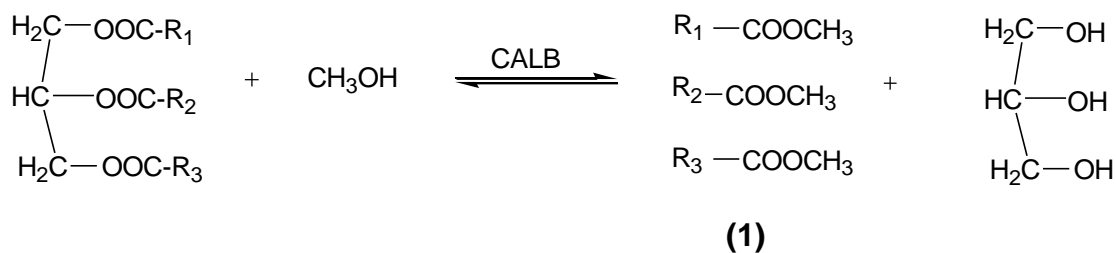
- ✓ Não possuem estabilidade suficiente em determinadas condições reacionais de temperatura e pH, podendo perder a atividade catalítica quando submetidas a altas temperaturas, auto-oxidação, autodigestão e desnaturação pelo solvente.
- ✓ Podem sofrer inibição por agentes químicos e físicos.
- ✓ Ainda apresentam um alto custo.

As lipases microbianas constituem um importante grupo de enzimas na biotecnologia, principalmente por causa de sua versatilidade e propriedades que as tornam de fácil aplicação em escala industrial. Entre as suas aplicações industriais estão o uso na indústria de óleo, têxtil, alimentícia, de detergentes, e na síntese de fármacos e cosméticos.<sup>10,13,15</sup> A **Figura 6** mostra a hidrólise da (*R,S*)-acetamida usada pela Bayer A.G para a obtenção do furoato de mometasona (Topinson), que é um creme usado para aliviar afecções da pele de pessoas sensíveis à corticóides.<sup>15,16</sup>



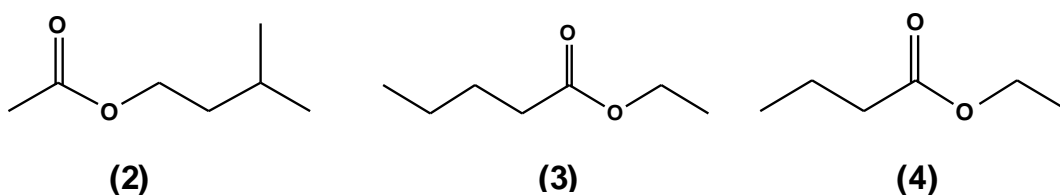
**Figura 6.** Hidrólise enantiosseletiva da (*R, S*)-acetamida.<sup>15,16</sup>

As lipases apresentam a capacidade de preservar sua atividade catalítica em solvente orgânico. Devido a esta capacidade, seu potencial para conversão de gorduras e óleos em produtos para usos industriais tem sido amplamente investigado. Dabdoub e *col.* utilizaram as lipases *Candida antarctica* (CALB), *T lanuginosa* (Lipozyme TL IM) e *R miehei* (Lipozyme RM IM) para a obtenção de biodiesel à partir da alcoólise dos óleos de soja, girassol e arroz, empregando metanol, etanol, propanol e butanol, obtendo-se conversões de 90% em éster metílicos **(1)**. O processo é de interesse pois o biocatalisador foi reutilizado em até 100 vezes sem diminuição na conversão em éster.<sup>17</sup> (**Figura 7**)



**Figura 7.** Produção de biodiesel através de transesterificação do óleo de soja com metanol.<sup>17</sup>

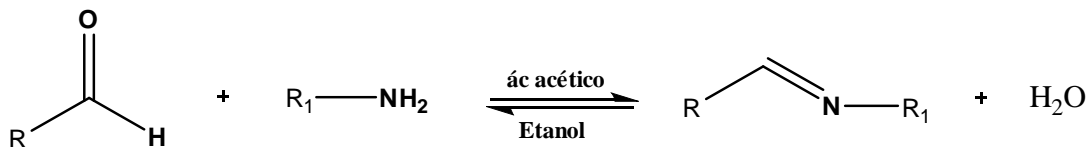
As lipases apresentam inúmeras aplicações, e entre estas pode-se destacar o trabalho de Ozyilmaz e col. que utilizaram a lipase *Candida rugosa* (LCR) e a Pancreática de porco (LPP) imobilizadas em gel de alginato de cálcio para obter três importantes ésteres de aroma. O acetato de isoamila (aroma de banana) **(2)**, valerato de etila (aroma de maçã verde) **(3)** e o butirato de etila (aroma de abacaxi) **(4)**. Os resultados de testes sensoriais mostraram ésteres com melhores odores e cores.<sup>18</sup>



A seguir, será feita uma breve introdução sobre as iminas que são os substratos a serem utilizados neste trabalho.

## 2.6. Bases de Schiff (Iminas)

As iminas são compostos análogos as carbonilas e podem ser preparadas através da condensação de um aldeído ou cetona com uma amina primária. A **Figura 8** mostra a equação geral para a formação de iminas a partir de aldeídos e aminas primárias.<sup>19</sup>



R= grupo alquila e/ou arila  
R<sub>1</sub>= N-alquilamina ou N-arilamina

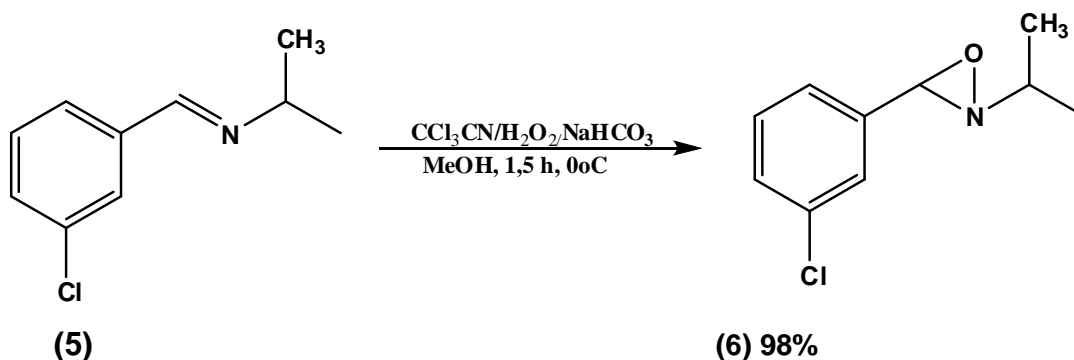
**Figura 8.** Formação de iminas.<sup>19</sup>

## 2.7. Oxaziridinas

As oxaziridinas ou oxaziranos são uma classe de compostos que possuem um anel de três membros C-O-N e constituem uma classe de heterociclos

bastante empregados em síntese orgânica.<sup>20</sup> As primeiras oxaziridinas foram descritas na literatura em meados da década de 50 por Emmons e outros autores.<sup>20,21</sup> São compostos bastante reativos e instáveis devido ao anel de três membros formado por C-O-N, o qual confere tensão conformacional além das ligações entre os átomos do anel. As oxaziridinas podem ser obtidas através de várias metodologias. Como, por exemplo, *via* oxidação na presença de metais de transição, oxidação com peróxido de hidrogênio ou oxigênio molecular, e oxidação de imina com ácido *m*-cloroperbenzóico (MCPBA).<sup>22,23</sup>

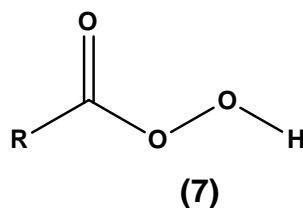
Kraïem e *col.* utilizaram a tricloro-acetonitrila e o peróxido de hidrogênio à temperatura ambiente na oxidação de alquil-iminas (**5**) para obter a oxaziridina (**6**) com rendimento de 98%.<sup>24</sup> (**Figura 9**).



