



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

Tese de Doutorado

**PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE PERÓXI-ÁCIDOS E SUA
UTILIZAÇÃO NA EPOXIDAÇÃO DE TERPENOS**

**Doutorando: Marcelo Alves Moreira
Orientadora: Maria da Graça Nascimento**

Florianópolis, setembro de 2008.

*Aos meus pais e à Giselle
com amor e carinho.*

Agradecimentos

Agradeço à minha família por todo amor e compreensão que recebi durante toda minha vida.

À minha noiva Giselle, pelo amor, carinho e apoio nos momentos difíceis.

À professora Dra. Maria da Graça Nascimento em especial, pela oportunidade e confiança depositadas em mim no decorrer do desenvolvimento deste trabalho, além de sua dedicação e amizade.

Aos meus parceiros de laboratório: Thiago, Damianni, Patrícia, Alexandre, Maria Alice, Aline, Vanessa, Cristiane, Flávia, Rosana, Isabel, Daniel, Geovani, Sandra, Neide, Pedro, Roberto, Rogério, André, Silvia, Ricardo e Maria Amélia pela ajuda no trabalho e pelos incontáveis cafezinhos.

À todos meus amigos (mesmo os mais distantes).

Aos professores e funcionários do Departamento de Química da UFSC.

Ao Jadir e à Graça pela ajuda durante estes anos de pós-graduação.

Ao professor Dr. José Augusto R. Rodrigues do Instituto de Química da UNICAMP, pela disponibilidade do uso do CGEM.

Ao professor Dr. Faruk Nome Aguilera do Departamento de Química da UFSC, pela disponibilidade do uso do CGEM.

Ao professor Dr. Ademir Farias Morel do Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais da UFSC, pela doação de alguns terpenos utilizados neste trabalho.

À Amano e à Novozymes, pela gentileza de ceder-nos as enzimas.

Ao CNPq, à CAPES e a UFSC pelo fornecimento do apoio financeiro, dos equipamentos e do espaço físico necessários para realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

1 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	1
1.1 – Considerações Gerais	1
1.2 – Enzimas	2
1.2.1 – Lipases	14
1.2.2 - Imobilização de Enzimas	25
1.2.2.1 – Reticulação com Reagentes Funcionalizados	29
1.2.2.2 - Imobilização em Suportes Sólidos	30
1.2.2.3 - Sistema Bifásico	32
1.3 – Líquidos Iônicos	35
1.4 – Produtos Naturais	39
1.4.1 – Isoprenóides	39
1.4.2 – Terpenóides	40
1.5 – Epóxidos	43
1.6 – Peróxi-Ácidos	46
1.7 – Epoxidação	47
1.7.1 - Epoxidação Eletrofílica por Perácidos	49
1.7.2 - Epoxidação Nucleofílica	52
1.7.3 - Epoxidação Catalisada por Aminoácidos	54
1.7.4 - Epoxidação Catalisada por Complexos Metálicos	57
1.7.5 - Epoxidação Enzimática de Alcenos	62
1.7.4 - Epoxidação Químio-Enzimática de Alcenos	65
2 – OBJETIVO	69
2.1 - Objetivo Geral	69
2.2 - Objetivos Específicos	69

3 – PARTE EXPERIMENTAL	71
3.1 – Reagentes	71
3.2 Equipamentos	72
3.3 - Determinação da Concentração de Perácido por Titulação Iodométrica	73
3.4 - Determinação da Concentração de Perácido por Titulação Potenciométrica	74
3.5 - Imobilização de Lipases em Filmes de Caseinato de Sódio (CS)	75
3.6 - Imobilização de Lipases em Filmes de Poli (Álcool Vinílico) (PVA)	75
3.7 - Epoxidação Químio-Enzimática Realizada em Reator Termostatizado	76
3.8 - Epoxidação Químio-Enzimática Realizada em Agitador Orbital	77
3.9 - Determinação das Conversões, Isolamento e Caracterização dos Produtos	78
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
4.1 – Resultados Preliminares	84
4.2 – Epoxidação Químio-Enzimática de Terpenos	88
4.2.1 – Epoxidação do (±)-citronelol	91
4.2.2 – Epoxidação do Eugenol e Isoeugenol	94
4.2.3 – Epoxidação do α -Pineno e β -Pineno	99
4.2.4 – Epoxidação do β -Cariofileno	104
4.2.5 – Epoxidação do D-Limoneno	110
4.2.6 – Epoxidação do (+)-3-Careno	119
4.2.7 – Estudo da Variação do Doador Peróxido	128
5 – CONCLUSÕES	135
6 – PERSPECTIVAS	138
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representações gráficas das estruturas primária (a), secundárias (b, α -hélice e folha- β), terciária (c) e quaternária (d) das enzimas.....	3
Figura 2 – Modelo “chave-fechadura” proposto por Emil Fisher.....	4
Figura 3 – Modelo de encaixe induzido proposto por Daniel E. Koshland Jr.	5
Figura 4 - Modelo da ligação específica de um dos isômeros de um substrato racêmico ao sítio ativo da enzima.	7
Figura 5 - Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade inicial da reação catalisada por enzimas. (a) Gráfico da velocidade inicial da reação <i>versus</i> concentração de substrato. (b) Relação de Lineweaver-Burk. ²	8
Figura 6 - Reação de redução do ácido 2-oxo-4-fenilbutírico catalisada pela D-lactato desidrogenase. ¹¹	9
Figura 7 - Utilização relativa das enzimas em biotransformações.....	13
Figura 8 – Quantidade relativa de artigos científicos obtida na busca feita pelo programa ScinFinder Scholar® em 15 de junho de 2008 utilizando os termos: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , proteases, lipases, liases, transferases, isomerases, oxigenases e nitrilases.	14
Figura 9 - Representação gráfica da estrutura tridimensional obtida por Raio-X da lipase de <i>Cândida antarctica</i>	15
Figura 10 – Mecanismo proposto para hidrólise enzimática de um éster.....	16
Figura 11 – Hidrólise e transesterificação enzimática do (<i>R,S</i>)-butirato de glicidila catalisadas pela LPP (a) e Novozym 435 (b). ³⁷	17
Figura 12 – Esterificação e epoxidação simultânea do ácido oléico para produção de epoxiestearatos de alquila mediada pela CALB.	18
Figura 13 – Resolução enzimática via esterificação, do (\pm) mentol com anidrido butírico catalisada pela LCR.....	20

Figura 14 – Interesterificação do éster metílico do ácido <i>N</i> -acetil-2-piperidilacético com o butanoato de <i>n</i> -butila catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	21
Figura 15 – Reação de metanólise de triacilgliceróis para obtenção de biodiesel catalisada pela lipase de <i>Cândida antarctica</i>	22
Figura 16 - Acidólise da banha de porco com o ácido cáprico catalisada pela lipase de <i>Termomices languginosa</i>	24
Figura 17 - Representação gráfica dos principais métodos de imobilização de biocatalisadores.....	25
Figura 18 – Reagentes aglutinantes (a) e matrizes usadas para imobilização por ligação ao suporte (b) e oclusão em gel (c) utilizados em biocatalisadores suportados. ³⁵	27
Figura 19 – Publicações anuais de artigos científicos sobre imobilização de enzimas obtidos através do site <i>Web of Science</i> ®.....	28
Figura 20 – Síntese enzimática do oleato de L-mentila catalisada pela lipase de <i>Cândida rugosa</i> em sistema bifásico água/ácido oléico/L-mentol.....	34
Figura 21 – Resolução do (<i>R,S</i>)-mandelato de metila, via aminólise com <i>n</i> -butilamina, catalisada pela lipase B de <i>Cândida antarctica</i>	36
Figura 22 – Produtos obtidos na acilação da helicina, esculina, naringina e salicina com butirato de vinila catalisada pela CALB em LIs.....	37
Figura 23 – Aplicações industriais do óxido de propileno.....	45
Figura 24 – Representação da inserção direta de oxigênio em alcenos.....	47
Figura 25 – Síntese da (α)-damascona (55) a partir da (α)-ionona (54). ⁹²	48
Figura 26 – Mecanismo de epoxidação de alcenos via perácidos.....	50
Figura 27 – Velocidades relativas de oxidação de diversos hidroperóxidos para a oxidação do sulfeto para sulfóxido.....	51
Figura 28 – Epoxidação <i>syn</i> seletiva do (\pm) 3-cicloexen-1-ol.....	51
Figura 29 – Efeito cooperativo de grupos de coordenação na reação de epoxidação.....	52
Figura 30 – Reação de epoxidação nucleofílica.....	53
Figura 31 – Epoxidação nucleofílica do 3-C-ciano- β -D-2-enopiranosídeo. ⁹⁶	54

Figura 32 – Epoxidação assimétrica de cetonas α,β -insaturada catalisada por poli(L-aminoácidos).....	55
Figura 33 - Epoxidação assimétrica de cetonas α,β -insaturada catalisada por poli(L-leucina) (PLL); reação de Juliá-Colonna modificada.....	56
Figura 34 – Epoxidação assimétrica de álcoois homoalíficos catalisada por complexos de vanádio.	58
Figura 35 - Comportamento catalítico de complexos de metaloporfirinas suportados em MCM-41 na reação de epoxidção do cicloexeno.....	59
Figura 36 – Epoxidação de alcenos não funcionalizados por complexos de Salen.....	61
Figura 37 – Reações típicas catalisadas pelas oxigenases: (a) hidroxilação por monoxigenase, (b) epoxidação por monoxigenase, (c) oxidação de Baeyer-Villiger, (d) dioxigenação por dioxigenase.....	63
Figura 38 – Biotransformação da <i>cis</i> -jasmona nos produtos 75, 76 e 77 usando células de <i>Trichosporum cutaneum</i> CCT 1903.....	63
Figura 39 – Produção enzimática de monoepóxidos de 1,3-butadieno utilizando a tolueno-2-monoxigenase (T2MO) de <i>B. cepacia</i>	64
Figura 40 – Epoxidação do 2 cicloexen-1-ol com <i>m</i> CPBA.....	66
Figura 41 – Epoxidação químio-enzimática do ácido oléico catalisada pela CALB.....	66
Figura 42 – Epoxidação químio-enzimática de derivados de estireno utilizando ácidos quirais na presença da LPS-G6 e peróxido de hidrogênio.	67
Figura 43 – Equação geral das reações estudadas neste trabalho.....	69
Figura 44 – Sistema realizado em reator termostatizado com agitação por barras magnéticas.....	76
Figura 45 – Banho orbital usado nas reações de epoxidação químio-enzimática.....	77
Figura 46 – Espectro de RMN- ¹ H da fase orgânica da reação de epoxidação químio-enzimática do cicloexeno. CALB = 50mg, 30 ⁰ C, 6 horas, conv. 77%.	79
Figura 47 – Epoxidação químio-enzimática do cicloexeno.....	84

- Figura 48 – Conversão em perácido em função do doador acila na reação de peridrólise de ácidos carboxílicos (5 mmol) com solução aquosa de peróxido de hidrogênio 30% (10 mmol) catalisada pela CALB (50 mg) após 24 h à 35 °C. 86
- Figura 49 – Reação de peridrólise dos ácidos octanóico e palmítico catalisada pela CALB com PHA 30 %, 24 h, 30 °C. 87
- Figura 50 - Epoxidação químico-enzimática do (±)-citronelol..... 91
- Figura 51 – Variação da conversão em epóxido de (±)-citronelol em função do tempo de reação utilizando diferentes quantidades de CALB em unidades de proteína: (■) 250, (●) 500, (▲) 1000, (●) 2000, (◀) 3500, (▶) 4000. [10 mmol de PHA 30 %, 6 mL de CH₂Cl₂, 10 mmoles do ácido octanóico, 200 rpm, 30 °C]..... 92
- Figura 52 - Velocidade de conversão em epóxido de (±)-citronelol em função da quantidade de CALB em unidades de proteína. Condições experimentais como descrito na Figura 51..... 93
- Figura 53 - Epoxidação químico-enzimática do eugenol e do isoeugenol. 94
- Figura 54 – Cromatograma de uma alíquota da fase orgânica da reação de epoxidação químico-enzimática do eugenol catalisada pela CALB utilizando solução aquosa de H₂O₂ 30%, 30 °C, 24 h, conv. 42 %. (*Inj.* = 270°C, *Det.* = 280°C, *T_i* = 50°C, *T_f* = 100°C, Δ_{aq} = 2°C/min, *PH₂* = 75 kPa)..... 95
- Figura 55– Espectro de massas do epóxido do eugenol (conv. = 42%, *m/z* = 180), obtidos por CGEM da fase orgânica da reação de epoxidação químico-enzimática catalisada pela CALB utilizando solução aquosa de H₂O₂ 30%, 30 °C, 24 h. (*Inj.* = 270°C, *Det.* = 280°C, *T_i* = 50°C, *T_f* = 100°C, Δ_{aq} = 2°C/min, *PH₂* = 75 kPa)..... 95
- Figura 56 - Espectro de RMN-¹³C (100 MHz) do epóxido do eugenol isolado, obtido na reação de epoxidação químico-enzimática catalisada pela CALB utilizando solução aquosa de H₂O₂ 30%, 30 °C, 24 h. 96
- Figura 57 - Cromatograma de uma alíquota da fase orgânica da reação de epoxidação químico-enzimática do isoeugenol catalisada pela

CALB utilizando solução aquosa de H ₂ O ₂ 30% como doador peróxido, 30 °C, 24 h. (<i>Inj.</i> = 270°C, <i>Det.</i> = 280°C, <i>T_i</i> = 50°C, <i>T_f</i> = 100°C, Δ_{aq} = 2°C/min, <i>PH₂</i> = 75 kPa).....	97
Figura 58 - Espectro de massas do produto (conv. = > 99 %, m/z = 180), obtidos por CGEM da fase orgânica da reação de epoxidação químio-enzimática do isoeugenol catalisada pela CALB utilizando solução aquosa de H ₂ O ₂ 30% como doador peróxido, 30 °C, 24 h. (<i>Inj.</i> = 270°C, <i>Det.</i> = 280°C, <i>T_i</i> = 50°C, <i>T_f</i> = 100°C, Δ_{aq} = 2°C/min, <i>PH₂</i> = 75 kPa).....	97
Figura 59 - Epoxidação químio-enzimática do α - e β -pineno.	99
Figura 60 - Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz) do epóxido do α -pineno isolado, obtido na reação de epoxidação químio-enzimática catalisada pela CALB utilizando solução aquosa de H ₂ O ₂ 30%, 30 °C, 24 h.	100
Figura 61 - Conversão em epóxido de α -pineno em função do tempo com diferentes massas (mg) de CALB, (■) 25, (●) 100, (▲) 200 (▼) 300 e (◀) 450. [10 mmol de PHA 30 %, 6 mL de CH ₂ Cl ₂ , 10 mmoles do ácido octanóico, 200 rpm, 30 °C]	101
Figura 62 - Velocidade de conversão em epóxido de α -pineno em função da massa de CALB. [condições reacionais como descrito na Figura 61].....	102
Figura 63 – Epoxidação químio-enzimática do β -cariofileno.	103
Figura 64 – Cromatogramas obtidos por CG de alíquotas da reação com β -cariofileno, (a) β -cariofileno (pureza 80%), (b) após 20 min de reação, (c) após 2 h de reação. (<i>inj.</i> =280°C, <i>det.</i> =290°C, <i>taxa de aquecimento</i> =10°C/min, <i>temp. inicial</i> =100°C, <i>temp. final</i> =250°C, <i>split</i> =100:1, <i>pressão de H₂</i> =75K, <i>coluna Shimadzu-CPB5</i>).	104
Figura 65 - Espectro de RMN- ¹³ C (100 MHz) do monoepóxido endocíclico β -cariofileno isolado, obtido na reação de epoxidação químio-enzimática catalisada pela CALB utilizando solução aquosa de H ₂ O ₂ 30%, 30 °C, 24 h.	105