**Figura 9.** Síntese de oxaziridinas *via* tricloro-acetonitrila e peróxido de hidrogênio.<sup>24</sup>

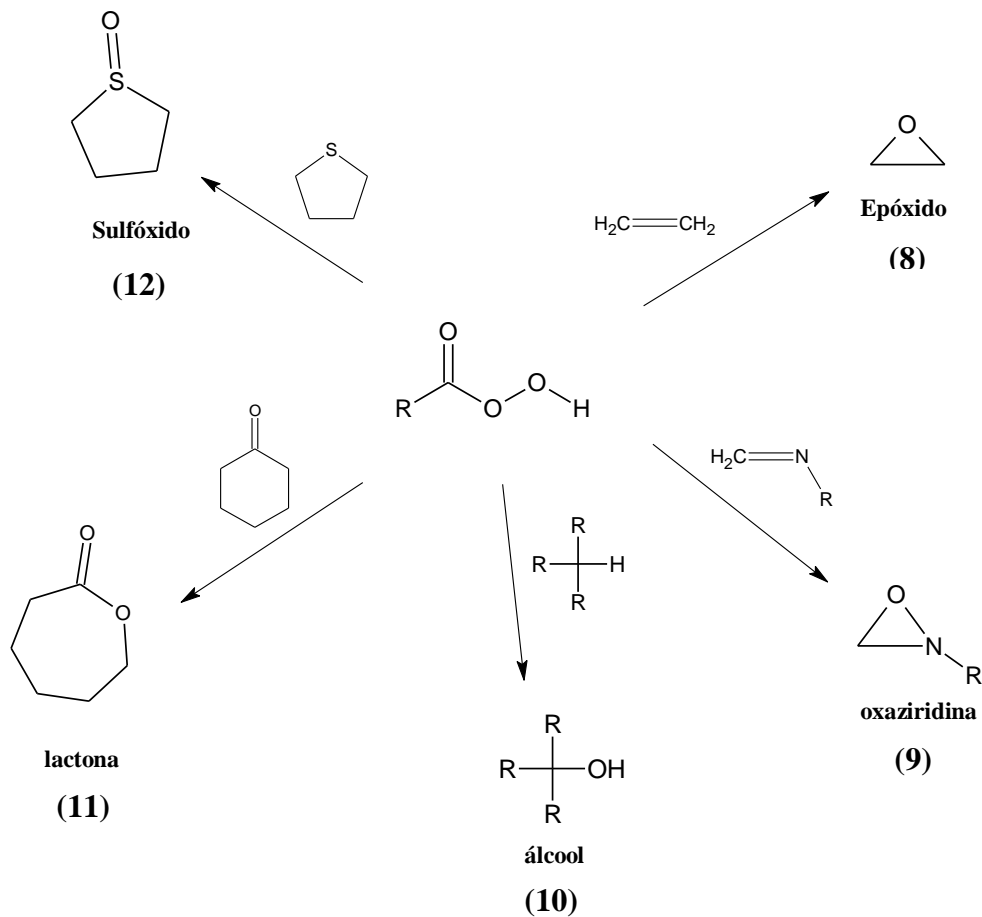
## 2.8. Peroxiácidos

Os peróxi-ácidos (**7**) (ou perácidos) são ácidos que possuem um grupamento peróxido.<sup>25</sup>



Estes compostos são agentes oxidantes importantes em síntese orgânica assim como na indústria química. A oxidação mais comum, promovida pelos perácidos é a de ligações C=C e C=N para formar epóxidos (**8**) e oxaziridinas (**9**) respectivamente. São também amplamente utilizados em numerosas oxidações

de hidrocarbonetos catalisadas por metais de transição<sup>27</sup> e/ou microorganismos<sup>28</sup>, formando álcoois **(10)** na obtenção de lactonas **(11)** (oxidação de Baeyer-Villinger)<sup>25,26</sup> e oxidações de compostos sulfurados<sup>29</sup>, formando sulfóxidos **(12)**. **(Figura 10)**.



**Figura 10.** Usos de perácidos em processos de síntese orgânica.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Preparar e caracterizar iminas com diferentes substituintes e utilizar alguns destes substratos em reações de oxidação por método químico-enzimático para a obtenção de oxaziridinas.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Preparar, purificar e caracterizar por técnicas espectrométricas de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN-<sup>1</sup>H), além de ponto de fusão, N-alkil iminas (Bases de Schiff) derivadas da *t*-butilamina e de aldeídos, com diferentes substituintes no anel aromático.
- ✓ Preparar, purificar e caracterizar por técnicas espectrométricas de IV e RMN-<sup>1</sup>H e ponto de fusão a imina derivada do cinamaldeído e anilina.
- ✓ Utilizar as iminas preparadas na formação de oxaziridinas por métodos químico-enzimático usando as lipases de *Candida antartica* (CALB) e *Pseudomonas* sp (LPS) para a formação de ácido peroctanóico.
- ✓ Otimizar os parâmetros que afetam diretamente a formação de oxaziridinas tais como a procedência da lipase, massa e reutilização de lipases, temperatura e solvente orgânico .
- ✓ Caracterizar as oxaziridinas obtidas por diferentes técnicas de análise, tais como IV, RMN-<sup>1</sup>H e cromatografia gasosa (CG).
- ✓ Comparar os resultados obtidos com os trabalhos publicados na literatura.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Reagentes solventes e enzimas utilizados:

Os reagentes utilizados neste trabalho foram:

- ✓ Acros: uréia peróxido de hidrogênio (UHP)
- ✓ Aldrich: *p*-anisaldeído, *p*-nitro-benzaldeído, *o*-nitro-benzaldeído, *m*-nitro-benzaldeído, *p*-cianobenzaldeído, metil-benzaldeído,
- ✓ Fluka: *t*-butilamina, cinamaldeído
- ✓ F.Maia: *n*-hexano, éter etílico
- ✓ Grupo Química: ácido acético, acetato de etila, etanol absoluto.
- ✓ Nuclear: sulfato de magnésio
- ✓ Quimex: etanol
- ✓ Tedia: metil-*t*-butil éter, clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>).
- ✓ Vetec: benzaldeído, acetonitrila, anilina, ácido octanóico, diclorometano, sílica gel 60.
- ✓ Lipase: lipase de *Candida antarctica* B, absorvida em resina macroporosa (CALB, Novozym 435- 10.000 PLU/g), doada pela Novozymes Inc.<sup>30</sup>  
lipase de *Pseudomonas* sp (LPS) atualmente denominada de *Burkholderia cepacia* sp (23,000U/g) doada pela Amano Co.<sup>31</sup>

### 4.2. Equipamentos

As reações para obtenção das iminas foram realizadas com o auxílio de um sistema de refluxo. Para obtenção de diferentes oxaziridinas foi utilizado um agitador tipo orbital da Technal-TE053 com temperatura controlada. Os reagentes e os produtos obtidos foram caracterizados por técnicas espectrométricas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-<sup>1</sup>H), infravermelho (IV) e ponto de fusão. Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-<sup>1</sup>H) foram obtidos em um espectrômetro Varian (400MHz), utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS,  $\delta = 0,00$  ppm), e CDCl<sub>3</sub> como solvente. As análises de infravermelho (IV) foram feitas em um espectrofotômetro da Perkin Elmer FTIR 16PC.



A determinação do ponto de fusão dos reagentes e produtos foi feito em um aparelho Micro Química APF 301. As reações foram acompanhadas por cromatografia gasosa em um cromatógrafo GC-14B Shimadzu com coluna capilar Shimadzu (CBP-5-M25-025m). Os parâmetros que foram utilizados nas análises estão apresentados na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Parâmetros experimentais usados nas análises de cromatografia gasosa.

| Parâmetros                                 |           |
|--|-----------|
| Temperatura Inicial                        | 70 °C     |
| Temperatura Final                          | 250 °C    |
| Taxa de Aquecimento                        | 10 °C/min |
| Injetor: split 200                         | 280 °C    |
| Detector: FID                              | 290 °C    |
| Pressão do gás carreador (H <sub>2</sub> ) | 75kPa     |
| Volume da Amostra                          | 1µL       |

#### 4.3. Procedimento geral para a preparação de iminas (bases de Schiff)

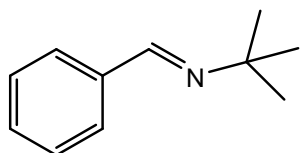
As iminas foram preparadas conforme metodologias já descritas na literatura através da reação de condensação de aldeídos e aminas primárias sob condições de refluxo. Dependendo da reatividade da carbonila e amina, estas foram obtidas a temperatura ambiente<sup>19</sup>.

A formação do produto, bem como a pureza foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (ccd) utilizando como eluente a mistura de *n*-hexano: acetato de etila (7:3 ou 5:5 v/v). Ao final da reação a mistura foi filtrada por gravidade, adicionado sulfato de magnésio anidro para eliminar água residual. Em seguida o solvente foi evaporado no rota-evaporador para os compostos líquidos a temperatura ambiente. Os produtos obtidos foram caracterizados por infravermelho, RMN-<sup>1</sup>H e CG e pela determinação de ponto de fusão.