- Figura 66 – Conversão em mono-epóxido de β -cariofileno em função do sistema utilizado: (■) PHA 30%, (●) PHA 30% + 5 mL de água, (▲) PHA 30% + 5 mL de tampão fosfato pH 8,4; CALB 100 mg, 6 mL de CH_2Cl_2 , 30 °C. 107
- Figura 67 – Conversão em epóxido de β -cariofileno em função do tempo e da massa de CALB: (■) 50, (●) 100, (▲) 200 (▼) 300 mg. [10 mmol de PHA 30 %, 6 mL de CH_2Cl_2 , 10 mmoles do ácido octanóico, 200 rpm, 30 °C] 108
- Figura 68 - Epoxidação químio-enzimática do D-limoneno. 110
- Figura 69 – Esquematização dos cromatogramas da epoxidação regioseletiva do D-limoneno (5mmol). [50 mg de CALB, 10 mmol de PHA 30 %, 6 mL de CH_2Cl_2 , 10 mmoles do ácido octanóico, 200 rpm, 30 °C, *Inj.* = 270°C, *Det.* = 280°C, T_i = 100°C, T_f = 200°C, Δ_{aq} = 5°C/min, P_{H_2} = 75 kPa]. 111
- Figura 70 - Cromatograma obtido por CGEM da fase orgânica da epoxidação químio-enzimática do D-limoneno com a CALB em sistema bifásico água/tolueno, 30 °C, 24 h. (*Inj.* = 270°C, *Det.* = 280°C, T_i = 50°C, T_f = 200°C, Δ_{aq} = 2°C/min, P_{H_2} = 75 kPa). 112
- Figura 71 - Espectro de massas do produto (101) ($c \approx 99$ %, $m/z = 138$) obtidos por CGEM da fase orgânica da reação de epoxidação químio-enzimática do D-limoneno, com a CALB em sistema bifásico água/tolueno, 30 °C, 24 h. (*Inj.* = 270°C, *Det.* = 280°C, T_i = 50°C, T_f = 200°C, Δ_{aq} = 2°C/min, P_{H_2} = 75 kPa). 112
- Figura 72 – Curva potenciométrica obtida na titulação, com solução de NaOH 1,12 M, da reação de peridrólise do ácido octanóico (5,0 mmol) catalisada pela CALB na presença de peróxido de hidrogênio 30 %, após 20 min à 30 °C. 114
- Figura 73 – Gráfico da derivada da curva potenciométrica obtida da titulação da reação de peridrólise do ácido octanóico (Figura 72). 115
- Figura 74 - (●) Velocidade de peridrólise do ácido octanóico, (○) velocidade de epoxidação do D-limoneno e (■) conversão percentual em peroxiácido octanóico em função da concentração de

ácido octanóico utilizado na reação de epoxidação químio-enzimática do D-limoneno à 30 °C. Cond. exp. descritas na Figura 72.	116
Figura 75 – Epoxidação químio-enzimática do (+)-3-careno.	117
Figura 76 - Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz) do epóxido do (+)-3-careno isolado, obtido na reação de epoxidação químio-enzimática catalisada pela CALB utilizando solução aquosa de H ₂ O ₂ 30%, 30 °C, 24 h.	119
Figura 77 – Variação da conversão em epóxido de (+)-3-careno em função da velocidade de rotação do agitador orbital após 90 min. [50 mg de CALB, 10 mmol de PHA 30 %, 6 mL de CH ₂ Cl ₂ , 10 mmoles do ácido octanóico, 30 °C, agitador orbital Certomat MO, B. Braun Biotech Int]	120
Figura 78 – Conversão em epóxido de (+)-3-careno em função do tempo com diferentes massas de CALB: (■) 25 mg, (●) 50 mg, (▲) 100 mg, (▼) 150 mg, (◀) 200 mg, (▶) 250 mg, (◆) 300 mg, (◆) 400 mg, (●) 500 mg. [10 mmol de PHA 30 %, 6 mL de CH ₂ Cl ₂ , 10 mmoles do ácido octanóico, 200 rpm, 30 °C].	121
Figura 79 – Velocidade de conversão em epóxido de (+)-3-careno em função da massa de CALB. [Condições experimentais como descritas na Figura 78].	122
Figura 80 – Conversão em epóxido de (+)-3-careno em função do solvente: (■) hexano, (●) tolueno, (*) acetonitrila, (▼) diclorometano, (▽) diclorometano:[BMIm][PF ₆]. [50 mg de CALB, 10 mmol de PHA 30 %, 6 mL de solvente, 10 mmoles do ácido octanóico, 200 rpm, 30 °C].	125
Figura 81 – Conversão em epóxido do α-pineno, (+)-3-careno, (±)-citronelol, carvona e β-pineno em função do doador peróxido. [50 mg de CALB, 10 mmol de UPH 18 %, 6 mL de diclorometano, 10 mmoles do ácido octanóico, 200 rpm, 3 h, 30 °C].	128
Figura 82 – Conversão em epóxido em função do tempo na reação de epoxidação químio-enzimática de terpenos (5 mmol) utilizando a UPH como doador peróxido e CALB à 35 °C. (■) α-pineno, (●) β-	

pineno, (▲) (<i>R</i>)-(+)-carvona, (□) (+)-3-careno, (○) (±)-citronelol, (Δ) D-limoneno. [50 mg de CALB, 10 mmol de UPH 18%, 6 mL de solvente, 10 mmoles do ácido octanóico, 200 rpm, 3 h, 30 °C].....	129
Figura 83 – Conversão em epóxido de β-cariofileno em função do doador do grupo peróxido: (■) PHA, (●) UPH, (□) diepóxido e/ou subprodutos. [100 mg de CALB, 6 mL de solvente, 10 mmoles do ácido octanóico, 200 rpm, 30 °C].	131
Figura 84 - Conversão em epóxido da carvona em função do tempo utilizando com biocatalisador: (◆)CALB, (●) LPS, (■)LRO, (⊖)LPS-CS, (○) LPS-PVA, (□)LRO-PVA. [6mL de solvente, 10mmoles do ácido octanóico, 200 rpm, 30 °C].	132

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Classe, subclasse e função de algumas enzimas segundo a IUBMB.	11
Tabela 2 – Líquidos iônicos à temperatura ambiente baseados no cátion do 1- alquil-3-metilimidazólio. ^{72,73}	35
Tabela 3 – Calor de formação de alguns éteres.	44
Tabela 4 – Hidrolases utilizadas neste trabalho.	71
Tabela 5 – Epoxidação químio-enzimática de terpenos catalisada pela CALB ^(a) .	89
Tabela 6 – Influência do comprimento da cadeia do doador acila na epoxidação químio-enzimática do (+)-3-careno catalisada pela lipase de CALB.	123

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ADP	= adenosina difosfato
Asp	= ácido aspártico
ATP	= adenosina trifosfato
[BMIm][BF ₄]	= tetrafluoroborato de 1-butil-3-metil imidazólio
[BMIm][PF ₆]	= hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazólio
CALB	= lipase B de <i>Candida antarctica</i>
CG	= cromatografia gasosa
CGEM	= cromatógrafo gasoso acoplado à espectrômetro de massas.
CLAE	= cromatografia líquida de alta eficiência
CLEA	= agregados enzimáticos por ligação cruzadas
CLEC	= cristais enzimáticos por ligações cruzadas
Col.	= colaboradores
conv.	= conversão
CS	= caseínato de sódio
d(+)	= dextrógiro
DBU	= 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DET	= tartarato de dietil
E	= razão enantiomérica
e.e.	= excesso enantiomérico
EQ	= equação
ESQ	= esquema
FIG.	= Figura
Gln	= glutamina
His	= histidina
kDa	= quilo Daltons
K _M	= constante de Michaelis
l(-)	= levógiro
LCR	= lipase de <i>Candida rugosa</i>
LI	= líquido iônico

log P	= logaritmo do coeficiente de partição
MCP	= 2-cloro-propionato de metila
<i>m</i> CPBA	= ácido metacloroperbenzóico
MEV	= microscopia de eletrônica de varredura
n.d.	= não houve detecção do produto
p. ex.	= por exemplo
PEO	= poli(óxido de etileno)
pH	= potencial hidrogeniônico
PHA	= peróxido de hidrogênio aquoso
PLA	= poli(L-alanina)
PLL	= poli(L-leucina)
POP	= 1,3-dipalmitoil-2-oleoil glicerol
PVA	= poli(óxido de etileno)
rend.	= rendimento
RMN- ¹ H	= ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RNA	= ácido ribonucléico
Ser	= serina
sp.	= espécie não identificada
t.r.	= tempo de retenção
TAB	= tabela
TBHP	= hidroperóxido de <i>terc</i> -butila
THF	= tetraidrofurano
TMS	= tetrametilsilano
TON	= turnover number
Tyr	= tirosina
UPH	= uréia peróxido de hidrogênio
ΔH_f	= Calor de formação

RESUMO

Neste trabalho foram estudados os diversos parâmetros envolvidos na reação de epoxidação químio-enzimática, inicialmente do cicloexeno e depois de forma mais aprofundada de diversos terpenos que continham uma ou duas ligações duplas e/ou centros proquirais, para se determinar quais as melhores condições reacionais para cada tipo de substrato. Em uma primeira etapa, lipases de diferentes fontes foram utilizadas como catalisadores na epoxidação químio-enzimática do cicloexeno utilizando como doador acila o ácido octanóico e uma solução aquosa de peróxido de hidrogênio 30 % (PHA). Foi também avaliada a utilização de diferentes solventes orgânicos. Os melhores valores de conversão em epóxido de cicloexeno foram obtidas para as reações que utilizaram como catalisador a lipase B de *Candida antarctica* (CALB) e tolueno ou clorofórmio como solventes, sendo >99 %. A CALB pôde ser reutilizada nesta reação até dez vezes sem perda considerável de sua atividade catalítica. Foram realizadas as titulações iodométricas das reações, sem a presença dos alcenos, para determinação da conversão de diversos ácidos carboxílicos (ácidos hexanóico, octanóico, láurico e palmítico) em seus respectivos perácidos. Foi observado que a conversão máxima (>99 %) foi dependente da concentração do PHA e do comprimento da cadeia alquílica do ácido, sendo de 30 %. Na seqüência, foram estudadas as reações com os terpenos: mirceno, (+)-terpineno-4-ol, cis-verbenol, terpineol, terpinoleno, eugenol, isoeugenol, D-limoneno, β -cariofileno, (\pm)-citronelol, α -pineno, β -pineno, carvona e o (+)-3-careno. Foram avaliados vários parâmetros experimentais de reação tais como tempo, doador acila, doador peróxido, solvente, reutilização do biocatalisador, entre outros. A regio- e estereosseletividade do sistema foi também observada. As melhores conversões foram obtidas quando as reações foram realizadas utilizando a CALB à 30 °C, agitação orbital de 200 rpm, o ácido octanóico como doador acila, o PHA ou uréia peróxido de hidrogênio 18 % (UPH) como doadores peróxido com os terpenos que continham ligação dupla endocíclica ou com pelo menos três substituições nas mesmas. Os melhores solventes orgânicos foram o tolueno e o diclorometano. A epoxidação regioseletiva foi observada para o α -pineno e o β -pineno; o eugenol e o isoeugenol, e entre as duas ligações duplas do D-limoneno, β -cariofileno e da carvona. Para a epoxidação do (+)-3-careno, um substrato com impedimento estereo, a reação químio-enzimática foi estereosseletiva, com e.e.p >99 %. Estes resultados mostraram que o uso da epoxidação químio-enzimática de alcenos e em especial de vários terpenos, *via* lipases, é uma alternativa interessante e viável para a obtenção de epóxidos em altas conversões e com regio- e estereosseletividade.

ABSTRACT

In this work, the several parameters involved on the chemo-enzymatic epoxidation reactions were evaluated, firstly with the cyclohexene and then with a range of terpenes containing one or two double bonds and/or pró-chiral centers, in order to determine the best reaction conditions for each substrate. Firstly, lipases from several sources were used as catalysts on the chemo-enzymatic epoxidation of cyclohexene using octanoic acid as acyl donor and aqueous solution of hydrogen peroxide 30% (AHP). The influence of several organic solvents was also evaluated. The highest conversions into cyclohexene epoxide were achieved by using lipase B from *Candida antarctica* (CALB) and toluene or chloroform as solvents, these being of >99%. The CALB was re-used for ten times without losing its catalytic activity. The iodometric titration reactions were realized, in the absence of alkenes, to evaluate the conversion of several carboxylic acids (hexanoic, octanoic, lauric and palmitic acids) into their corresponding peracids. The highest conversion (>99 %) was dependent on the AHP concentration and the chain length of the carboxylic acid, this being of 30 % for the octanoic acid. Then, the reactions with the terpenes mircene, (+)-terpinen-4-ol, cis-verbenol, terpineol, terpinolen, eugenol, isoeugenol, D-limonene, β -cariofilene, (\pm)-citronelol, α -pinene, β -pinene, carvone and with (+)-3-carene were studied. Several experimental parameters such as time, acyl donor, peroxide donor, organic solvents and biocatalyst re-use were evaluated. The regio- and the stereoselectivity of this system was also observed. The highest conversion degrees were achieved in the reactions using CALB at 30 °C, orbital rate of 200 rpm, octanoic acid as acyl donor, AHP or urea- hydrogen peroxide 18% (UHP) as peroxide donors with the terpenes containing an endocyclic double bond with three substituents. The best organic solvents were toluene and dichloromethane. The regioselective epoxidation was observed for α -pinene and β -pinene; eugenol and isoeugenol, and between the two double bonds of D-limonene, β -cariofilene and carvone. For the epoxidation of (+)-3-carene, a substrate with stereo hindrance, the chemo-enzymatic reaction was stereoselective with an ee_p >99 %. These results showed that the use of chemo-enzymatic epoxidation of alkenes and in special of several terpenes, *via* lipases, was a viable and an interesting alternative to obtain epoxides in high conversions with regio- and stereoselectivity.

1 – Fundamentação Teórica

1.1 – Considerações Gerais

A pesquisa em catálise é multidisciplinar e envolve diversas áreas, tais como materiais, cinética química, química de sólidos e de superfícies, nanotecnologia e biotecnologia. Sua aplicação na indústria química é bastante diversificada, sendo intensamente utilizada nos setores petroquímico, plásticos, controle ambiental, entre outros. Sua utilização na síntese orgânica de moléculas complexas tem crescido intensamente e, em consequência, catalisadores ocupam um lugar de destaque nos setores de química fina e de fármacos. O catalisador é, em muitos casos, o ponto-chave na proteção intelectual de processos químicos. Apesar de ser uma área de pesquisa já consolidada, a importância da catálise se renova constantemente na indústria e na academia.¹

A área de catálise irá, sem dúvida, contribuir para os novos desafios do mundo moderno, tais como a obtenção de combustíveis limpos e de fontes renováveis, a síntese de produtos naturais e a obtenção de novos fármacos e defensivos agrícolas. A catálise tem contribuído significativamente em processos que visam o desenvolvimento sustentável e a proteção ambiental, dentro do conceito de Química Verde (“Green Chemistry”). Catalisadores com seletividades próximas a 100% serão cada vez mais importantes, pois aumentam a eficiência dos processos, eliminando a geração de contaminantes e sub-produtos. Neste contexto, o conhecimento íntimo, em nível molecular, do fenômeno catalítico será cada vez mais relevante para o melhor controle da reação.¹

O uso de enzimas, como catalisador, em reações orgânicas vem de encontro ao desafio de maximização dos processos associado à diminuição dos impactos ambientais.

Muitos investimentos têm sido feitos a fim de encontrar um método eficiente, barato e que proporcione a manutenção da integridade da enzima durante o processo, considerando que podem ser desnaturadas por solventes orgânicos, meio no qual a grande maioria das reações orgânica é realizada.

O interesse no uso das enzimas na indústria ou em síntese orgânica está nas condições suaves e seletivas nas quais são realizadas as reações, sendo estas bastante importantes quando se trabalha em síntese. Por exemplo, se as condições reacionais forem muito drásticas, estas poderão decompor o produto de interesse da síntese.²

Apesar das vantagens, o uso para aplicações industriais ainda é limitado, por exemplo na fabricação de pães e cervejas, devido à instabilidade destes biocatalisadores nas condições operacionais requeridas e/ou na dificuldade de separação do mesmo dos substratos e produtos.

Nos últimos 20 anos tem sido observado um aumento no uso destes biocatalisadores em meio orgânico, e com isso novas implicações teóricas e aplicações práticas estão surgindo. Hoje, é de grande interesse o desenvolvimento de novos métodos e testes de novos meios reacionais que possibilitem o uso de enzimas sinteticamente.³

1.2 – Enzimas

As enzimas, em sua maioria*, são catalisadores de natureza protéica, produzidas pelos organismos vivos.^{2,4} Como outras proteínas, elas são formadas por uma longa cadeia de aminoácidos ligados através de ligações peptídicas e a seqüência exata de

* Existem certas moléculas de RNA que também agem como enzimas. O Prêmio Nobel de Química de 1989 foi dado a Sidney Altman e a Thomas R. Cech por esta descoberta.

aminoácidos da cadeia protéica é chamada estrutura primária (**Figura 1a**). A conformação tridimensional dessa seqüência é denominada estrutura secundária (**Figura 1b**), a disposição espacial destas estruturas é denominada estrutura terciária (**Figura 1c**). As associações de proteínas para formação de dímeros ou oligômeros formam estruturas chamadas quaternárias (**Figura 1d**).²

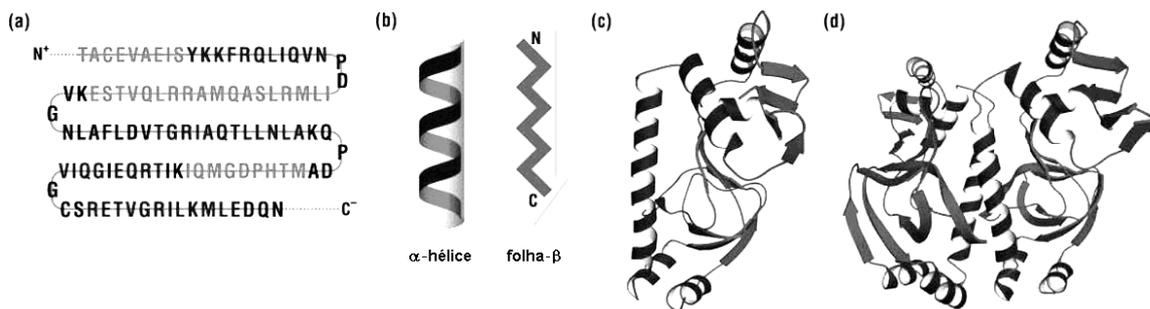


Figura 1 - Representações gráficas das estruturas primária (a), secundárias (b, α -hélice e folha- β), terciária (c) e quaternária (d) das enzimas.

Nos sistemas biológicos, as enzimas constituem a base das complexas e variadas reações que caracterizam os fenômenos vitais. Elas estão presentes em todas as células vivas e desempenham a função vital de controlar os processos metabólicos pelo qual os nutrientes são convertidos em energia.²

As enzimas são catalisadores versáteis.^{5,6} Diversos processos no metabolismo animal são regidos pelas enzimas e estes ocorrem em condições favoráveis para o indivíduo sem liberação brusca de energia, em um meio de pH e concentração salina praticamente constante. Estas condições minimizam problemas de isomerização, racemização, rearranjos, etc., que freqüentemente permeiam a metodologia tradicional. Elas são catalisadores altamente eficientes, sendo que as velocidades das reações

catalisadas por enzimas podem ser até 10^{18} vezes mais rápidas do que as correspondentes não catalisadas.^{5,6}

Assim como todo catalisador, as enzimas aumentam a velocidade das reações através da diminuição da barreira energética existente entre reagentes (substratos) e produtos sem sofrer alterações permanentes em sua estrutura. As enzimas aproximam os substratos (S) com orientação espacial favorável dentro de uma cavidade, denominada sítio ativo, formando um complexo enzima-substrato (ES). A formação deste complexo conduz a uma diminuição da energia de ativação, aumentando a velocidade da reação.²

As enzimas produzidas pelos organismos vivos só catalisam, habitualmente, um tipo ou uma determinada reação. Esta habilidade está diretamente ligada à configuração L dos aminoácidos e ao formato dos sítios catalíticos que proporcionam o encaixe do substrato.^{2,4}

Muitos modelos de ligação “enzima-substrato” têm sido propostos a fim de elucidar o mecanismo da catálise enzimática. O modelo “chave-fechadura” é o mais conhecido deles e foi proposto por E. Fischer em 1894. Neste mecanismo, o substrato correto encaixa-se perfeitamente no sítio ativo da enzima, como uma chave em sua fechadura, revelando a alta especificidade das reações enzimáticas.⁷ (**Figura 2**)

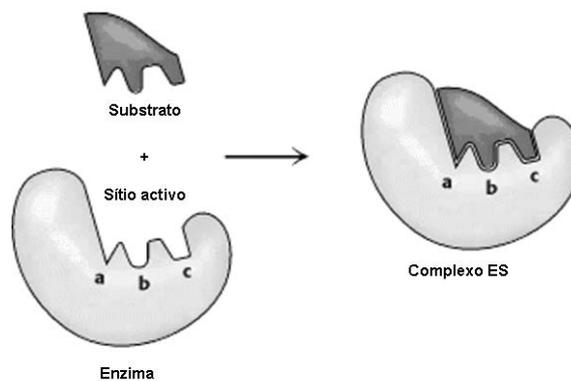


Figura 2 – Modelo “chave-fechadura” proposto por Emil Fisher.

Entretanto, este modelo não é mais aceito atualmente, visto que implicaria na formação de um complexo ES de elevada estabilidade, tornando a reação termodinamicamente desfavorável.⁶

Um modelo mais adequado para descrever a formação do complexo ES foi desenvolvido por Daniel E. Koshland Jr. em 1958 e denominado “encaixe induzido”.⁶ A aproximação do substrato ao sítio ativo induz uma mudança conformacional da enzima, alinhando os orbitais dos substratos e dos grupos catalíticos corretamente, facilitando a reação.^{6,8} (**Figura 3**)

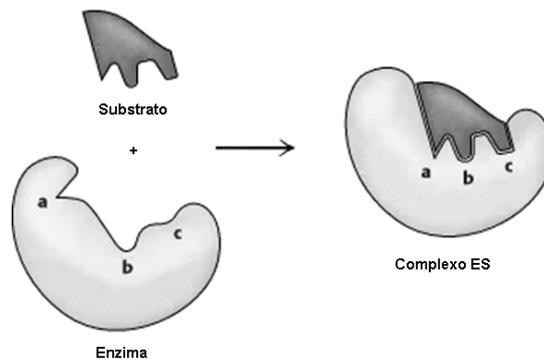


Figura 3 – Modelo de encaixe induzido proposto por Daniel E. Koshland Jr.

Mais recentemente, em 1986 Dewar propôs a teoria da dessolvatação, sugerindo que as reações enzimáticas são semelhantes às que ocorrem em fase gasosa, pois quando um substrato entra no sítio ativo da enzima ele substitui todas as moléculas de água ali presentes, dessolvatando-o. Warshel e *col.* expandiram esta teoria em 1989 para o modelo de “solvatação-substituição”, baseando-se no fato de que a enzima não seria capaz expulsar a água encontrada em torno do substrato porque isto seria energeticamente desfavorável para a enzima, sugerindo que a água seria substituída por

outro meio, fornecido pelo sítio ativo, causando uma substituição na solvatação. Desta forma substratos hidrofóbicos substituem a água pelo sítio hidrofóbico da enzima.⁶

Contudo, nenhuma dessas teorias citadas acima, consegue explicar a especificidade observada nas reações catalisadas pelas enzimas. Elas têm uma especificidade tão marcante que, em geral, atuam exclusivamente sobre substâncias de configuração precisa. Por exemplo, só reagem com aminoácidos que tem seu carbono α assimétrico, com configuração L e não revelam a menor atividade sobre formas idênticas desses aminoácidos que apresentam configuração do tipo D. Esta estereoespecificidade é decorrente da inerente quiralidade das proteínas, formando sítios ativos assimétricos.⁸

A regra dos três pontos, todavia, é a que vem sendo utilizada para explicar a alta seletividade das enzimas. Criado por Ogston em 1948, este modelo sugere que para a enzima ser altamente enantiosseletiva o substrato deve ser mantido fixo no espaço tridimensional, necessitando de três pontos de ligação distintos com o sítio catalítico.^{6,9} Logo, a conformação e a composição química do sítio ativo determinam a especificidade e a eficiência da catálise.^{6,9} **(Figura 4)**

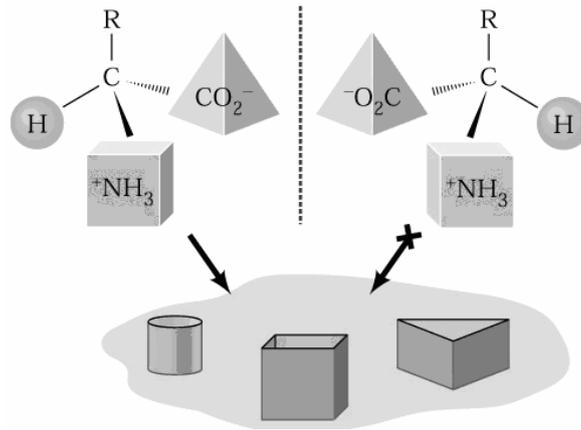


Figura 4 - Modelo da ligação específica de um dos isômeros de um substrato racêmico ao sítio ativo da enzima.⁹

Em todos os modelos apresentados, o complexo ES resulta das ligações formadas entre o substrato e as cadeias laterais de vários aminoácidos dentro do sítio ativo. Estas interações são principalmente não covalentes, como as eletrostáticas, íon-dipolo, dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio, transferência de carga, interações hidrofóbicas e dispersões de London. As ligações não covalentes são, em geral, interações de natureza fraca e dessa forma o substrato e produto podem ser liberados do sítio ativo sem comprometer a estrutura da enzima, uma vez que o substrato está ligado ao sítio ativo da enzima através das possíveis interações acima mencionadas.⁷

As enzimas podem utilizar vários mecanismos para catalisar a conversão do substrato a produto. Os mais comuns são: aproximação, catálise covalente, catálise ácida/básica, catálise eletrostática, dessolvatação e torção. Todos os mecanismos atuam na estabilização da energia do estado de transição ou na desestabilização do estado fundamental.⁷

Atuando das formas citadas, as enzimas aumentam a velocidade de determinadas reações no interior das células. Como nas diversas células se realizam uma infinidade de

reações, deduz-se que existam milhares de enzimas. Esta atividade catalítica varia com diversos fatores, sendo o mais importante a própria concentração do substrato, $[S]$.²

A atividade enzimática aumenta com o aumento da $[S]$ até uma concentração de saturação, a partir da qual a velocidade da reação é máxima (V_{max}). A maioria das enzimas mostram o efeito de saturação, porém este varia amplamente em relação à $[S]$ necessária para produzi-lo.⁸

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 $[S]$ correspondente à metade de V_{max} , 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).² (Figura 5)

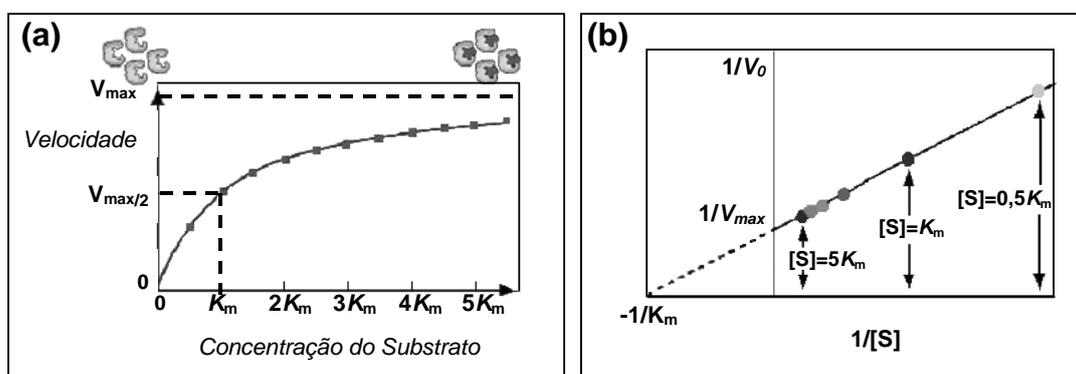


Figura 5 - Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade inicial da reação catalisada por enzimas. (a) Gráfico da velocidade inicial da reação *versus* concentração de substrato. (b) Relação de Lineweaver-Burk.²

As enzimas também têm as atividades alteradas em função do pH, temperatura, força iônica e polaridade do meio, apresentando atividade máxima quando estes parâmetros são ótimos, o que depende da origem do organismo que sintetiza determinada proteína.

A atividade de cada enzima na célula está sujeita a muitos mecanismos de regulação, sendo que a indução ou inibição da sua produção vai depender do desempenho das atividades celulares, estimulando ou inibindo a expressão dos genes envolvidos na biossíntese destas macromoléculas.^{2,10}

Certas enzimas atuam somente com o auxílio de substâncias não protéicas, as quais são chamadas de cofatores quando são íons ou moléculas inorgânicas, e coenzimas quando são moléculas orgânicas. Um exemplo destas enzimas são as oxidoredutases, que necessitam da presença de coenzimas como o dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH) e fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH), ou de outras moléculas orgânicas, que atuem como aceptores ou doadores de elétrons nas reações de redução e oxidação.² Por exemplo, na reação de redução do ácido 2-oxo-4-fenilbutírico (**1**) para formar o álcool (*R*)-(**2**), mediada pela D-lactato desidrogenase, o NADH é oxidado a NAD⁺.¹¹ (**Figura 6**)

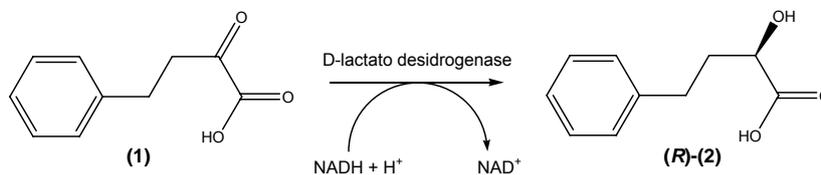


Figura 6 - Reação de redução do ácido 2-oxo-4-fenilbutírico catalisada pela D-lactato desidrogenase.¹¹

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

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

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 of the 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 alguns códigos utilizados para a aplicação do número de identificação das enzimas.

Tabela 1 – Classe, subclasse e função de algumas enzimas segundo a IUBMB.¹²

1	<i>Oxido-redutases</i> (reações de oxidação-redução ou transferência de elétrons)
1.1	atuam em grupos CH-OH
1.2	atuam em grupos aldeído
1.3	atuam em grupos CH-CH
1.4	atuam em grupos CH-NH ₂
2	<i>Transferases</i> (transferem grupos funcionais como amina, fosfato, acil, carboxil)
2.1	transferem grupos com um carbono
2.2	transferem grupos aldeído ou cetona
2.3	Aciltransferases
2.4	Glicosiltransferases
3	<i>Hidrolases</i> (reações de hidrólise de ligação covalente)
3.1	atuam em ligações de ésteres
3.2	Glicosilases
3.3	atuam em ligações de éteres
3.4	Peptidases
4	<i>Liases</i> (catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico)
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
5	<i>Isomerases</i> (reações de interconversão entre isômeros óticos ou geométricos)
5.1	Racemases
5.2	<i>cis- e trans</i> -isomerases
5.3	isomerases intramolecular
5.4	transferases intramolecular (mutases)
6	<i>Ligases</i> (catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas pré-existentes, sempre com consumo de energia)
6.1	formam ligações C-O
6.2	formam ligações C-S
6.3	formam ligações C-N
6.4	formam ligações C-C

A incorporação de vias sintéticas utilizando etapas de biotransformação, através do uso de microrganismos e/ou enzimas isoladas como catalisadores, vem sendo

explorada tanto em laboratórios acadêmicos quanto na indústria, principalmente na farmacêutica.^{13,14,15,16,17,18,19,20}

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

As vantagens do uso de enzimas, apresentadas por Loughlin e outros autores, em processos de sínteses incluem:^{21,22,23,24,25,26,27}

- São catalisadores eficientes; as velocidades de processos mediados por enzimas são maiores se comparados com a catálise química e são efetivas mesmo em frações molares muito pequenas de catalisador.
- Atuam sob condições brandas; e a faixa moderada de temperatura de operação (20-40°C) minimiza reações laterais indesejadas como rearranjos.
- Catalisam uma grande variedade de reações e podem freqüentemente promover reações em posições muito pouco reativas do substrato.
- Demonstram seletividade; como (a) quimiosseletividade (enzimas podem atuar em somente um tipo de grupo funcional mesmo na presença de outros grupos funcionais reativos), (b) regiosseletividade e diastereosseletividade (enzimas podem distinguir entre grupos funcionais somente com a mudança do meio reacional), (c) enantiosseletividade (enzimas são catalisadores quirais e sua especificidade pode ser explorada para sínteses seletivas e assimétricas).