Neste trabalho foram utilizadas outras metodologias alternativas, tais como a síntese em fase sólida com sílica e alumina, peneira molecular e ultrassom. A seguir, serão apresentadas as iminas que foram preparadas e os dados espectroscópicos de IV, RMN<sup>1</sup>-H e CG que comprovam a obtenção das mesmas.

Os dados espectrométricos foram comparados com os reportados na literatura.<sup>32</sup>

✓ ***N*-benziliden-*t*-butilamina (13)**



**C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N**

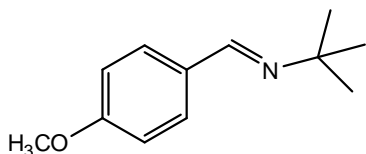
**MM= 161,26g/mol**

**IV(cm<sup>-1</sup>):** 2989,1637,1594,1386,723

**RMN <sup>1</sup>H (ppm):** 8,27 (s,1H); 7,38-7,73 (m,5H); 1,31 (s,9H).

**CG, tempo de retenção (min):** 5,50

✓ ***p*-metoxi-*N*-benziliden-*t*-butilamina (14)**



**C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>ON**

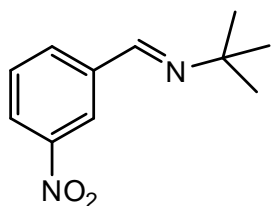
**MM=191,29g/mol**

**IV(cm<sup>-1</sup>):** 2970, 2880, 1713, 1647,1523, 851, 749

**RMN <sup>1</sup>H (ppm):** 8,17 (s,1H); 7,62 (d, J= 8,8 Hz 2H); 3,82 (s,3H); 1,22 (s,9H)

**CG, tempo de retenção (min):** 14.63

✓ ***m*-nitro-*N*-benziliden-*t*-butilamina (15)**



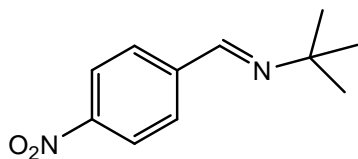
**C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>**

**MM= 206,25g/mol**

**IV (cm<sup>-1</sup>):** 2971, 1639, 1525, 1350, 1161, 1067, 830

**RMN <sup>1</sup>H (ppm):** 8,59(s,1H); 8,33(d, J= 8,0 Hz 2H); 8,10-8,11 (d, J= 8,0 Hz) 2H); 8,09(dd, 1H); 1,32(s,9H)

✓ ***p*-nitro-*N*-benziliden-*t*-butilamina (16)**



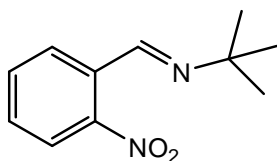
**C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>**  
**MM=206,25g/mol**

**IV (cm<sup>-1</sup>):** 2978, 1644, 1600, 1524, 1344, 1199, 1108, 859

**RMN <sup>1</sup>H (ppm):** 8,33(s, 1H); 8,24(d, J = 8,4 Hz, 2H); 7,91(d, 8,4 Hz 2H); 1,31(s, 9H)

**CG, tempo de retenção (min):** 11.5

✓ ***o*-nitro-*N*-benziliden-*t*-butilamina (17)**



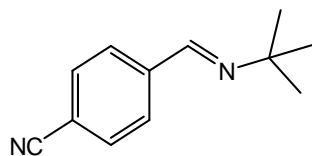
**C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>**  
**MM=206,25g/mol**

**IV(cm<sup>-1</sup>):** 2973, 1634, 1610, 1574, 1348, 1198, 1138, 859

**RMN <sup>1</sup>H(ppm):** 8,58 (s,1H); 7,93-7,91(d, J= 8,0 Hz 2 H); 7,59-757(d, J= 8,0 Hz 2H); 1,26 (s,9H)

**CG, tempo de retenção (min):** 10,27

✓ ***p*-ciano-*N*-benziliden-*t*-butilamina (18)**



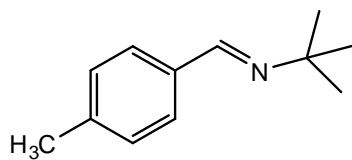
**C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>**  
**MM=186,26g/mol**

**IV(cm<sup>-1</sup>):** 2970, 1640, 1367, 1205, 824

**RMN <sup>1</sup>H (ppm):** 8,29 (s,1H), 7,87 (d, J= 8,8 Hz 2H), 7,71 (d, J= 8,8 Hz 2H), 1,32 (s, 9H)

**CG, tempo de retenção (min):** 10,0

✓ ***p*-metil-*N*-benziliden-*t*-butilamina (19)**



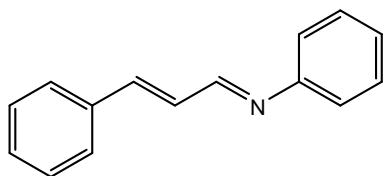
**C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>N**  
**MM= 175,29g/mol**

**IV(cm<sup>-1</sup>):** 2968, 1703, 1668, 1609, 1202, 813

**RMN-<sup>1</sup>H (ppm):** 8,25 (s, 1H), 7,78(d, J= 8,0 Hz 2H), 7,63(d, J= 8,0 Hz 2H), 1,30(s, 9H)

**CG, tempo de retenção (min):** -----

✓ **N-cinemalidenanilina (20)**



**C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N**  
**MM=207,28g/mol**

**IV(cm<sup>-1</sup>):** 3050, 1625, 1573, 1450, 1152, 996, 755

**RMN <sup>1</sup>H (ppm):** 8,28 (dd,1H), 7,56-7,53 (m,5H),  
7,40-7,36 (m,5H), 7,19 (d,1H), 7,14 (d,1H)

**CG, tempo de retenção (min):** 10,18.

#### 4.4. Procedimento geral para a preparação de oxaziridinas

Com objetivo de minimizar a hidrólise das iminas no meio reacional, foram utilizados 10 ou 20 mL de acetonitrila, previamente tratada com peneira molecular ativada. Foram usados 0,5 ou 1,0 ou 2,0 mmol das iminas (**15-19**) juntamente com 1,5 ou 3,0 mmol de uréia peróxido de hidrogênio (UHP) e 1 ou 2 mmol de ácido octanóico e 10, 30, 50 mg ou 60 mg de lipase de *Candida antarctica* B (CALB) ou 30 mg de *Pseudomonas* sp (LPS). Esse mesmo procedimento foi utilizado para a oxidação da imina (**20**).

O sistema foi mantido a temperatura ambiente (25 ou 35 °C) com agitação constante em agitador do tipo orbital TE-053. Após tempos pré-estabelecidos de reação, a enzima foi retirada por gravidade e a fase orgânica extraída com 30 mL de diclorometano e 30 mL de água. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro, e em seguida filtrada e evaporada em rota evaporador.

Para o cálculo da conversão em oxaziridina, através da reação químio-enzimática, foram retiradas alíquotas em tempos pré-estabelecidos e analisadas por CG e RMN-<sup>1</sup>H. Os dados espectrométricos foram comparados com os citados na literatura.<sup>32</sup>

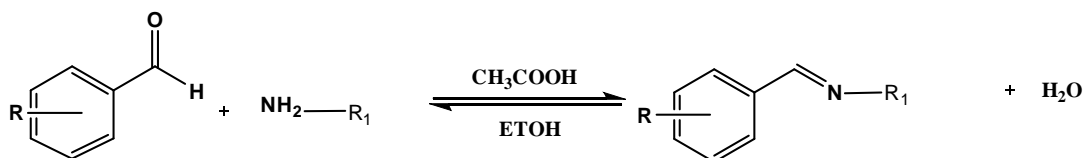
## 5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, realizou-se inicialmente a preparação de bases de Schiff derivadas da *t*-butilamina com diferentes grupos substituintes no anel do benzaldeído. Foi também preparada uma base de Schiff derivada do cinamaldeído. As iminas *o*-nitro-*N*-benzilden-*t*-butilamina, *m*-nitro-*N*-benzilden-*t*-butilamina, *p*-nitro-*N*-benzilden-*t*-butilamina, *p*-ciano-*N*-benzilden-*t*-butilamina e *p*-metil-*N*-benzilden-*t*-butilamina foram utilizadas como substratos na reação de oxidação *via* quimio-enzimática para formação das correspondentes oxaziridinas.

Primeiramente, serão abordados os resultados relacionados à preparação das bases de Schiff e em seguida os dados relativos à reação de oxidação para obter as oxaziridinas.