- Não são restritas aos seus substratos naturais; a maioria das enzimas demonstra grande especificidade para um determinado tipo de reação ao mesmo tempo em que geralmente aceitam uma grande variedade de substratos.
- Catalisam reações em meios não aquosos; e apesar de normalmente ser observado uma perda de atividade, algumas enzimas podem ser utilizadas em solventes orgânicos.

As enzimas hidrolíticas são os biocatalisadores mais comumente usados em síntese orgânica, sendo de particular e grande interesse as lipases. **(Figura 7)**⁶

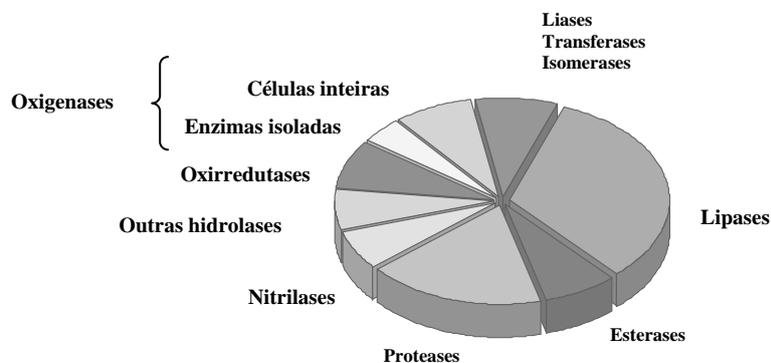


Figura 7 - Utilização relativa das enzimas em biotransformações.

Trabalhos envolvendo lipases e proteases representam quase metade dos artigos científicos publicados quando é feita uma busca utilizando o programa SciFinder e tendo como alvo as palavras: *Saccharomyces cerevisiae*, proteases, lipases, liases, transferases, isomerases, oxigenases e nitrilases, como demonstrado na **Figura 8**.²⁸

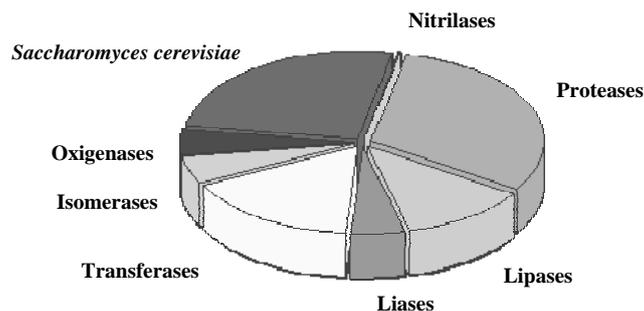


Figura 8 – Quantidade relativa de artigos científicos obtida na busca feita pelo programa ScinFinder Scholar® em 15 de junho de 2008 utilizando os termos: *Saccharomyces cerevisiae*, proteases, lipases, liases, transferases, isomerases, oxigenases e nitrilases.

1.2.1 – Lipases

As lipases (triglicerol acilidrolases, EC 3.1.1.3) são α/β -hidrolases, que possuem massa molar em torno de 40 a 50 KDa, com cerca de 300 resíduos de aminoácidos. Nos organismos vivos são as enzimas responsáveis pela hidrólise de acilglicerídeos.^{6,29}

São enzimas extracelulares, produzidas por fungos tais como *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum* sp., e por leveduras como *Tulopsis* sp. e *Candida* sp. Algumas bactérias que produzem lipases, também podem ser destacadas, como a *Pseudomonas* sp., *Achromobacter* sp. e *Staphylococcus* sp. Várias destas lipases já estão disponíveis comercialmente, como por exemplo de *Aspergillus* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp. e *Candida* sp..^{30,31,32}

A **Figura 9** mostra a representação gráfica da estrutura tridimensional da lipase da *Cândida antarctica* com a ampliação do seu sítio ativo formado pela cadeia lateral da histidina, serina e ácido aspártico.

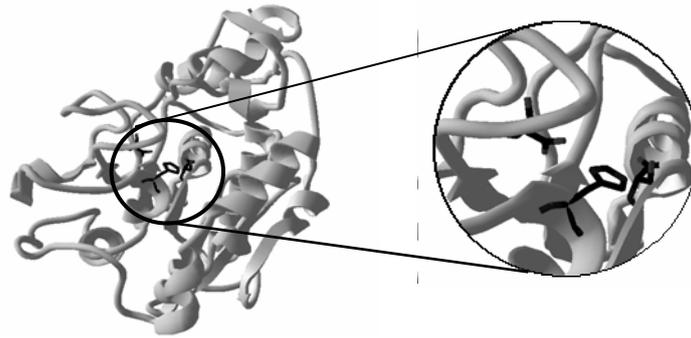


Figura 9 - Representação gráfica da estrutura tridimensional obtida por Raio-X da lipase de *Cândida antarctica*.³³

Todos os membros da família de estrutura α/β -hidrolase possuem um mecanismo comum de hidrólise de ésteres, como o exemplificado na **Figura 10**, que consiste nas seguintes etapas: ligação ao substrato éster (**a**); formação do primeiro intermediário tetraédrico por ataque nucleofílico da serina catalítica com o oxianion estabilizado por duas ou três ligações de hidrogênio (**b**); quebra da ligação éster e saída da porção alcoólica (**c**), hidrólise (**d, e**), regeneração do catalisador e formação do produto (**f**).^{34, 35}

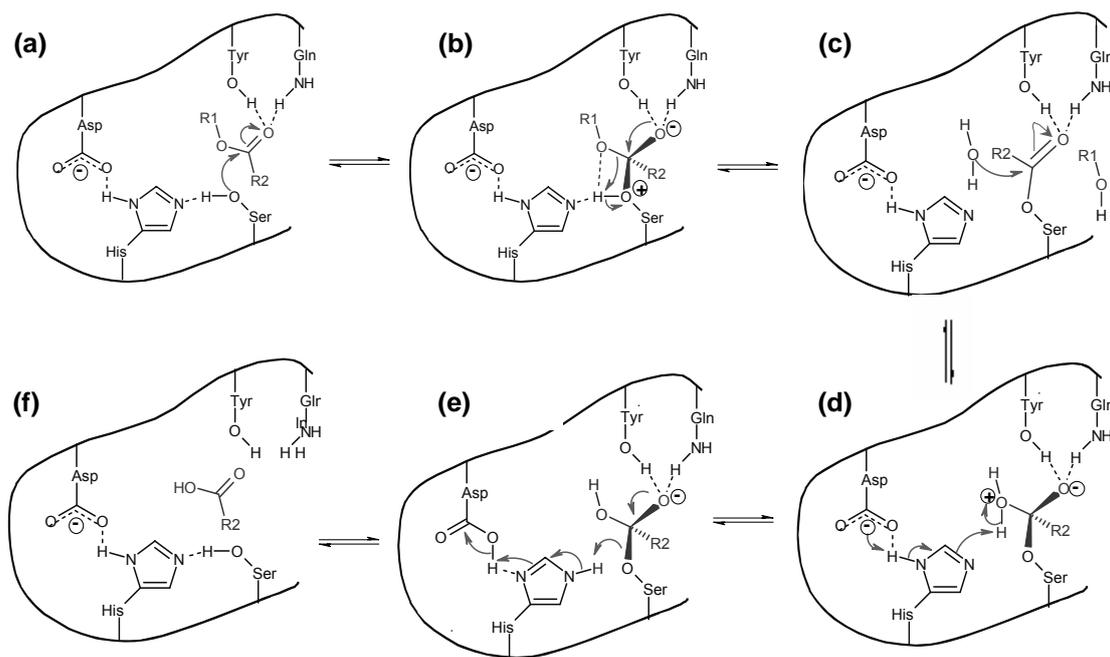
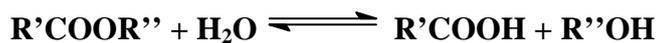


Figura 10 – Mecanismo proposto para hidrólise enzimática de um éster.

As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica devido a sua grande disponibilidade, baixo custo, não requerem cofatores, atuam em uma faixa de pH relativamente grande e são muito estáveis.³⁶ Em solvente orgânico, catalisam a transferência de grupos acila de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores diferentes da água. Dependendo do tipo de doador acila e do aceptor, as reações catalisadas por lipases podem ser classificadas em dois tipos:

I – Hidrólise



Yu *e col.* investigaram o uso de diversas lipases na resolução quiral, em duas etapas, do (*R*) e (*S*)-butirato de glicidila (**3**). Na primeira etapa, a lipase pancreática de

porco (LPP – 100 mg) foi utilizada na hidrólise de **(3)** para produção do (*R*)-butirato de glicidila **(4)** obtendo um $E = 21$. Na seqüência, o glicidol (*R*)-enriquecido **(5)** foi usado na transesterificação do butirato de vinila **(6)**, catalisada pela CALB (10 mg) obtendo-se o (*S*)-butirato de glicidila **(7)** com um $E = 69$.³⁷ (**Figura 11**)

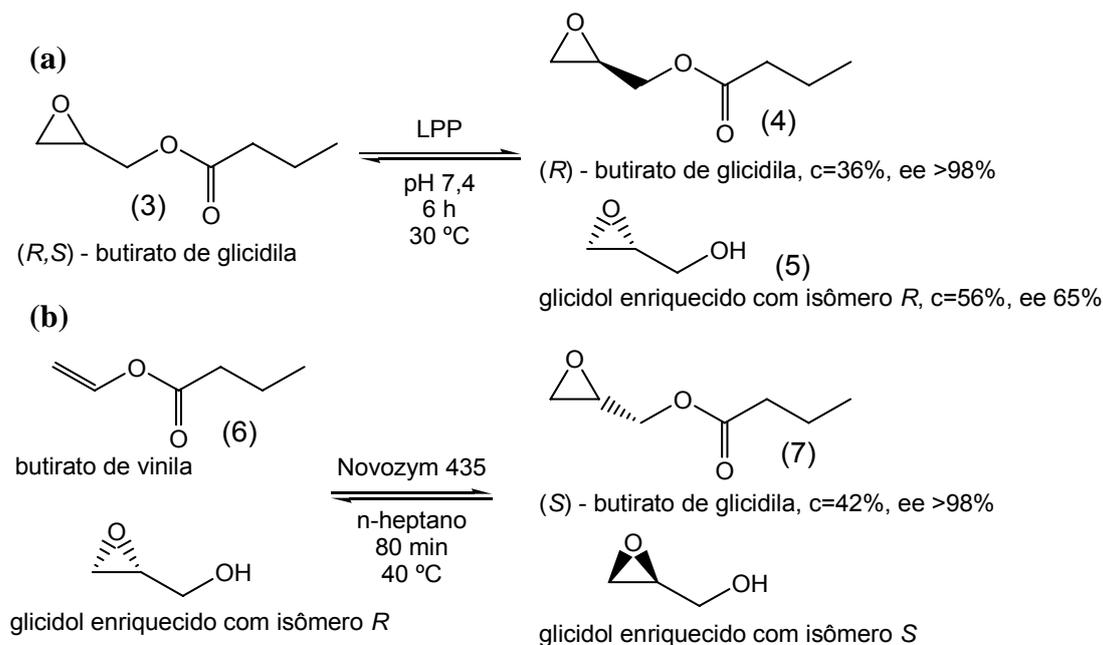


Figura 11 – Hidrólise e transesterificação enzimática do (*R,S*)-butirato de glicidila catalisadas pela LPP **(a)** e Novozym 435 **(b)**.³⁷

O trabalho de Yu *e col.* apresenta um método eficiente de obtenção dos enantiômeros *R*- e *S*- do butirato de glicidila separadamente, com altos valores de conversão e excesso enantiomérico utilizando um sistema em duas etapas com lipases de diferentes fontes. Também é interessante notar que mesmo em ambientes bastante diferentes, um meio aquoso tamponado e outro com solvente de baixa polaridade, as lipases foram catalisadores efetivos para ambas as reações.

. Peridrólise



Orellana-Coca *e col.* prepararam epoxiestearatos de alquila (8) através da esterificação e peridrólise catalisadas pela lipase B de *Candida antarctica* seguida pela epoxidação do ácido oléico (9) em um processo chamado “one-pot”.³⁸ (Figura 12)

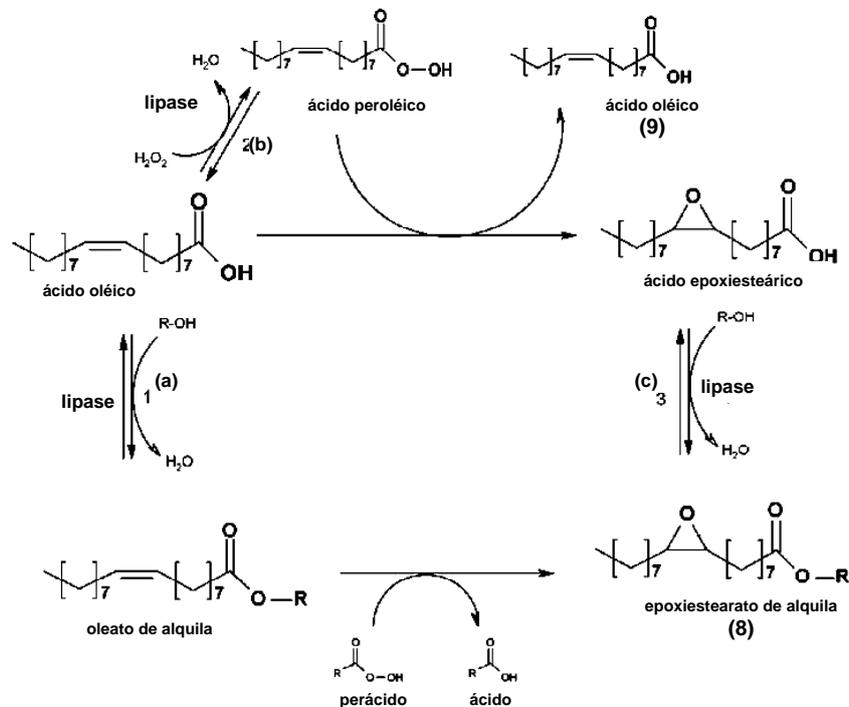


Figura 12 – Esterificação e epoxidação simultânea do ácido oléico para produção de epoxiestearatos de alquila mediada pela CALB.

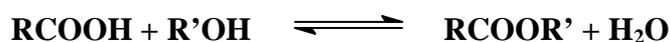
A **Figura 12** representa o esquema das vias reacionais para a esterificação (a) e formação do perácido oléico (b) catalisados pela CALB. O oxigênio é espontaneamente transferido do perácido para a ligação dupla formando o ácido epoxiesteárico. Na via

(a), o ácido oléico reage com um álcool formando um éster que é subsequentemente epoxidado. O ácido epoxiesteárico também serve como substrato para a reação de esterificação catalisada pela lipase (c).

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%). Este por sua vez, quando utilizado na epoxidação, apresentou velocidade de conversão mais alta e melhor rendimento. Neste trabalho, a lipase também sofreu perda de atividade significativa durante a reação, devido principalmente ao peróxido de hidrogênio. A presença dos álcoois, particularmente o etanol, também contribuiu para inativação da enzima.³⁸

II - Sínteses - As reações de síntese, catalisadas por lipases, podem ser divididas em quatro categorias:

(a) Esterificação



Othman *e col.* utilizaram a lipase de *Candida rugosa* (LCR - 50 mg), imobilizada em Eupergit C por adsorção, na resolução cinética do isômeros (\pm) do mentol (**10**) com anidrido butírico (**11**), através da esterificação enzimática deste substrato ao correspondente isômero do butirato (**12**).³⁹ (**Figura 13**)

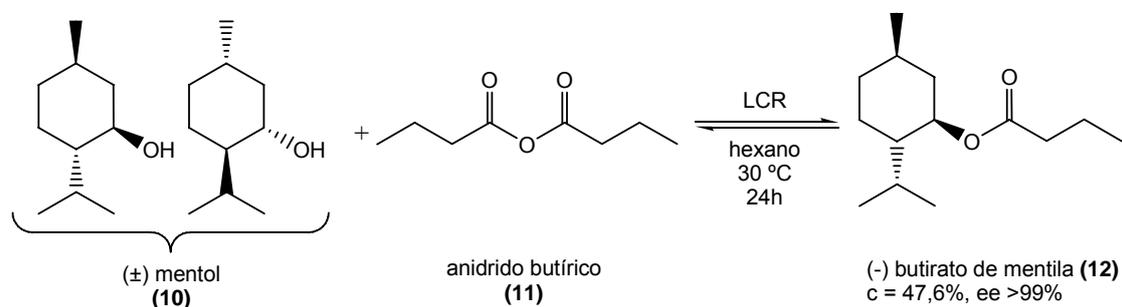
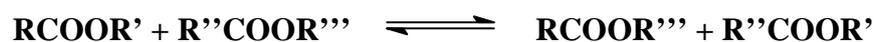


Figura 13 – Resolução enzimática via esterificação, do (±) mentol com anidrido butírico catalisada pela LCR.

No trabalho de Othman *et al.*, a lipase imobilizada manteve a atividade catalítica formando o produto (-)-butirato de mentila (**12**) com rendimentos superiores a 31 % e excesso enantiomérico >99 %, e mostraram uma melhor estabilidade comparada à enzima livre. A LCR manteve cerca de 50 % de sua atividade catalítica mesmo após a incubação a altas temperaturas (60 – 70 °C), armazenamento à temperatura ambiente e incubações por 60 dias em hexano.

A reutilização da LCR imobilizada também foi bastante eficiente, apresentando uma pequena perda de atividade (aproximadamente 20 %) após a quinta reutilização.

(b) Interesterificação



Liljeblad *e col.* concentraram seus estudos na enantiosseletividade de reações catalisadas por lipases com ésteres metílicos derivados dos ácidos 2-piperidilacético e 3-piperidinocarboxílico com butanoato de butila.⁴⁰ (**Figura 14**)

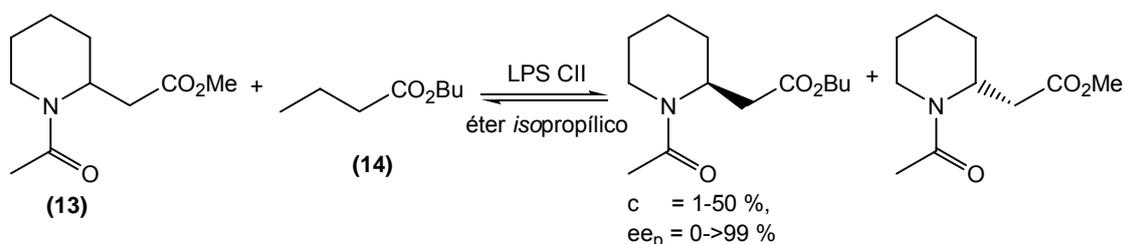


Figura 14 – Interesterificação do éster metílico do ácido *N*-acetil-2-piperidilacético com o butanoato de *n*-butila catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia*.

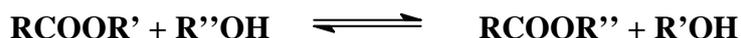
Neste trabalho foram obtidos altas taxas de conversão (30 – 46 %) e excelentes excessos enantioméricos ($ee_p = 95 - 99 \%$) na transesterificação dos ésteres metílicos do ácido *N*-acetil-2-piperidilacético (**13**) com butanoato de butila (**14**) quando estes foram utilizados em misturas de éter isopropílico ou com *n*-butanol na presença da lipase PS-C II de *Burkholderia cepacia*.

Quando foram utilizados o *n*-butanol ou butanoato de *n*-butila as conversões obtidas foram baixas (1–10 %). Contudo nas reações com o éster observou-se um alto excesso enantiomérico ($ee_p\% = 55-99 \%$). Os menores valores de conversão e excesso enantiomérico ($c = 7 \%$ e $ee_p\% = 55 \%$) obtidos na reação de transesterificação ocorreram, provavelmente devido à inativação da enzima provocada pela alta temperatura (80 °C).

Outros grupos *N*-protetores como o *tert*-butoxicarbonil (Boc), o *o*-nitrotoluenossulfonil (Ns), o 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc) e o benziloxicarbonil (Bzn), produziram excelentes resultados de enantiosseletividade ($E > 200$) e uma

resolução em grande escala foi obtida com a utilização *N*-Boc-2-piperidilacetato de metila.⁴⁰

(c) Alcoólise



Haa *e col.* realizaram a produção de biodiesel através da metanólise do óleo de soja utilizando a CALB como catalisador em 23 líquidos iônicos* diferentes. A maior conversão em éster metílico do ácido graxo foi obtida após 12 horas a 50 °C em hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio [EMIm][TfO]. A produção de biodiesel alcançou 80 % de conversão, sendo esta, oito vezes superior à obtida no sistema livre de solvente orgânico.⁴¹ **(Figura 15)**

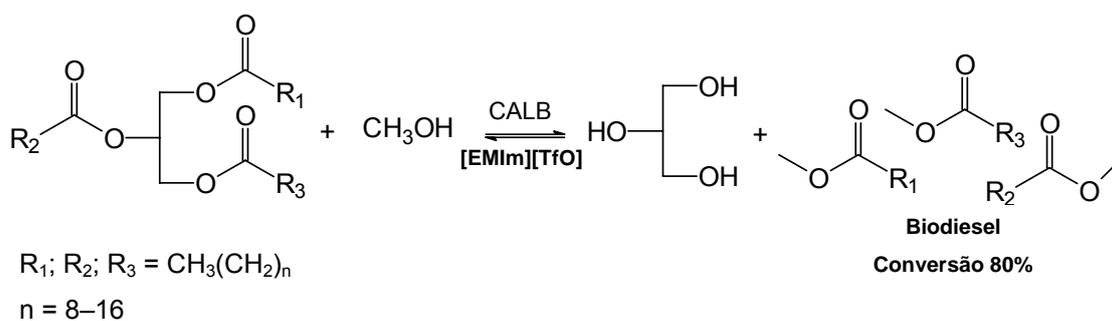


Figura 15 – Reação de metanólise de triacilgliceróis para obtenção de biodiesel catalisada pela lipase de *Cândida antarctica*.

*Líquidos Iônicos são sais orgânicos líquidos a temperaturas abaixo de 100 °C, normalmente à temperatura ambiente.

Os autores demonstraram que o [EMIm][TfO] tem potencial para ser utilizado como solvente em reações de metanólise para produção de biodiesel. Foi observado um aumento de 15 % nas conversões neste LI quando comparadas com as reações que utilizam o *tert*-butanol como aditivo.

Apesar da reconhecida baixa pressão de vapor dos LIs, o que confere à esta nova classe de solventes algumas vantagens (p. ex.: baixa volatilidade) sobre os solventes orgânicos mais comuns, a toxicidade destes solventes ainda está sob investigação. São poucos os trabalhos publicados que apresentam dados sobre a toxicidade destes compostos ou dados de possíveis impactos ambientais por eles gerados, e portanto estudos mais aprofundados nesta área são necessários antes da aplicação deste sistema na indústria.⁴²

(d) Acidólise



Zhao *e col.* realizaram a incorporação do ácido cáprico (**15**) na banha de porco. A incorporação deste ácido via acidólise quando catalisada pela lipase de *Termomices languginosa* (Lipozyme TL IM), apresentou conversões na ordem de 37 mol%.⁴³

(Figura 16)

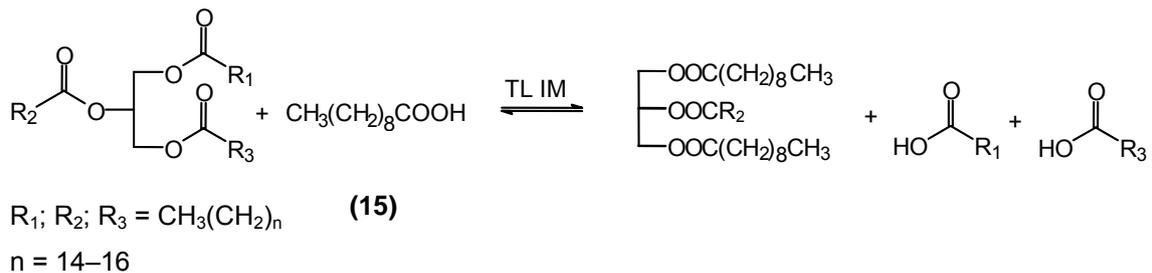


Figura 16 - Acidólise da banha de porco com o ácido cáprico catalisada pela lipase de *Termomices languginosa*.

Os melhores resultados de incorporação do ácido cáprico foram obtidos em solventes orgânicos com $\log P = >3$ utilizando a Lipozyme 5-10 % em massa (em relação ao substrato) à temperaturas próximas de 50 °C por 24h com adição de água variando de 0-10%.

Esta modificação produziu uma banha com cadeias de ácidos graxos médias, de mais fácil digestão que a banha comum; podendo ser utilizada como fonte de energia para crianças e como lipídio de calorias reduzidas na dieta alimentar de pessoas de baixa renda em países como o Brasil e a China.

As reações (b), (c), e (d) são agrupadas em um único termo que é a transesterificação.

O uso de lipases, nas reações acima citadas já está bem descrito na literatura.^{44,45,46,47,48,49} Estas também são utilizadas em reações de amidação^{50,51}, síntese de peptídeos⁵² e na formação de perácidos.^{53,54,55}

A utilização dessas enzimas em síntese orgânica tem sido de grande importância. Porém, a grande dificuldade ainda está em estabilizar estes catalisadores em meio orgânico para repetidos usos uma vez que dependendo do tipo, fonte, pureza e reações a serem utilizadas, estão sujeitas a inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos,

podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Este fato, ainda pode torná-las catalisadores de custo elevado ao processo.

A busca de uma metodologia que melhore a estabilidade no meio orgânico faz-se necessário para que a síntese de compostos complexos, que exigem várias etapas, possa ser otimizada. Frente a este problema, técnicas de imobilização vem sendo desenvolvidas para fornecer estabilidade para as enzimas e facilitar a sua recuperação e reutilização.^{6,20,56}

1.2.2 - Imobilização de Enzimas

A imobilização de biocatalisadores consiste na sua confinamento a uma região restrita, garantindo a retenção da atividade catalítica, e assegurando a possibilidade da sua utilização de forma repetida e contínua.

A **Figura 17** apresenta uma proposta de classificação de métodos de imobilização de biocatalisadores.³⁵

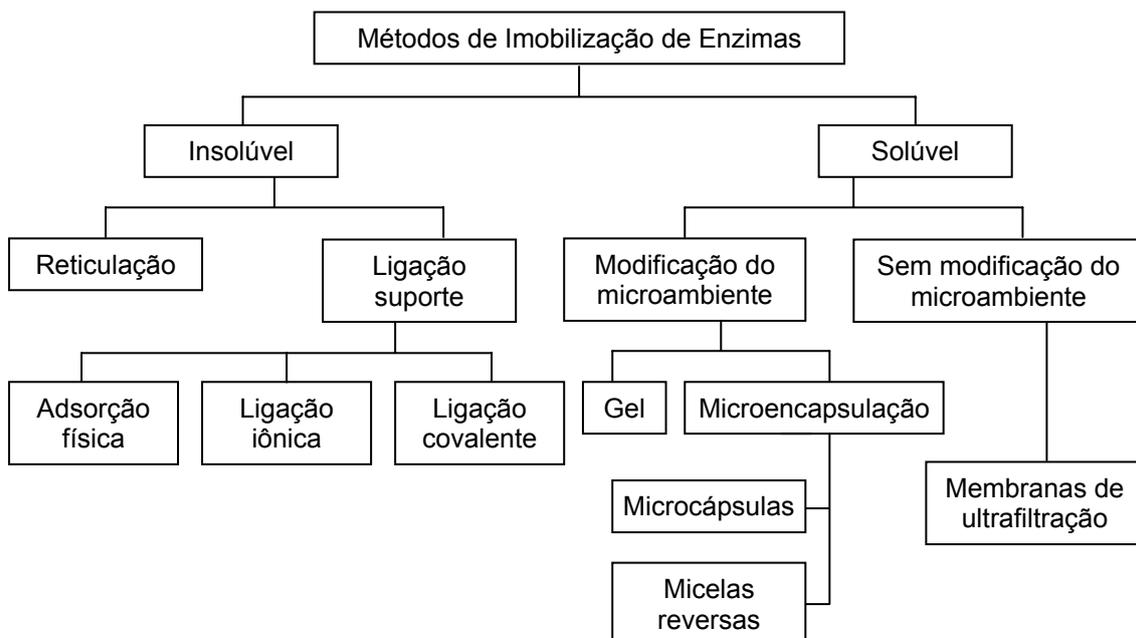


Figura 17 - Representação gráfica dos principais métodos de imobilização de biocatalisadores.