### 5.1. Preparação de iminas

As bases de Schiff derivadas de benzaldeídos substituídos ou não (**13-19**), e da *t*-butilamina foram obtidas utilizando ácido acético como catalisador e etanol absoluto como solvente. A *p*-metoxi-*N*-benzilden-*t*-butilamina foi preparada em refluxo por um período de 192 horas enquanto a imina *o*-nitro-*N*-benzilden-*t*-butilamina 24 h, a *m*-nitro-*N*-benzilden-*t*-butilamina precisou de 8 h e a *p*-ciano-*N*-benzilden-*t*-butilamina de 12 h de refluxo. As *p*-nitro-*N*-benzilden-*t*-butilamina, *N*-benzilden-*t*-butilamina e a *N*-cinemalidenanilina foram obtidas a temperatura ambiente. A **Figura 11** mostra a equação para a obtenção destas iminas.



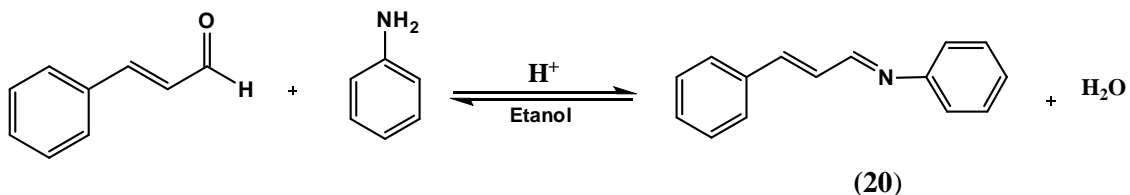
R= H (**13**); R= *p*-OCH<sub>3</sub> (**14**); R= *m*-NO<sub>2</sub> (**15**); R= *p*-NO<sub>2</sub> (**16**); R= *o*-NO<sub>2</sub> (**17**); R= *p*-CN (**18**); R= *p*-CH<sub>3</sub> (**19**).

**Figura 11.** Preparação de iminas derivadas de benzaldeídos substituídos.

As bases de Schiff foram obtidas na forma sólida, exceto os compostos (**14**), (**17**) e (**19**) que foram obtidos na forma de óleo. Os rendimentos variaram de

5-95%. As iminas **(13)**, **(16)** e **(20)** foram obtidas instantaneamente a **(15)** foi obtida após 8 dias de refluxo. Os pontos de fusão obtidos experimentalmente foram comparáveis com os citados na literatura. Por cromatografia de camada delgada os compostos apresentaram apenas uma mancha comprovando a pureza dos compostos sintetizados. Foram também utilizadas outras metodologias tais como a síntese em fase sólida com sílica, alumina e uso de peneira molecular, porém os rendimentos não foram satisfatórios. Um outro método utilizado para preparar a imina **(13)** foi com a técnica de ultrassom, mas após três minutos de reação este composto não foi obtido. Esta metodologia foi recentemente reportada na literatura.<sup>33</sup>

A base de Schiff derivada do cinamaldeído **(20)** e anilina foi preparada a temperatura ambiente utilizando etanol e ácido acético como catalisador. A **Figura 12** mostra a equação para a reação de formação da cinemalidenanilina.



**Figura 12.** Preparação da N-cinmalidenanilina.

Os dados analíticos e espectrométricos das N-alkil iminas serão apresentados a seguir, juntamente com a base de Schiff derivada do cinamaldeído. (**Tabela 2**)

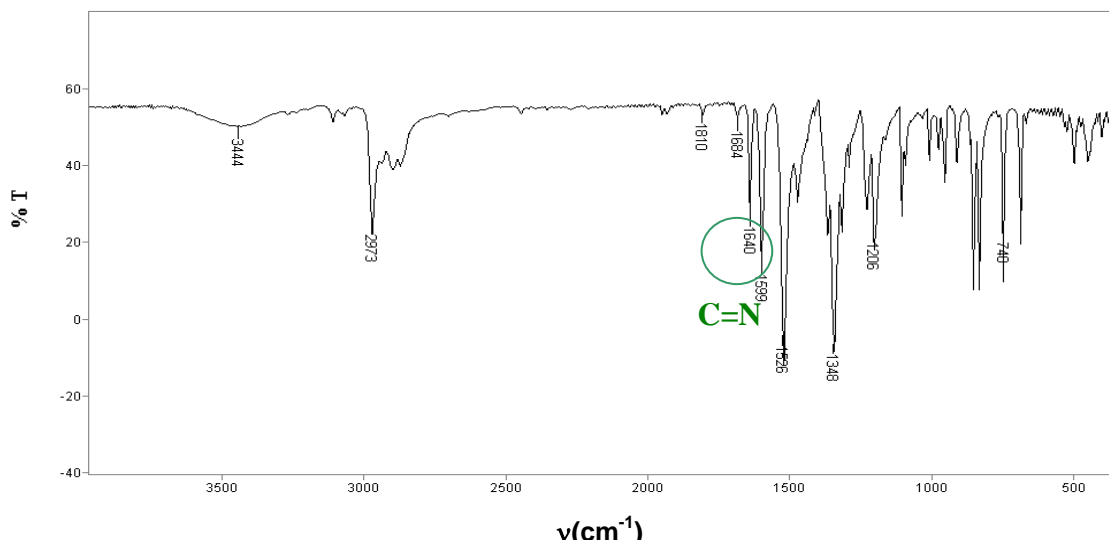
**Tabela 2.** Dados analíticos e espectroscópicos das bases de Schiff **13-20**

| Iminas | Tempo de reação (h) | Rendimento (%) | pf (°C) (pf lit)                   | IV(cm <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup><br>νC=N | RMN <sup>1</sup> H (δ ppm) <sup>b</sup><br>H-C=N | Rf <sup>c</sup> |
|--------|---------------------|----------------|------------------------------------|--|--|-----------------|
| 13     | 0                   | 24,8           | 170-173<br>(174-175) <sup>22</sup> | 1637                                       | 8,27   | 0,21            |
| 14     | 192                 | 5,0            | óleo                               | 1647                                       | 8,34   | 0,54            |
| 15     | 8                   | 81,0           | 62-65*                             | 1638                                       | 8,33   | 0,27            |
| 16     | 0                   | 95,0           | 71-73(73-75) <sup>23</sup>         | 1640                                       | 8,34   | 0,25            |
| 17     | 24                  | 90,0           | óleo                               | 1634                                       | 8,58   | 0,24            |
| 18     | 12                  | 60,0           | 55-57*                             | 1640                                       | 8,29   | 0,19            |
| 19     | 90                  | 43,0           | óleo                               | 1668                                       | 8,25   | 0,49            |
| 20     | 0                   | 65,4           | 102(106-108) <sup>24</sup>         | 1625                                       | 8,45   | 0,31            |

\*não foi encontrado na literatura; (a)-filme ou pastilha de KBr; (b)-CDCl<sub>3</sub>;(c) n-hexano:acetato de etila 5.5

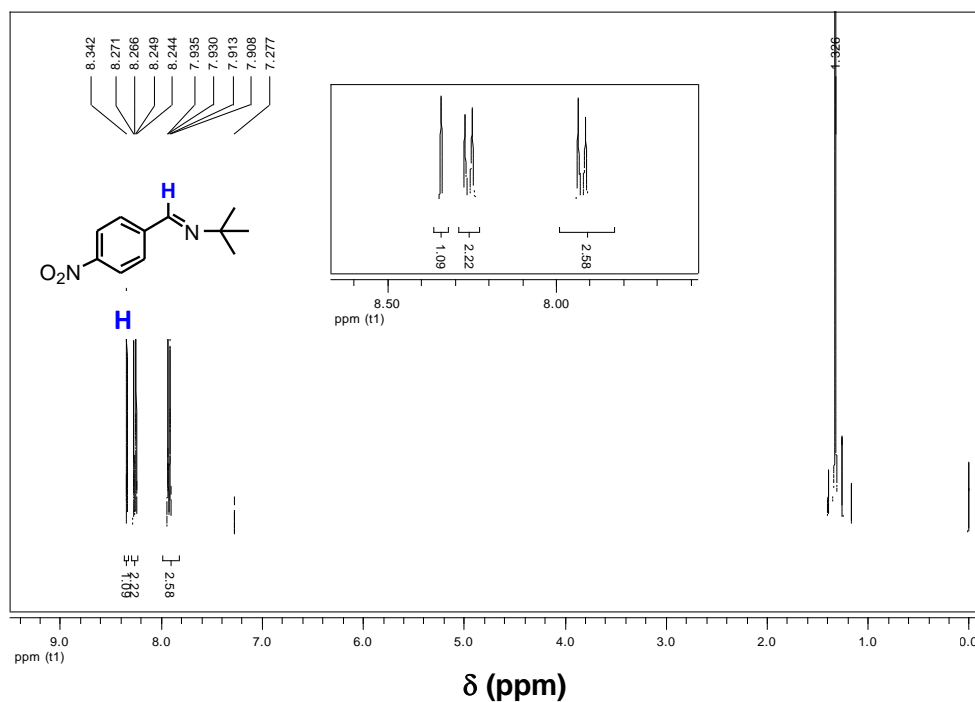
Através de análises espectroscópicas de IV e RMN-<sup>1</sup>H foi possível também comprovar a obtenção destes compostos. Por exemplo, no espectro de infravermelho, foi observada a banda característica da ligação C=N na região de 1625-1668 cm<sup>-1</sup>e no espectro de RMN-<sup>1</sup>H foi observado para todos os compostos o pico característico do próton imínico em aproximadamente 8,2-8,6 ppm, sendo concordantes com dados reportados na literatura.<sup>32</sup>

Na **Figura 13** é apresentado o espectro de IV da *p*-nitro-*N*-benziliden-*t*-butilamina. Em 1640 cm<sup>-1</sup> pode-se observar a banda referente ao estiramento da ligação C=N.