Existem duas técnicas básicas para a imobilização de biocatalisadores:

- ligações cruzadas intermoleculares de enzimas por reagentes bi- ou multifuncionais;
- imobilização de enzimas em suportes sólidos, através da ligação do biocatalisador a um suporte ou da sua oclusão em uma matriz polimérica.³⁵

A escolha do reagente aglutinante ou de suportes adequados é uma etapa essencial para utilização dos biocatalisadores imobilizados no meio reacional. Alguns parâmetros devem ser considerados nesta etapa em relação à estrutura e atividade do suporte, como por exemplo;

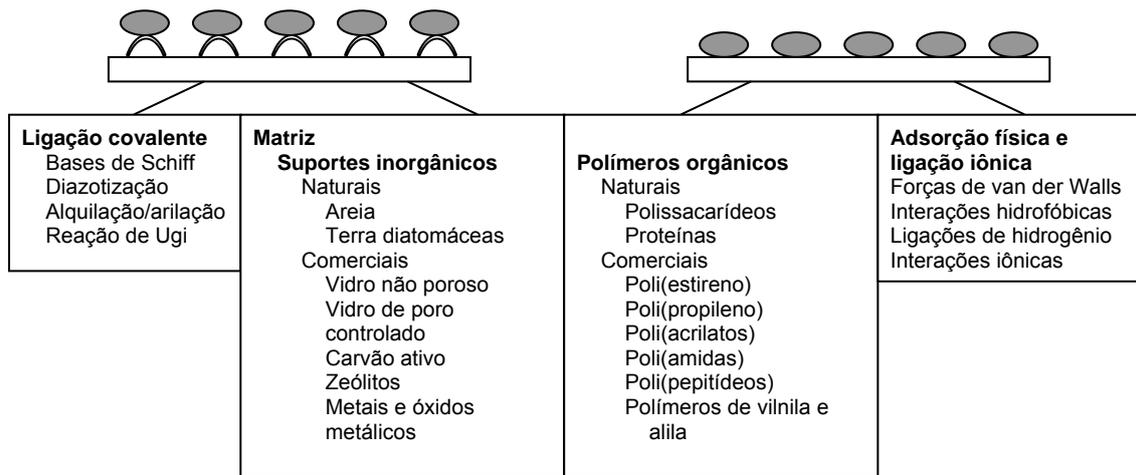
- a existência de grupos funcionais reativos;
- o caráter hidrofóbico ou hidrofílico;
- a resistência química, mecânica e biológica;
- a estrutura macro e microscópica;
- o custo e disponibilidade.³⁵

A **Figura 18** mostra alguns exemplos de reagentes e matrizes que vem sendo utilizados para imobilização de biocatalisadores.³⁵

(a) reticulação



(b) matrizes de imobilização por ligação à um suporte



(c) matrizes de imobilização por oclusão em gel

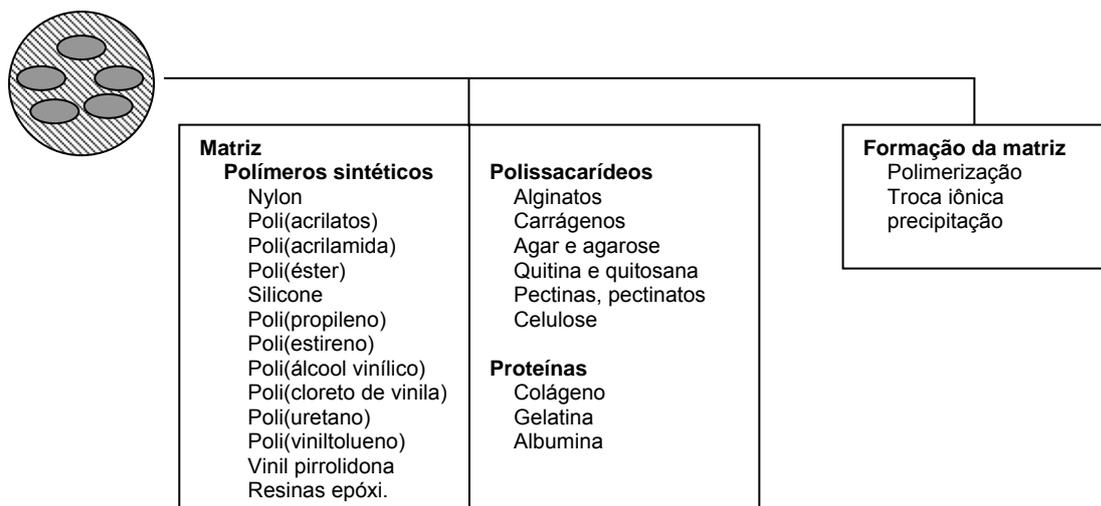


Figura 18 – Reagentes aglutinantes (a) e matrizes usadas para imobilização por ligação ao suporte (b) e oclusão em gel (c) utilizados em biocatalisadores suportados.³⁵

Vários desses métodos de imobilização vêm sendo utilizados nos últimos trinta anos por grupos de pesquisa do mundo inteiro, visando aumentar a estabilidade destes biocatalisadores e tornar seu uso uma prática rotineira em laboratórios de síntese orgânica, mesmo em solventes de baixa polaridade.

Este interesse crescente no estudo de métodos de imobilização de biocatalisadores pode ser facilmente observado quando é feita uma pesquisa sobre imobilização de enzimas através de ferramentas de busca especializadas, como o site Web of Science®. A **Figura 19** mostra os resultados obtidos anualmente quando é feita uma busca utilizando as palavras enzimas e imobilização.

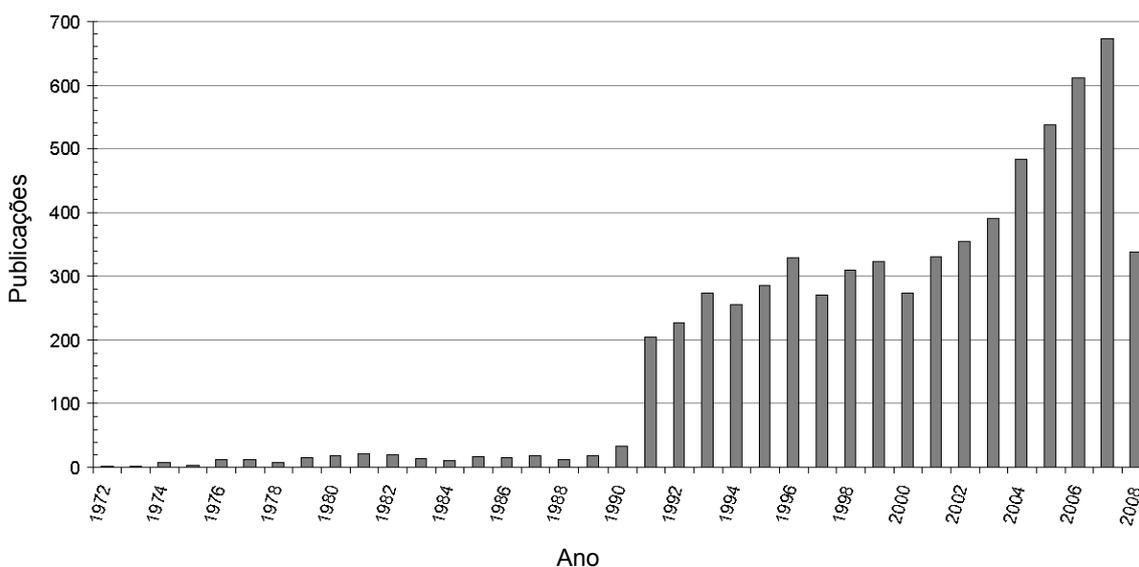


Figura 19 – Publicações anuais de artigos científicos sobre imobilização de enzimas obtidos através do site *Web of Science*®.⁵⁷

Outras técnicas que, apesar de não apresentarem ligações e nem de confinar as enzimas fisicamente, também podem ser consideradas métodos de imobilização, são os sistemas bi e trifásico. Nestes sistemas, os biocatalisadores ficam retidos na água e

entram em contato com os outros solventes (de baixa polaridade e/ou LIs) através de agitação mecânica.^{6, 58}

Dependendo da técnica de imobilização, as propriedades do biocatalisador, tais como estabilidade, seletividade, valores de K_M , pH e temperatura ótimos, podem ser significativamente alteradas.^{6,35}

A enzima quando imobilizada retém sua configuração estrutural devido às ligações de hidrogênio ou a formação de complexos que ocorrem na superfície do material. Isto leva a uma dificuldade na vibração da enzima, ocasionando um aumento da estabilidade térmica. Pode-se observar, também, que o micro ambiente da superfície do suporte tem cargas que podem causar uma mudança no pH ótimo da enzima de até duas unidades. Observa-se com isto um alargamento da faixa de pH na qual a enzima atua.^{6,10,35}

Na seqüência serão discutidos mais especificamente alguns métodos de imobilização de biocatalisadores.

1.2.2.1 – Reticulação com Reagentes Funcionais

Células e enzimas podem ser reticuladas covalentemente através de ligações cruzadas (*cross-linking*) com reagentes bi e multifuncionais resultando na formação de agregados insolúveis em água.³⁵

Agregados enzimáticos por ligação cruzada (CLEAs) têm sido propostos como uma alternativa para as imobilizações convencionais em suportes sólidos e para os cristais enzimáticos também formados por ligações cruzadas (CLECs).^{59,60}

Cabana *e col.* imobilizaram a lacase de *Corioloopsis polyzona* através da formação de CLEA utilizando o poli(etileno glicol) como agente precipitante e o glutaraldeído como agente reticulante. Os autores demonstraram que quando as lacases, livre e imobilizada, foram incubadas na presença de agentes desnaturantes (protease, NaN_3 , ZnCl_2 , CoCl_2 , CaCl_2 , EDTA, metanol e acetona) o sistema lacase CLEA apresentou uma atividade catalítica residual (A/A°)* superior (0,51-0,96) à apresentada pela lacase livre (0-0,57), exceto nos sistemas incubados com os cloretos onde a atividade foi mantida ($\cong 0,50$).⁶⁰

Estes resultados demonstram a eficiência da técnica de imobilização por reticulação com reagentes funcionalizados; apresentando como grande vantagem a sua fácil execução devido à utilização de poucos reagentes. Todavia, a aplicação deste método é, muitas vezes, limitado pela toxicidade dos reagentes, sendo necessária a utilização de outras técnicas de imobilização como, p.ex., a imobilização em suportes sólidos.³⁵

1.2.2.2 - Imobilização em Suportes Sólidos

Um dos primeiros trabalhos reportados na literatura científica, no início dos anos 70, foi realizado por Kennedy *e col.*, que utilizaram matrizes de celulose macroporosa funcionalizada com *trans*-2,3-carbonatos cíclicos para imobilização da químiotripsina A através de ligações covalentes. A enzima insolúvel apresentou atividade considerável tanto para substratos de alta massa molar (caseína) quanto para os de baixa massa molar (éster etílico da tirosina). Sob condições ótimas de preparação, a enzima imobilizada

* A atividade catalítica residual é a razão entre a atividade catalítica do sistema após o tempo de incubação (A) pela atividade catalítica do sistema antes de ser incubado (A°).

apresentou uma melhora relativa de 26 % com a caseína e de 65 % com o éster em relação à enzima livre.⁶¹

Uma lipase microbiana proveniente da *Pseudomonas* sp., foi imobilizada em ACR-silica gel por Catoni *e col.* em 1996. Os autores promoveram a catálise na reação de esterificação do anidrido acético com diferentes álcoois secundários quirais para investigar os efeitos de diversos solventes orgânicos sobre a eficiência desta reação.⁶²

A utilização de lipases imobilizadas por adsorção em membranas do tipo fibra oca de polieterimida em reatores foi realizada por Merçon *e col.* em 1997. Os autores realizaram reações de hidrólise do óleo de babaçu em reatores de membrana, enquanto mantinham separadas as fases orgânica e aquosa.⁶³

Em 2000, Kamori *e col.* utilizaram a lipase da *Pseudomonas cepacia* adsorvida em tionita (TN-M) para resolução racêmica de álcoois secundários saturados, insaturados, alicíclicos e aromáticos.⁶⁴

Vecchia *e col.* e Mateo *e col.*, apresentaram uma revisão de métodos comuns de imobilização de lipases em diversos polímeros (p. ex.: poli(óxido de etileno), poli(sulfonato de estireno)) e a aplicação destes sistemas para obtenção de compostos de interesse sintético.^{65,66,67}

Recentemente nosso grupo de pesquisa fez um estudo detalhado do uso do caseinato de sódio, um polímero biodegradável derivado da caseína[†], como suporte para lipases de diferentes fontes e o seu uso em reações de esterificação do ácido oléico com *n*-pentanol. Nesse trabalho, inicialmente foi realizado um estudo utilizando o ácido oléico e o *n*-pentanol como substratos e como biocatalisadores lipases de diferentes fontes livres ou imobilizadas no filme de caseinato.⁵⁶

[†] A caseína (do latim "caseus", queijo) é uma proteína do tipo fosfoproteína encontrada no leite fresco. Representa cerca de 80% do total de proteínas do leite.

Com as lipases de *Pseudomonas* sp., de *Thermomices lanuginosus* e de *Rhizopus oryzae* em suas formas livres as conversões em oleato de *n*-pentila foram de 63 %, 38 % e 13 % respectivamente. Quando estas foram utilizadas imobilizadas no filme de caseinato de sódio observou-se um aumento nas conversões, sendo de 66 %, 45 %, 41 %. Para os sistemas que utilizaram as lipases de *Mucor miehei* e de *Mucor javanicus* observou-se conversões de 40 % e 41% quando as enzimas foram utilizadas nas formas livres e de 13 % e 11 % quando estas estavam imobilizadas. No sistema onde foi utilizada a lipase *Candida rugosa* somente foi observada a formação de produto quando esta foi utilizada na sua forma livre (43 %), e para o sistema com a lipase de *Aspergillus niger* não foi detectada a formação de produto tanto para a enzima livre quanto para a imobilizada.

É importante observar que mesmo quando há uma diminuição na formação do produto de interesse em relação à utilização dos biocatalisadores na sua forma livre, a imobilização das lipases em filmes de caseinato de sódio apresentou uma grande vantagem que é a reutilização. Neste trabalho, as enzimas imobilizadas nos filmes apresentaram uma proteção eficiente contra desnaturação pelo solvente orgânico, pois estes mantiveram o micro ambiente aquoso necessário para que os biocatalisadores fossem utilizados por várias repetições (10 vezes) sem uma perda considerável nas conversões em produto, sendo de ≈ 5 %.⁵⁶

A diminuição da atividade enzimática, para alguns sistemas que utilizam biocatalisadores imobilizados em suportes sólidos é, muitas vezes, devido à dificuldade de difusão de substratos e produtos através do suporte. A utilização de sistemas reacionais de fase líquida, como o bi e o trifásico, são alternativas que podem minimizar estas dificuldades.

1.2.2.3 - Sistema Bifásico

O sistema bifásico foi utilizado pela primeira vez em reações biocatalíticas por Cremonesi *e col.* em 1973, onde os autores testaram a atividade catalítica da β -hidroxiesteróide desidrogenase na desidrogenação de esteróides. A enzima manteve a atividade por longo período em alguns solventes orgânicos, tais como 1-butanol, diclorometano e éter etílico.⁶⁸

Em 1975, Buckland *e col.* utilizaram um sistema bifásico para conversão do colesterol em colesten-4-eno-3-ona com células de *Nocardia* sp.. Com agitação vigorosa, a velocidade da reação não foi limitada pela velocidade de transferência dos reagentes da parte externa para a interna do microorganismo. Utilizando 100 g de células em 200 mL de CCl_4 contendo 16% de colesterol à 20°C, a colesten-4-eno-3-ona foi obtida à uma taxa de 7 g/h. As células foram separadas facilmente do solvente orgânico e reutilizadas. Após 7 utilizações (69 h), a velocidade da reação diminuiu pela metade do valor em relação ao seu primeiro uso.⁶⁹

Um fator importante, em relação às reações realizadas em sistemas bifásicos, é a determinação das quantidades dos solventes que compõem este sistema. Kobayashi *e col.* apresentaram recentemente um estudo envolvendo a síntese do oleato de L-mentila (17) em um sistema água/ácido oléico/L-mentol.⁷⁰ (Figura 20)

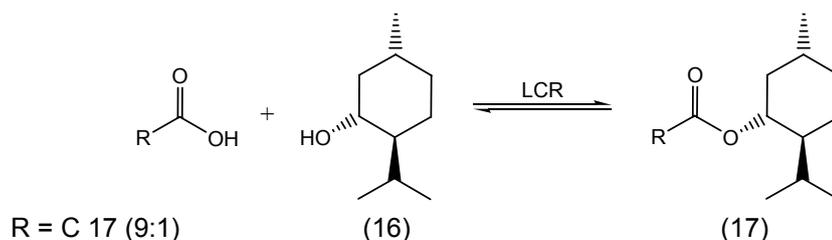


Figura 20 – Síntese enzimática do oleato de L-mentila catalisada pela lipase de *Cândida rugosa* em sistema bifásico água/ácido oléico/L-mentol.

Os resultados demonstraram que quando foi utilizada uma relação de ácido oléico/L-mentol 1:1 (mol/mol), mesmo com a variação da água de 5-90 % em massa, as conversões não ultrapassaram 80 % em oleato de L-mentila. Com o emprego de um excesso do ácido oléico (19:1, mol/mol) e 20 % em massa de água, a conversão baseada no L-mentol foi de 93 %. Contudo quando essa mesma quantidade de água foi utilizada numa relação de excesso de L-mentol (1:9, mol/mol), a conversão baseada no ácido oléico foi de 81 %. Estes resultados demonstraram que o aumento da quantidade de L-mentol aumentou a solubilidade da água no ácido oléico (de 0,4 m% para 1,4 m%) promovendo um aumento da hidrólise do éster obtido e diminuindo os valores de conversão.

As principais vantagens do sistema bifásico são:

- Reações com substratos insolúveis em água podem ser feitas em volumes reduzidos de uma mistura de reação.
- O produto pode ser facilmente separado do biocatalisador.
- A inibição da enzima por substratos ou produtos é minimizada devido a sua baixa concentração na fase aquosa, onde esta se localiza.
- As enzimas hidrolíticas podem ser usadas em reações de transesterificação, síntese de peptídeos e reações de esterificação, considerando que estas são termodinamicamente desfavoráveis em meio aquoso.

Contudo, algumas limitações são observadas quando este sistema é empregado nestas reações:

- Inativação ou inibição da enzima pelo solvente (minimizada pela escolha do solvente).
- O sistema deve estar em agitação permanente, para acelerar a reação.

- Pode ocorrer perda da atividade da enzima a cada repetição.

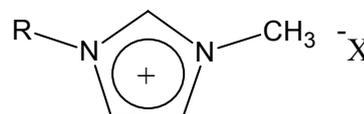
Recentemente, tem havido um aumento crescente no interesse em utilizar sistemas contendo líquidos iônicos como solventes, por serem apresentados como solventes do futuro e por agregarem alta tecnologia e propriedades ecologicamente corretas.⁷¹

1.3 - Líquidos Iônicos

Líquidos iônicos (LI) a temperatura ambiente vêm se tornando uma alternativa crescente e atraente como um meio reacional para transformações químicas. Líquidos iônicos são sais orgânicos com ponto de fusão inferior à 100⁰C, frequentemente inferior até mesmo à temperatura ambiente. Os mais comuns são os derivados de imidazólio e de piridínio, mas também compostos de fosfônio ou tetralquilamônio podem ser utilizados para este propósito.⁷² A **Tabela 2** mostra alguns exemplos desses compostos.⁷³

Tabela 2 – Líquidos iônicos à temperatura ambiente baseados no cátion do 1-alkil-3-metilimidazólio.^{72,73}

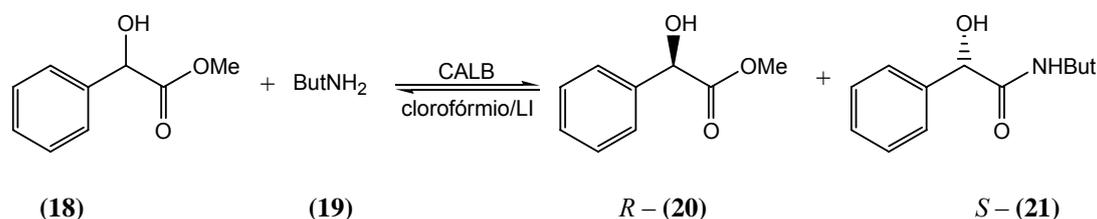
R	X	p.f.(⁰C)
Et	BF ₄	15
<i>n</i> -Bu	BF ₆	-81
Et	PF ₆	60
<i>n</i> -Bu	PF ₆	10
Et	AlCl ₄	-80
<i>n</i> -Bu	AlCl ₄	-88



Uma das grandes vantagens dos LI é praticamente a ausência de pressão de vapor fazendo com que estes compostos não sejam nocivos ao meio ambiente. Devido a isto, eles emergem como substituintes de solventes orgânicos voláteis em processos industriais.

Os LIs são solventes particularmente promissores para a biocatálise. Estudos recentes demonstram o seu uso em reações enzimáticas. Em alguns casos esta utilização levou inclusive a um aumento da enantiosseletividade do produto.^{72,73,74}

Um exemplo destes trabalhos foi apresentado por Pilissão e Nascimento, onde foi realizada a resolução, via aminólise, do (*R,S*)-mandelato de metila (**18**) com *n*-butilamina (**19**) catalisada pela lipase B de *Candida antarctica* (CALB) em uma mistura de solventes orgânicos/líquidos iônicos (10:1 v:v).⁷⁵ (**Figura 21**)



solvente	c (%) - 14	ee _s (%)	ee _p (%)	E	configuração
CHCl ₃	26	92	75	22	<i>S</i>
CHCl ₃ /[Bmim][BF ₄]	14	1,5	>99	>200	<i>S</i>
CHCl ₃ /[Bmim][PF ₆]	21	95	>99	>200	<i>S</i>

Figura 21 – Resolução do (*R,S*)-mandelato de metila, via aminólise com *n*-butilamina, catalisada pela lipase B de *Cândida antarctica*.

Pode-se observar, através dos resultados apresentados na **Figura 21**, um grande aumento no excesso enantiomérico da amida foi obtido devido, principalmente ao uso dos líquidos iônicos. Este aumento, como explicam os autores, está diretamente ligado

às diferenças nas propriedades físico-químicas dos LIs empregados, como polaridade, hidrofobicidade, nucleofilicidade do ânion e viscosidade.^{72,73,75}

O aumento da atividade catalítica na presença de hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazólio [BMIm][PF₆] pode estar relacionado ao fato deste ser hidrofóbico enquanto que o tetrafluoroborato de 1-butil-3-metil imidazólio [BMIm][BF₄] é altamente hidrofílico, devido a natureza de seus ânions associados aos cátions orgânicos comuns. Um comportamento semelhante foi observado em solventes orgânicos apolares em processos biocatalíticos.⁷⁶

Em outro trabalho recente, realizado por Katsoura *e col.*, a maior hidrofilicidade do [BMIm][BF₄] em relação ao [BMIm][PF₆] acarretou em aumento da atividade da CALB, quando esta foi utilizada como biocatalisador na acilação de compostos polihidroxiados com butirato de vinila para obtenção dos ésteres de helicina (**22**), esculina (**23**), naringina (**24**), salicina (**25**).⁷⁷ (Figura 22)

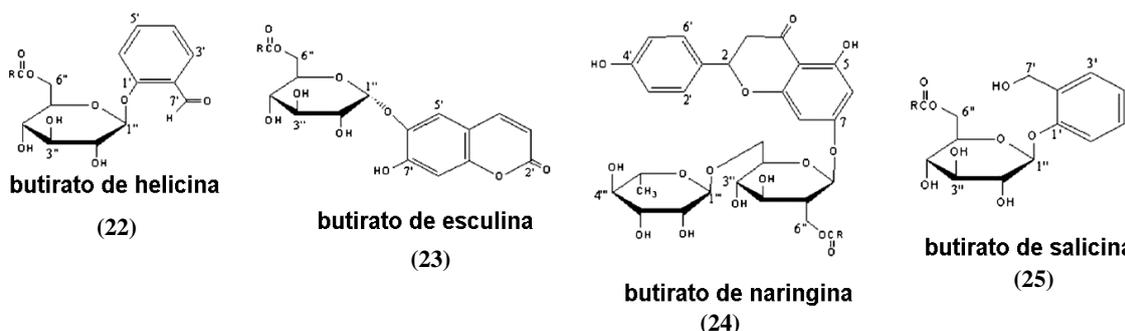


Figura 22 – Produtos obtidos na acilação da helicina, esculina, naringina e salicina com butirato de vinila catalisada pela CALB em LIs.

No trabalho de Katsoura *e col.*, as reações realizadas em [BMIm][BF₄] apresentaram velocidades de formação dos compostos acilados da esculina, naringina, salicina e helicina, de 0,42, 0,57, 0,80 e 1,53 mmol.h⁻¹.g⁻¹ de biocatalisador,

respectivamente enquanto que as realizadas em [BMIm][PF₆] apresentaram velocidades de 0,25, 0,54, 0,48 e 1,00 mmol.h⁻¹.g⁻¹.

Estes resultados estão provavelmente relacionados à maior solubilidade dos substratos poliidroxilados no LI mais hidrofílico, permitindo que estes alcançassem o sítio ativo da enzima mais rapidamente.

Contudo, de acordo com Yang a atividade catalítica das enzimas está mais relacionada à viscosidade dos LIs do que à sua polaridade, tornando inadequado a utilização de um único parâmetro para descrever o comportamento do efeito dos LIs na atividade enzimática.⁷⁸

Os LIs possuem, obviamente, potencial para serem utilizados como meio reacional para substratos altamente polares, além de terem apresentado aumento da estabilidade térmica e da regio ou enantiosseletividade em muitos casos.^{72,73}

A troca de solventes voláteis por LIs não voláteis provavelmente continuará, sendo adotado gradualmente pela indústria química. O desenvolvimento de LIs mais baratos poderá estimular seu uso em biotransformações industriais.^{72,73}

Contudo, ainda não há base teórica para predição da compatibilidade de LIs, aquosos ou anidros e enzimas. Além disso, como citado anteriormente, poucos são os trabalhos que apresentam dados sobre a toxicidade e impactos ambientais por eles gerados, mas espera-se que o interesse crescente neste assunto cause um desenvolvimento nas pesquisas nestas áreas.^{40, 72,73}

As propriedades físico-químicas apresentadas pelos LIs tornam estes solventes meios promissores para realização de biotransformações de substratos como os produtos naturais, que serão revisados no tópico a seguir. Estes processos, possivelmente, menos agressivos vão de encontro às necessidades ambientais e da chamada “Química Verde”.

1.4 – Produtos Naturais

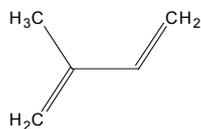
Desde a antigüidade, especiarias e resinas de origem animal e de plantas tem sido intensamente usadas pelas perfumarias com propósitos de se obter aromas. Na natureza existe uma grande variedade de materiais aromáticos que alternam de misturas muito complexas a compostos simples. A sua história começou quando a humanidade descobriu que os componentes característicos do aroma de produtos naturais podiam ser melhorados através de métodos simples. Receitas para a extração do óleo de oliveira por destilação surgiram na época antes de Cristo.⁷⁹

Produtos naturais são compostos orgânicos formados pelos seres vivos. Por milhares de anos, o homem tem isolado e usado produtos naturais vegetais. Exemplos são os “óleos essenciais”, compostos oriundos de folhas, caules, flores ou ramos que possuem o odor ou aroma da planta. Eles têm sido usados na fabricação de perfumes e fármacos.⁸⁰ Entretanto, a maioria dos aromas ou fragrâncias de ocorrência natural, freqüentemente resulta da combinação de um grande número de constituintes, os quais podem ser separados e identificados pela combinação de cromatografia-gasosa e técnicas analíticas, como a espectrometria de massas.⁸¹ Entre estes principais constituintes dos produtos naturais encontram-se os derivados do isopreno.

1.4.1 - Isoprenóides

A unidade de isopreno (2-metil-1,3-butadieno (**26**)) é um dos blocos de construção favoritos da natureza. Por exemplo, quase todos os terpenos (existentes nos óleos essenciais de muitas plantas) têm esqueletos de carbono constituídos por unidades

de isopreno ligadas cabeça a cauda, de maneira regular. O reconhecimento deste fato - a chamada regra do isopreno - tem sido de grande utilidade na determinação das estruturas dos terpenos.⁹

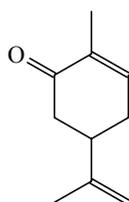


Isopreno (26)

1.4.2 – Terpenóides

Os terpenos são os componentes mais importantes dos óleos essenciais. A maioria deles contém 10, 15, 20 ou 30 átomos de carbono. Eles são derivados de unidades de cinco átomos de carbono, o isopreno.^{9,79}

A carvona (27), é um exemplo de terpeno. Ela é formada de duas unidades de isopreno interligadas para formar um anel.



Carvona (27)

Outros exemplos de terpenos incluem o selineno, obtido do óleo de aipo e do óleo de terebentina e o farnesendo do óleo de citronela.⁸²

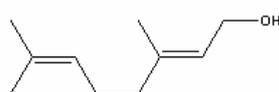
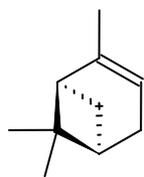
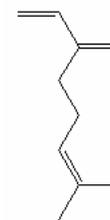
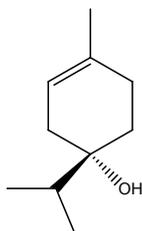
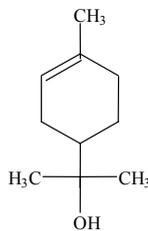
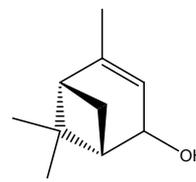
A maioria dos terpenos é volátil, isto é, eles evaporam facilmente. A exalação de terpenos pelas plantas e árvores é uma fonte natural de hidrocarbonetos na atmosfera. Exalações pelos automóveis são as maiores fontes artificiais. A neblina que às vezes se forma sobre áreas de densa vegetação é devida a reações de terpenos no ar. Os

hidrocarbonetos da atmosfera podem também ser convertidos nos compostos irritantes presentes na “neblina enfumaçada” (“*smog*”).⁷⁹

Dependendo do número de unidades de isopreno, os terpenos são classificados:

- Monoterpenos: $C_{10}H_{16}$
-dividido em acíclico, monocíclico e bicíclico.
- Sesquiterpenos: $C_{15}H_{24}$
-dividido em acíclico, monocíclico, bicíclico e tricíclico.
- Diterpenos: $C_{20}H_{32}$
-dividido em acíclico, monocíclico, bicíclico e tricíclico.
- Triterpenos: $C_{30}H_{48}$
- a maioria dos triterpenos é acíclico, tetracíclico e pentacíclico.
- Tetraterpenos: $C_{40}H_{64}$
- Politerpenos: $(C_5H_8)_n$

Alguns exemplos de terpenos encontrados comercialmente são o geraniol (**28**), (+)-pineno (**29**), (+)-3-careno (**30**), mirceno (**31**), (+)-terpineno-4-ol (**32**), (α) terpineol (**33**), cis-verbenol (**34**):

Geraniol (**28**)(+)-Pineno (**29**)(+)-3-Careno (**30**)Mirceno (**31**)(+)-Terpineno-4-ol (**32**)(α)-Terpineol (**33**)cis-Verbenol (**34**)

Os terpenos têm sido amplamente utilizados terapeuticamente e são empregados como inaladores (p.ex. óleo de eucalipto), administrados via oral (p.ex. óleo de menta) e como enxágües bocais (p.ex. timol). Vários óleos essenciais também são utilizados atualmente em aromaterapia. O óleo do cravo e o de tomilho são usados como antissépticos, devido as suas altas concentrações de fenóis.

Os terpenos são também utilizados como agentes flavorizantes (p.ex. óleo de limão) e na perfumaria (p.ex. óleo de rosa). Além desses usos, estes compostos exibem excelente efeito de aumento na permeabilidade cutânea o que facilita o transporte transdérmico de fármacos, tanto lipofílicos quanto hidrofílicos.⁸³

A derivatização desses terpenos é uma forma interessante de obtenção de materiais de partida para síntese de produtos mais complexos.

Para este propósito, a formação químio-enzimática de epóxidos de terpenos pode se tornar uma ferramenta bastante útil, devido à baixa toxicidade e condições reacionais brandas necessárias para este processo. Os epóxidos são compostos que apresentam elevada reatividade devido a suas características físico-químicas. No tópico seguinte serão revisadas algumas dessas propriedades.

1.5 - Epóxidos

Os epóxidos (**35**) são uma sub-classe de éteres, pois possuem unidade C-O-C. Contudo, o termo epóxido ou oxirano*, é usado para descrever o sistema heterocíclico de três membros, contendo dois carbonos e um oxigênio. Estes átomos estão ligados entre si através de ligações σ . As ligações C-O são polares devido à alta eletronegatividade do átomo de oxigênio.⁸⁴



(35)

A síntese dos epóxidos possui rotas variadas, e dentre estas, destacam-se as via perácidos e a epoxidação nucleofílica que são as mais utilizadas em laboratórios de síntese orgânica. Estas e outras formas de epoxidação serão discutidas na seção sobre epoxidação.⁸⁴

Os oxiranos diferem significativamente, tanto nas propriedades físicas quanto químicas, de seus análogos alifáticos e alicíclicos de cadeias longas. A característica principal destas moléculas é o pequeno ângulo de ligação endocíclica ($\sim 60^\circ$), imposto pelo anel de três membros ao carbono tetracoordenado e ao oxigênio dicoordenado. Os ângulos de ligação para estas espécies em cadeias abertas estão em torno de 109° . Este é um fator desestabilizante, contribuindo para a tensão total inerente do sistema. O calor de formação (ΔH_f) de alguns éteres está demonstrado na **Tabela 3**.⁸⁴

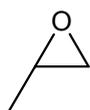
* Oxirano é o termo utilizado pela IUPAC.