**Figura 13.** Espectro de IV da imina *p*-nitro-*N*-benziliden-*t*-butilamina (**16**) (KBr).

Na **Figura 14** é apresentado o espectro de RMN-<sup>1</sup>H da *p*-nitro-*N*-benziliden-*t*-butilamina (**16**). Em 8,34 ppm pode ser observado o pico correspondente ao próton imínico.

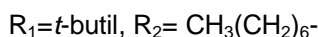
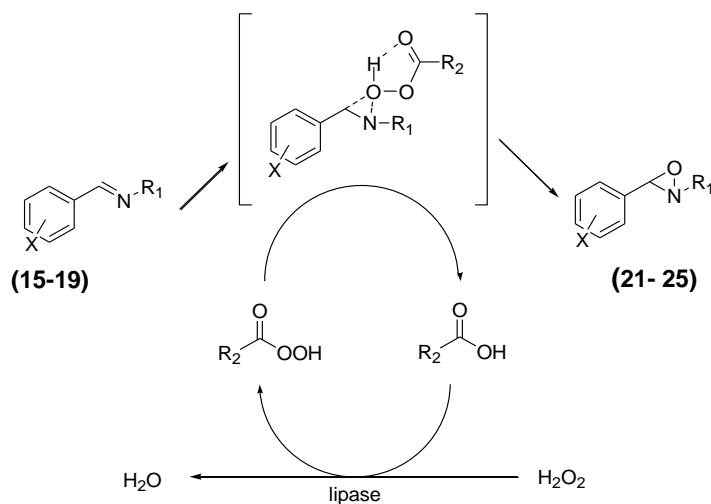


**Figura 14.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H da *p*-nitro-*N*-benziliden-*t*-butilamina (**16**) [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>].

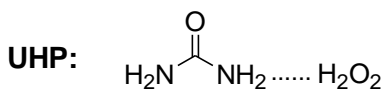


## 5.2. Preparação das oxaziridinas

Nos estudos iniciais foi utilizado *o*-nitro, *m*-nitro, *p*-nitro-*N*-benzilden-*t*-butilamina, *p*-ciano-*N*-benzilden-*t*-butilamina e *p*-metil-*N*-benzilden-*t*-butilamina como substratos para a preparação das correspondentes oxaziridinas com uréia peróxido de hidrogênio (UHP), ácido octanóico e as lipases de *Candida antarctica* (CALB) e de *Pseudomonas* sp (LPS), em acetonitrila. O sistema foi mantido a temperatura ambiente com agitação constante, e foram retiradas alíquotas em tempos pré-estabelecidos para análises por RMN-<sup>1</sup>H. O mecanismo químico-enzimático para obtenção das oxaziridinas está apresentada na **Figura 15**.

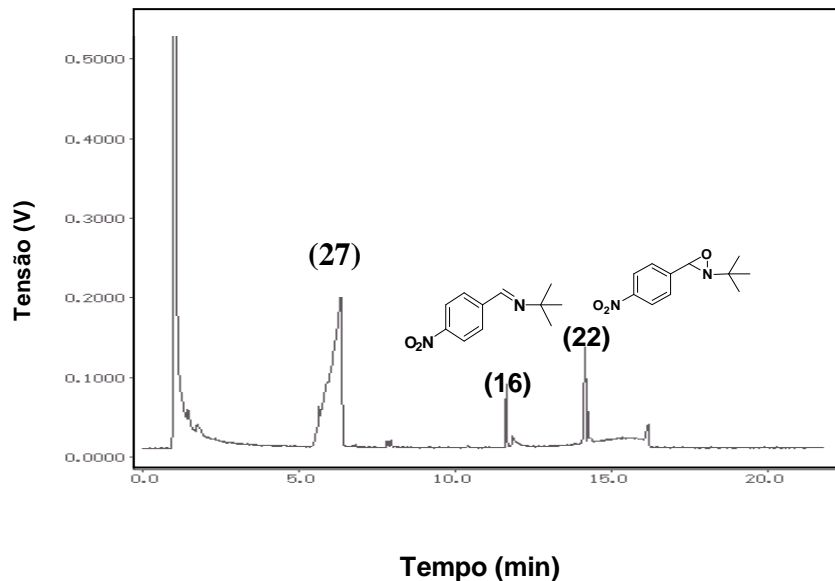


X = *m*-NO<sub>2</sub> (15 e 21); *p*-NO<sub>2</sub> (16 e 22); *o*-NO<sub>2</sub> (17 e 23); *p*-CN (18 e 24); *p*-CH<sub>3</sub> (19 e 25)



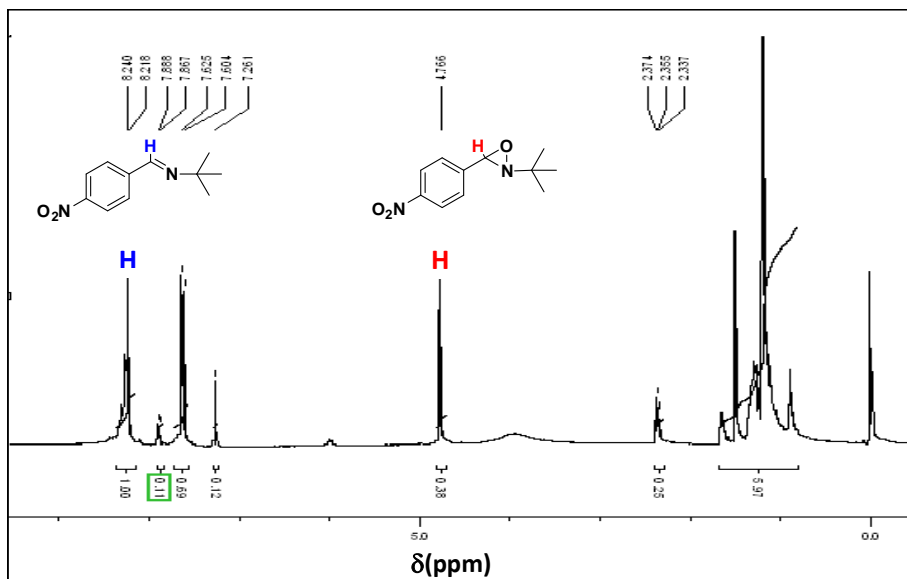
**Figura 15.** Preparação químico-enzimática de oxaziridinas.

Para um estudo mais detalhado serão apresentados um cromatograma (**Figura 16**) e o espectro de RMN-<sup>1</sup>H (**Figura 17**) obtido de uma alíquota da reação químico-enzimática para a formação da 3-(4-nitrofenil)-2-*t*-butil-oxaziridina (**22**).



**Figura 16.** Cromatograma de uma alíquota da reação *via* químico-enzimática da *p*-nitro-*N*-benzilden-*t*-butilamina (**16**) catalisada pela CALB na presença de ácido octanóico (**27**) e UHP para formar a 3-(4-nitrofenil) 2-*t*-butil-oxaziridina (**22**). [acetonitrila, 24 h, t.ambiente. Conv. 52%]

Conforme mencionado na **Figura 17** é apresentado o espectro de RMN-<sup>1</sup>H de uma alíquota da reação de formação da 3-(4-nitrofenil) 2-*t*-butil-oxaziridina (**22**). Em 4,76 ppm observa-se o pico referente ao hidrogênio do anel da oxaziridina, e em 8,26 ppm o do hidrogênio da imina.



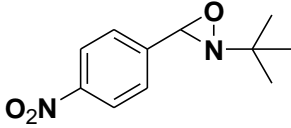
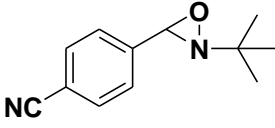
**Figura 17.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de uma alíquota da reação de formação da 3-(4-nitrofenil)-2-*t*-butil-oxaziridina. [CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz] [acetonitrila, 2 h, t.ambiente. 27%]

Neste trabalho avaliou-se a influência da procedência da lipase, da massa de CALB, reutilização do biocatalisador, temperatura, solvente orgânico e a dos grupos substituintes na formação quimio-enzimática de oxaziridinas.

### 5.3. Influência da lipase na formação das oxaziridinas 22 e 24

Nos estudos iniciais foram utilizadas as iminas e *p*-nitro-*N*-benziliden-*t*-butilamina (**16**) e a *p*-ciano-*N*-benziliden-*t*-butilamina (**18**) como substrato para a preparação das correspondentes oxaziridinas utilizando as condições experimentais já descritas anteriormente. Para fins de comparação, utilizaram-se duas lipases: a CALB e a LPS. As conversões obtidas estão apresentadas na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Formação quimio-enzimática de oxaziridinas em função da lipase utilizada.<sup>(a)</sup>

| Tempo (h) | Conversão (%)   |     |   |     |
|-----------|---|-----|---|-----|
|           |  |     |  |     |
|           | CALB  | LPS | CALB  | LPS |
| 0         | 22  | 6   | 38  | 14  |
| 1         | 34  | < 5 | 56  | 11  |
| 2         | 57  | < 5 | 74  | < 5 |
| 5         | >99   | < 5 | 79  | < 5 |

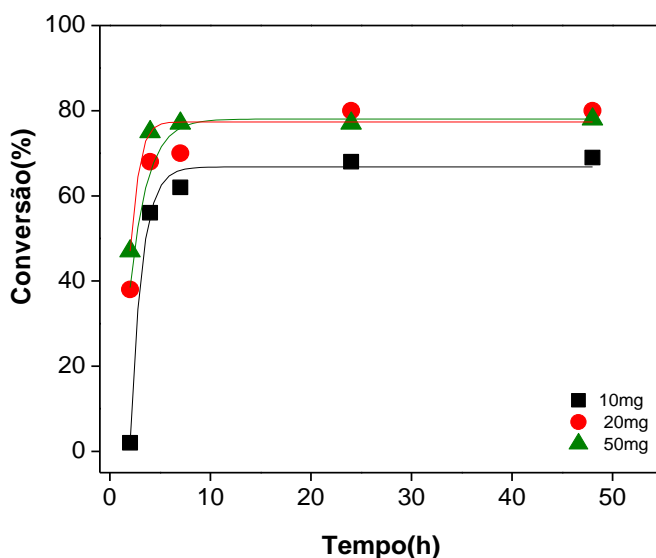
(a) 30mg, temperatura ambiente (~25°C), acetonitrila; conv determinadas por RMN H<sup>1</sup>

De acordo com os dados apresentados na **Tabela 3**, pode-se observar que as maiores conversões foram obtidas com a CALB utilizando ambos substratos. Com o substrato **(16)** as conversões foram de >99 e <5% e com o **(18)** as conversões foram de 79 e < 5 % respectivamente com a CALB e LPS após 5h de reação. Estes resultados mostram que a CALB foi mais efetiva na preparação de perácidos *in situ* e conseqüentemente na formação de oxaziridinas.

Resultados similares foram obtidos na obtenção de oxaziridinas derivadas da N-benzilden-2-etilhexilaminas.<sup>2</sup>

#### 5.4. Influência da massa de CALB na formação da oxaziridina 22

Para verificar se a quantidade do biocatalisador influencia na conversão em oxaziridinas foi feito um estudo para otimizar a massa de lipase, ou seja, qual a quantidade mínima que pode ser usada para obter os produtos com boas conversões. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 18**.



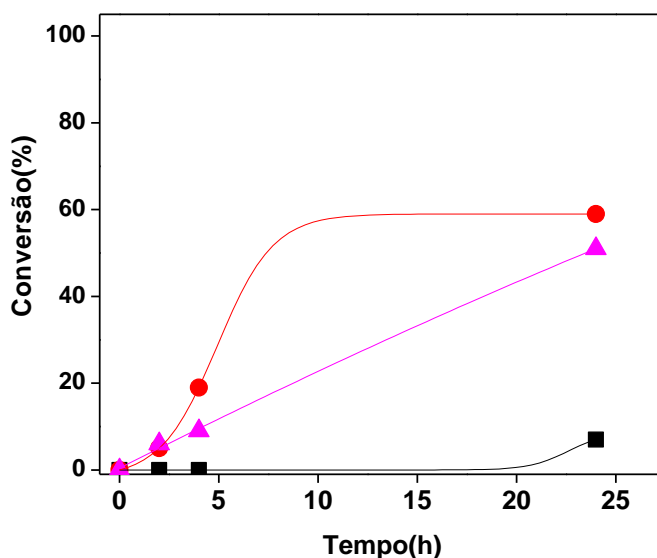
**Figura 18.** Influência da massa da CALB 10 mg (■), 30 mg (●), 50 mg (▲) e do tempo na reação químico-enzimática da imina (**16**). [1 mmol ácido octanóico, 1,5 mmol UHP, 25 °C, acetonitrila].

Os resultados obtidos mostram que a conversão na oxaziridina (**22**) foi dependente da massa de CALB e do tempo de reação. Utilizando 10 mg, após 8 h a conversão foi de 60%, e manteve-se constante até um período de 48 h. Ao utilizar 30 ou 50 mg de CALB, após 7 h as conversões foram de 70 e 77 % sendo que após este tempo manteve-se constante na faixa de 80%. Estes resultados são satisfatórios, pois mostram que a oxaziridina (**22**), pode ser obtida em condições brandas de reação e massa relativamente pequena do biocatalisador. Foi feito outro estudo dobrando a quantidade de todos os reagentes e utilizando-se 60mg de CALB os resultados mostraram que após 2 h de reação a conversão

foi de 52% e com 5 h de reação às conversões se mantiveram constante em aproximadamente 99%.

### 5.5. Influência da massa de CALB na reutilização do biocatalisador

Visando avaliar a eficiência da CALB, o biocatalisador foi reutilizado nas mesmas condições anteriores na obtenção da oxaziridina (**22**) e os resultados obtidos encontram-se na **Figura 19**.



**Figura 19** Influência da massa de CALB 10 mg (■), 30 mg (●), 50 mg (▲) e do tempo na reação químico-enzimática da imina (**16**), na primeira reutilização do biocatalisador. [1mmol ácido octanóico, 1,5 mmol UHP, t. ambiente, acetonitrila].

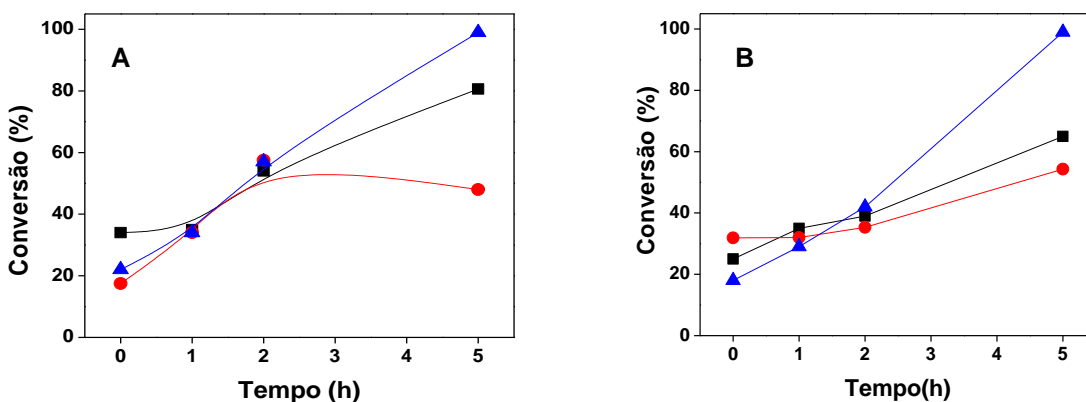
Os resultados mostram que houve uma diminuição na conversão a correspondente oxaziridina (**16**), após a primeira utilização da CALB. A perda da atividade foi mais evidenciada ao utilizar 10 mg, onde observou-se após 24 h de reação a formação de apenas 7% do produto. Ao utilizar 30 e 50 mg, as conversões foram maiores, sendo de 59 e 51% após 24 h, mas menores quando comparadas com a primeira utilização. Estes resultados podem ser explicados considerando que a atividade da CALB pode ter diminuído após ficar em contato com o agente oxidante. Resultados similares já foram reportados na literatura ao

utilizar peróxido de hidrogênio para a obtenção de epóxidos derivados do ciclohexeno.<sup>26</sup>

## 5.6. Influência da temperatura

O efeito da temperatura em reações mediadas por enzimas está fundamentado em dois aspectos. O primeiro, é que com o aumento da temperatura, em geral, ocorre um aumento da velocidade reacional e isto pode ser explicado pela teoria de Arrhenius que se baseia na hipótese de que duas partículas devem colidir na orientação correta e com energia cinética suficiente para que os reagentes sejam transformados em produtos.<sup>34</sup>

O segundo é que as enzimas possuem uma temperatura ótima na qual a sua atividade é máxima, sendo que uma variação pode causar a desnaturação da mesma e com conseqüência a diminuição e/ou a perda da atividade catalítica.<sup>35</sup> Para analisar a influência da temperatura na conversão das iminas **(15)**, **(16)**, **(17)** nas respectivas oxaziridinas foi feito um estudo da influência da temperatura, os resultados obtidos encontram-se na **Figura 20**.



**Figura 20.** Influência da temperatura 25 °C **A** e 35 °C **B**, nas reações químio-enzimática das iminas, **(15)** *m*-nitro (●), **(16)** *p*-nitro (▲), **(17)** *o*-nitro (■). [2 mmol de substrato, 3 mmol ácido octanóico, 3,0 mmol UHP, 35 °C, acetonitrila].

Os resultados mostraram que a 25 °C as maiores conversões em oxaziridinas foram obtidas com as iminas com os substituintes na posições *orto* **(17)** e *para* **(16)**, sendo de 81 e 99% em 5h, respectivamente. Com o substituinte

na posição *meta* (**15**) a conversão em produto foi de 48% em 5 h. A 35 °C, as maiores conversões também foram obtidas com o isômero *para* (**16**) sendo de 99% em 5 h. Com isômeros *meta* e *orto*-nitro, as conversões ao produto foram de 54 e 65% em 5 h. Esta diminuição da conversão em oxaziridina com o aumento da temperatura mostra que a lipase pode sofrer desativação térmica como descrito na literatura por Castro e *col.* que sintetizaram o butirato de *n*-butila utilizando lipase de *Candida rugosa* imobilizada em diversos polímeros. Os autores verificaram que com o aumento da temperatura aumentava a taxa de desativação térmica da lipase reduzindo a taxa de formação de produto fazendo com que a conversão em 24 h fosse reduzida de 89% a 37 °C para 57%, 31% e 6% em 45, 50, 60 °C respectivamente.<sup>36</sup>

### 5.7. Influência do efeito do solvente

Os critérios mais importantes para a seleção do solvente orgânico em reações catalisadas por enzimas, é a alta capacidade de solubilizar tanto o produto como o substrato, bem como a biocompatibilidade. Entretanto outras características são desejáveis tais como estabilidade química e térmica, baixa tendência de formar emulsão com água, baixa periculosidade no manuseio e preços baixos.<sup>37</sup>

O parâmetro mais frequentemente utilizado para classificar os solventes em termos de biocompatibilidade é o  $\log P$ , que é definido como logaritmo do coeficiente de partição do solvente no sistema octanol/água. Segundo Laane e *col.* Os solventes que possuem  $\log P \leq 2$  são hidrofílicos, não sendo adequados para biocatálise porque alteram fortemente a interação água/biocatalisador, tornando-o inativo ou ocasionando a desnaturação. Os solventes com  $\log P$  entre 2 e 4 são também hidrofílicos, mas perturbam menos a interação água/biocatalisador. Os solventes com  $\log P$  acima de 4 são hidrofóbicos, não alteram estas interações e deixam o biocatalisador no seu estado ativo.<sup>38</sup> Na **Tabela 4** é apresentado a formação da 3-(4-nitrofenil) 2-*t*-butil-oxaziridina em função do solvente.



**Tabela 4.** Formação da 3-(4-nitrofenil) 2-*t*-butil-oxaziridina (**22**) em função do solvente.

| <b>Solvente</b>        | <b>Log <i>P</i></b> | <b>Conversão (%)</b> |
|------------------------|---------------------|----------------------|
| <b>acetonitrila</b>    | -0,33               | 57                   |
| <b>etanol</b>          | -0,24               | <5                   |
| <b>éter etílico</b>    | 0,85                | nd                   |
| <b>MTBE</b>            | 1,43                | 55                   |
| <b><i>n</i>-hexano</b> | 3,5                 | <5                   |

nd-não detectado

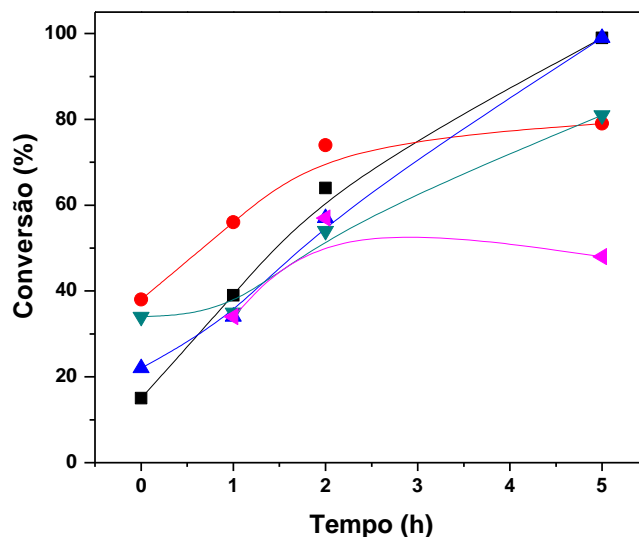
Os resultados obtidos em 2 h de reação mostraram que as conversões a oxaziridina (**22**), não apresentaram relação direta com os valores de log *P*. Tal fato pode ocorrer pois as interações enzima/substrato/solvente podem ser favorecidas ou não. Por isso, não há apenas um fator que determine a eficiência dessa reação em função do solvente empregado.

Ao utilizar a acetonitrila e o MTBE obteve-se as maiores conversões, sendo de 57 e 55%, respectivamente. Estes resultados não estão de acordo com a regra de Laane e *col.*<sup>38</sup>

Deve-se considerar também a solubilidade do substrato (**16**) em diferentes solventes, sendo este pouco solúvel em *n*-hexano e éter etílico, com conversões em oxaziridina (**22**) <5%. Utilizando etanol a conversão foi também < 5%, e este último resultado pode ser explicado considerando a alta polaridade do etanol e uma possível desnaturação da CALB pelo solvente, além deste ser um solvente prótico.

## 5.8. Influência dos diferentes grupos substituintes

Visando verificar a influência dos grupos retiradores e doadores de elétrons foi feito um estudo com as iminas (**15-19**) nas mesmas condições experimentais descritas anteriormente. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 21**.



**Figura 21.** Influência dos grupos substituintes na reação quimio-enzimática das iminas, **(21)** *m*-nitro (◀), **(22)** *p*-nitro (▲), **(23)** *o*-nitro (▼), **(24)** *p*-ciano (●), **(25)** *p*-metil (■). [2mmol de substrato, 3 mmol ácido octanóico, 3,0 mmol UHP, 25°C, acetonitrila].

Após 5 h de reação as oxaziridinas **(22)** e **(25)** foram obtidas com conversões de 99%. As oxaziridinas **(23)**, **(24)** e **(21)**, foram obtidas com conversões de 81%, 79% e 48%, respectivamente.

Em geral estes resultados são satisfatórios, mas não mostraram uma relação direta com o efeito retirador e/ou doador de elétrons destes grupos substituintes. Porém, foram observadas variações nas conversões em função da posição dos grupos. Por exemplo, com os substituintes nitro nas posições *orto* (81%) e *meta* (48%), as conversões nas correspondentes oxaziridinas foram menores quando comparadas a obtida com o isômero *para* (>99%). Portanto, sugere-se que além dos efeitos eletrônicos, deve-se considerar também os efeitos estéreos. (ver mecanismo na página 22).

## 6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

- ✓ As Bases de Schiff foram obtidas com rendimentos (5-95%), com exceção da imina *p*-metoxi-*N*-benzilden-*t*-butilamina que apresentou rendimento de apenas 5%.
- ✓ No estudo de procedência da lipase, a CALB mostrou-se mais efetiva para obtenção de oxaziridinas **(22)** e **(24)** método químico-enzimático.
- ✓ Na reutilização do biocatalisador os resultados mostraram uma perda significativa na atividade CALB.
- ✓ A temperatura mais adequada para formação de oxaziridinas **(21)**, **(22)**, **(23)** é a 25 °C com 99% de conversão em 5 h.
- ✓ Em relação à influência do solvente as maiores conversões na oxaziridina **(22)** foram obtidas em acetonitrila e MTBE (57 e 55%), respectivamente.
- ✓ Não foi verificada uma relação direta do efeito dos diversos substituintes com as conversões nas correspondentes oxaziridinas. Os maiores valores foram obtidos a partir das iminas **(16)**, **(17)** e **(18)**, sendo de 99, 99 e 81%.
- ✓ O método químico-enzimático, em geral, foi eficiente para a obtenção de oxaziridinas em condições brandas de reação.

## 7. PERSPECTIVAS

- ✓ Preparar outras iminas com diferentes substituintes ligados no anel aromático do aldeído (por. ex, 2,4-di-NO<sub>2</sub> e *p*-F, entre outros) e diferentes aminas alifáticas ou aromáticas (por ex. *sec*-butilamina e anilinas substituídas).
- ✓ Preparar as oxaziridinas com as iminas N-cinemalidenanilina (**20**), *p*-metoxi-N-benziliden-*t*-butilamina (**14**), N-benziliden-*t*-butilamina (**13**).
- ✓ Avaliar outros parâmetros reacionais, tais como, procedência de diferentes lipases, agitação, temperatura, e o uso de outros solventes orgânicos puros e/ou em misturas com líquidos iônicos (LIs).
- ✓ Analisar as possíveis reações de abertura do anel da oxaziridina

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Oliveira, G L; Mantovani, M S. *Quim. Nova*, **2009** v.32, n. 3, p. 742-756.
- 2- Bitencourt, T B; Nascimento, M G. *Green Chemistry*. **2009**, v. 11, p. 209-214.
- 3- Nelson, D L.; Cox, M M Lehninger: Principles of Biochemistry, 3<sup>a</sup> Ed ,Worth Publishers, Cap 8, **2000**.
- 4-Upenberg J; Ohner, N; Norin, M; Hult, K; Kleywegt, G J; Patka, S; waagen, V; Anthonsen, T; Jones, T A; *Biochem.*, v. 34, **1995**, p.16838-16851.
- 5- White A; Philip H; Emil L Smith; Princípios de Bioquímica, 5<sup>a</sup> Ed, Rio de Janeiro, 211, 1976.
- 6-<http://temasdebioquimica.wordpress.com/2008/08/14/sitio-activo-y-ajuste-inducido-en-la-formacion-del-complejo-enzima-substrato/>, acessada em outubro de 2009.
- 7-[http://www.uces.br/ccet/defq/naeq/material\\_didatico/textos\\_interativos\\_34.htm](http://www.uces.br/ccet/defq/naeq/material_didatico/textos_interativos_34.htm), outubro, 2009.
- 8- Villeneuve, P. Muderhwa, J.M. Graille, J. *J. Mol.Catal.B: Enzym.* **2000**, v. 9(4), p. 113-148.
- 9-(a) Faber, K.; Biotransformations in Organic Chemistry, Springer-Verlag, New York, 3<sup>rd</sup> Ed. **1997**. (b) Roberts,S.M., Biocatalysis for fine Chemical Synthesis, John Wiley & Sons , Ltda England, **1999**.
- 10- Sharma, R; Chisti, Y; Banerjee, U. C; *Biotechnol. Adv.* **2001**,v. 19 , p. 627-672.
- 11- Haiki,G D., Rakhit S K., *Biores.Technol.* **2003**, v. 89, p.17- 34.
- 12- Ghanem, A., *Tetrahedron*. **2007**, v. 63, p. 1721-1754.

- 13-(a) Hasan, F; Hameed, A. *Enzym. Microb. Technol.* **2006**, v.39, p. 235-251. (b). Bezbradica, D., Mijin,D., Siler-Marinkovic,S., Knezevic, Z. *J. Mol.Catal. B: Enzym.* **2007**,v. 45, p.97-101.
- 14- Sebrão, D; Silva, V D; Nascimento, M G; Moreira, M A; *Quim.Nova*, **2007**, v.30(5), p. 1182-1187.
- 15- Gotor-Fernández, V., Brieva, R., Gotor, V., *J.Mol.Catal.B:Enzym.* **2006**, v.40, p.111-120.
- 16-<http://www.internationalvitamins.com.br>, acessado em outubro de 2009.
- 17- Dabdoub, M; Bronzel, J L; *Quim. Nova*, **2009**, v. 32(3), p. 776-792.
- 18-(impress) Ozyilmaz, G; Gezer, E; *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **2009** ,doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.04.013.
- 19- (a)-McMurry. J; Química Orgânica, 6ª Ed., São Paulo, Thomson, **2005**. (b)- Vogel, A.I., Química Orgânica. Vols. 2, 3ª Edição, **1975**.
- 20- Emmons, W D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, v. 78, p.608.
- 21- Horner, L; Jurgens, E. *Chem. Ber.*, **1957**,v. 90,p. 2184.
- 22- Mohajer, D; Iranpoor, N; Rezaeifard, A. *Tetrahedron Lett.*, **2004**,v. 45, p.631-634,.
- 23- Salaldino, R., Neri, V., Pellicia, A.R., Mincione, E., *Tetrahedron lett.*, **2003**, v. 59, p. 7403-7408.
- 24- Kraiem, J., Othman, R.B., Hassine, B.B., *C.R.Chem.*, **2004**, v. 7, p.1119-1126.
- 25- Slayden, S W; Liebman, J F.; Sawaki, Y; The Chemistry of Hydroxyl, Ether and Peroxide Groups. ED. Patai, S., Chichester: J. Wiley; **1993**, p. 103-133, 587-656,.
- 26- Hunt, K W.; Grieco, P A.; *Org. Lett.*, **2000**,v. 2, 12, p.1711-1719.

- 27- Murahashi, S; Oda, Y; Komiya, N; Naota, T; *Tetrahedron Lett.* **1994**, v. 35, 43, p. 7953-7956.
- 28- Ricci, L C; Comasseto, J V; Andrade, L H; Capivari, M; Cass, Q B; Porto A L M.; *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, v. 36, (7), p. 937-946.
- 29- Treiber, A.; *J. Org. Chem.* **2002**, v. 67, p. 7261-7266.
- 30- Ficha técnica da lipase de *C. antarctica*. ([www.novozyme.com](http://www.novozyme.com)), acessada em outubro de 2009.
- 31- Ficha técnica da lipase de *Pseudomonas* sp. Amano (<http://www.amanoenzyme.co.jp/aeu/product/medical03.html>), acessada em outubro de 2009.
- 32- Silverstein, R M; Bassler, G C; Morrill, T C Spectrometric Identification of Organic Compounds; 5<sup>a</sup> Ed, John Wiley & Sons Inc, **1991**.
- 33- Guzen, K P; Guarezemini, A S; Órfão, A T G; Cella, R; Pereira, C M P; Stefani, H A; *Tetrahedron Lett.*, **2007**, v. (48), p. 1845-1848.
- 34- March, J. *Advanced organic chemistry reactions, mechanisms, and structure*, 3<sup>a</sup> ed, Wiley-Interscience, **1985**.
- 35- Lee, D X; Xia, W S ; Zang, J L. Enzymatic preparation of chitooligosaccharides by commercial lipase, *Food Chem.*, **2008**, 111, p. 291-295.
- 36- Castro, H F; Alves, G M; Oliveira, P C; Mei, I L H. *Quim.Nova.*, **2000**, v.23(5), p. 632-636.
- 37- Leon, R; Fernandes, P; Pinheiro, H M; Cabral, J M S Whole-cell biocatalysis in organic media, *Enzyme Microb. Technol.*, **1998**, v. 23, p.483-500.
- 38- Laane, C; Boeren, S; Vos, K. et al.; *Biotechnol. Bioeng.*, **1987**, v. 30, p. 81-87.

## **9. ANEXOS – Trabalhos apresentados em congressos**

- 1- 19º Seminário de iniciação científica, PIBIC-UFSC, 2009.
- 2- XVII Encontro de química da região sul, Rio Grande, RS, (trabalho aceito em outubro de 2009)