Tabela 3 – Calor de formação de alguns éteres.

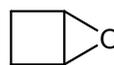
Fórmula	Nome	ΔH_f^*
(36) C ₂ H ₄ O	oxirano	-52,6 (gás)
(37) C ₃ H ₆ O	metiloxirano	-94,7 (gás)
(38) C ₄ H ₆ O	2,3-diidrofurano	-109,1 (liq.)
(39) C ₅ H ₈ O	6-oxabicyclo[3.1.0]hexano	-130,8 (liq.)
(40) C ₆ H ₁₀ O	7-oxabicyclo[4.1.0]heptano	-223,9 (liq.)
(41) C ₂ H ₆ O	éter dimetílico	-184,1 (gás)
(42) C ₃ H ₈ O	éter metil etílico	-216,4 (gás)
(43) C ₄ H ₈ O	tetraidrofurano	-216,2 (liq.)
(44) C ₄ H ₁₀ O	éter dietílico	-279,3 (liq.)
(45) C ₅ H ₁₀ O	tetraidropirano	-258,3 (liq.)
(46) C ₅ H ₁₂ O	éter etil propílico	-303,6 (liq.)
(47) C ₆ H ₁₄ O	éter di- <i>n</i> -propílico	-328,8 (liq.)

* valores em kJ.mol⁻¹

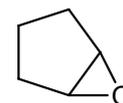
(36)



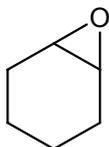
(37)



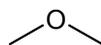
(38)



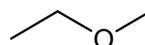
(39)



(40)



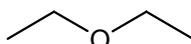
(41)



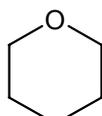
(42)



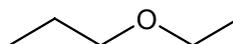
(43)



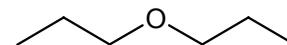
(44)



(45)



(46)



(47)

A maior reatividade dos epóxidos em relação aos éteres comuns está diretamente ligada a sua tensão conformacional, que é aliviada por ataques nucleofílicos ao carbono da ligação C-O causando a quebra da mesma e conseqüente abertura do anel. Esta reatividade diferenciada torna os epóxidos substâncias de grande interesse sintético,

pois estes podem reagir com uma grande variedade de nucleófilos formando uma série de produtos, tipicamente álcoois 2-substituídos.⁸⁴

As reações de clivagem do anel oxirano são extremamente úteis em síntese orgânica (p. ex., na síntese do propileno glicol (**48**)) e de outros processos industriais como demonstrado na **Figura 23**.⁸⁵

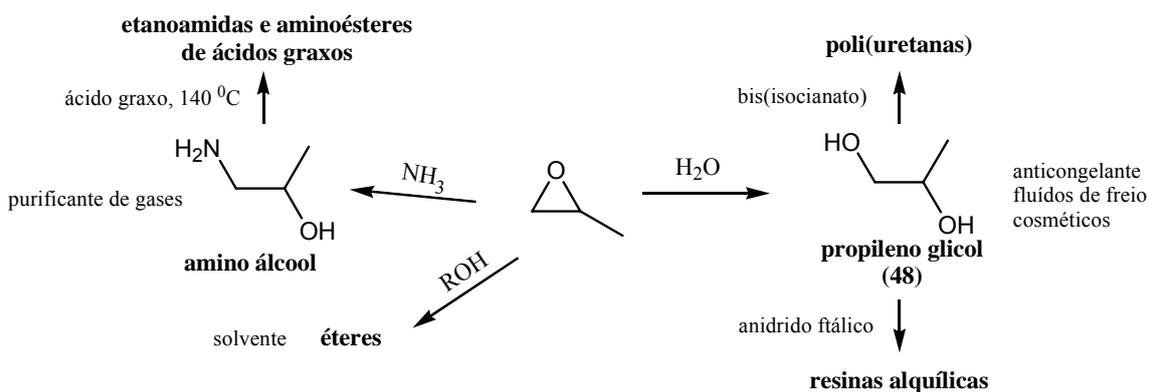
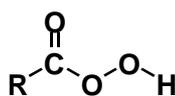


Figura 23 – Aplicações industriais do óxido de propileno.

Uma das formas mais utilizadas para obtenção de epóxidos é através da oxidação de compostos que contenham ligação dupla carbono-carbono por peróxido-ácidos, sendo que estes oxidantes podem ser obtidos através de uma reação de peridrólise, como demonstrado na **Figura 12** (pág. 18). Algumas formas de obtenção e propriedades destes compostos serão discutidas a seguir.

1.6 – Peróxi-Ácidos

Os perácidos (**49**), ou peróxi-ácidos, são ácidos que possuem grupamento peróxido (-OOH).⁸⁴



(49)

O peróxido de hidrogênio não é suficientemente eletrofílico para epoxidar diretamente as olefinas e sua reatividade pode ser aumentada pela introdução de grupos retiradores de elétrons como mostrado nos perácidos (50) – (53).



(50)



(51)



(52)



(53)

Estes compostos são oxidantes importantes em síntese orgânica assim como na indústria química. A oxidação mais comum, promovida pelos perácidos é a epoxidação de ligações C=C, mas estes também são utilizados em oxidações de Baeyer-Villiger e em numerosas oxidações catalisadas por metais de transição.⁸⁶

Apesar de sua importância como agente oxidante, o número de peróxi-ácidos disponíveis para síntese orgânica é muito limitado. Os ácidos perfórmico e peróxi trifluor-acético são formados *in situ* a partir dos correspondentes ácidos e peróxido de hidrogênio, enquanto que os ácidos peracético e *m*-cloroperbenzóico (*m*CPBA), o sal de magnésio do ácido monoperóxi-ftálico e a oxona são produtos comerciais.^{84,87,88}

A produção químico-enzimática dos peróxi-ácidos, catalisada por lipases, é atraente porque fornece aos químicos orgânicos sintéticos um oxidante importante em

condições brandas (temperatura ambiente, pH neutro), permitindo assim que as reações de oxidação ocorram *in situ*, sem a necessidade de se isolar o perácido.⁸⁹

Estas reações podem ser feitas em sistema bifásico água/solvente orgânico, o que torna o isolamento de produtos de baixa polaridade por vezes mais fácil e evita, ou pelo menos diminui a desnaturação da lipase, pois a enzima fica dissolvida na fase aquosa tendo pouco contato com o solvente orgânico.^{89,90}

Existem várias reações nas quais os perácidos são utilizados como agentes oxidantes e dentre elas podem-se destacar as reações de epoxidação.

1.7 - Epoxidação

A epoxidação é uma reação fundamental e importante em química orgânica e tem sido estudada extensivamente. A reação consiste na inserção de átomos de oxigênio em uma molécula para formação de um anel de três membros.

Normalmente não é fácil introduzir moléculas de oxigênio (p.ex., O₂) diretamente como mostrado na **Figura 24**.

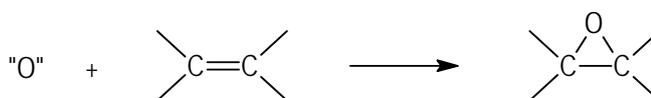


Figura 24 – Representação da inserção direta de oxigênio em alcenos.

Dioxigênios são reduzidos a peróxido de hidrogênio e estes por sua vez são ativados pela introdução de substituintes apropriados. Um exemplo típico é o perácido

carboxílico, RCO_3H , que demonstra aumento de eletrofilicidade devido ao grupamento acila que é receptor de elétrons.⁸⁴

Várias são as aplicações das reações de epoxidação, p.ex. na síntese de fármacos, hormônios e aromas. Muitos epóxidos, principalmente de terpenos, são constituintes de hormônios juvenis de insetos, feromônios e de fragrâncias naturais. P.ex., éteres aromáticos do 6,7-epoxigeraniol foram identificados como um hormônio juvenil potente em vários bezouros, o 2,3-epoxigeraniol e seu correspondente acetato são parte do feromônio odorífero de zangões da orquídea neotropical, enquanto que o 2,3-epoxinerol é usado pelos ácaros como feromônio sexual. Além disso, epóxidos derivados de terpenos acíclicos vêm sendo utilizados como blocos de construção valiosos, p.ex. na síntese de produtos como, o antibiótico (+)-tuberina, o diterpenóide peucelinendiol, decalinas e da α -damascona (**55**) como demonstrado na **Figura 25**.^{91,92}

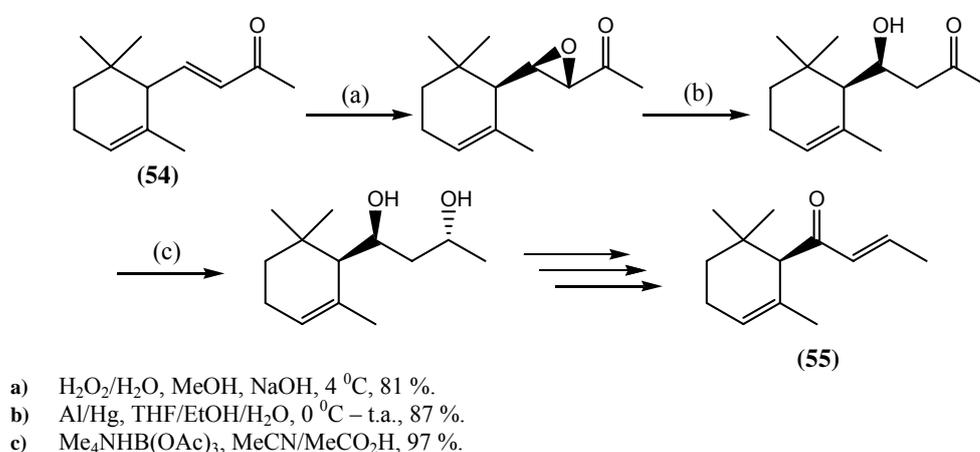


Figura 25 – Síntese da (α) -damascona (**55**) a partir da (α) -ionona (**54**).⁹²

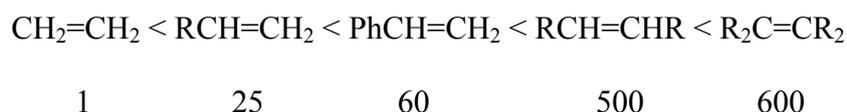
As epoxidações de olefinas são reações sintéticas e industriais importantes. Estas reações eletrofílicas têm sido repetidamente aplicadas e constantemente revisadas, e

várias rotas sintéticas para obtenção dos epóxidos estão descritas na literatura e uma das formas mais utilizadas para este fim é a epoxidação eletrofílica por perácidos.⁹³

1.7.1 - Epoxidação Eletrofílica por Perácidos

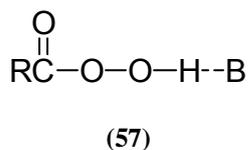
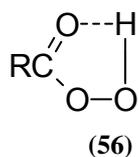
A principal característica dessa reação é que a epoxidação é acelerada pelo aumento da densidade eletrônica na ligação C=C e por grupos retiradores de elétrons nos perácidos. Esta escala de reatividade se deve ao fato de que os perácidos orgânicos são espécies eletrofílicas. A presença, na ligação dupla C-C, de substituintes que doem elétrons (p.ex., grupos alquilas) aumentam a densidade eletrônica na mesma, favorecendo o ataque do perácido e a conseqüente transferência do oxigênio.⁹⁴

A escala de reatividade relativa (R=alquil) representada abaixo, é importante para se prever a seletividade dos produtos.⁸⁴



As velocidades de epoxidação são significativamente reduzidas por substituintes retiradores de elétrons na ligação dupla C-C e pela presença de solventes capazes de se coordenar com os perácidos através de ligações intermoleculares de hidrogênio, por exemplo, éteres e acetatos.

A ligação intramolecular de hidrogênio (**56**) foi evidenciada por técnicas de infravermelho e momento dipolar. Nestes solventes os perácidos existem como complexo (**57**) com ligações intermoleculares de hidrogênio.⁸⁴



Portanto os efeitos do solvente são importantes nas reações de epoxidação por perácidos. Por exemplo, as velocidades de epoxidação em éter ou acetato de etila são aproximadamente 10 vezes mais lentas que em benzeno ou clorofórmio. As epoxidações muito mais lentas de perácidos com ligações intermoleculares (57) sugerem a importância do estado de transição cíclico (58), mostrado na **Figura 26**.⁸⁴

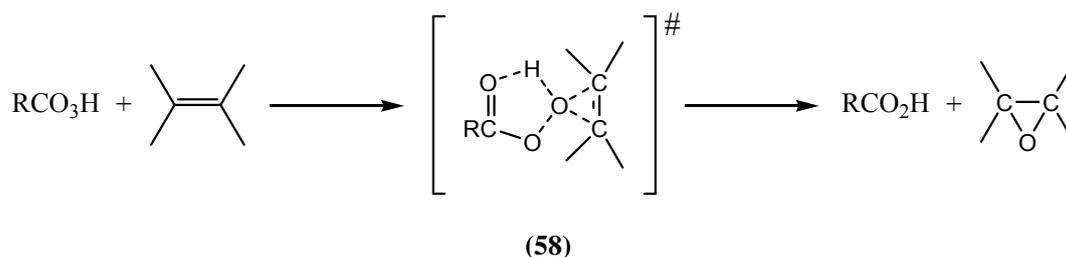


Figura 26 – Mecanismo de epoxidação de alcenos via perácidos.

A eletrofilicidade de vários hidroperóxidos pode variar em muitas ordens de magnitude desde o peróxido de hidrogênio até o perácido carboxílico, como exemplificado na **Figura 27**, onde estão representadas as velocidades de reação relativas de diversos hidroperóxidos para a oxidação do sulfeto para sulfóxido.⁸⁴

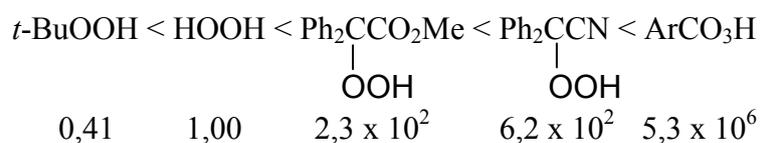
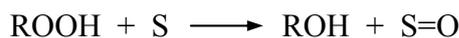


Figura 27 – Velocidades relativas de oxidação de diversos hidroperóxidos para a oxidação do sulfeto para sulfóxido

O aumento da velocidade de oxidação relativa observada através dos dados mostrados na **Figura 27**, está diretamente ligado aos grupos retiradores de elétrons presentes no perácido que aumentam o caráter eletrofílico, tornando a reação de substituição nucleofílica promovida pelo sulfeto mais eficiente.

Quando grupos de coordenação, como a hidroxila no 3-cicloexen-1-ol (**59**), estão disponíveis nas olefinas, esta ligação intermolecular de hidrogênio com os perácidos leva a uma epoxidação *syn*-seletiva. Um exemplo típico é a epoxidação *syn* de álcoois alílicos cíclicos.⁸⁴ (**Figura 28**)

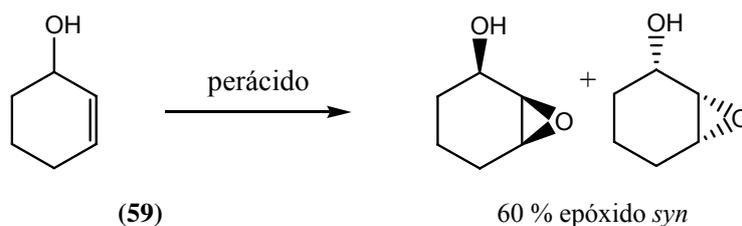


Figura 28 – Epoxidação *syn* seletiva do (±) 3-cicloexen-1-ol.

É interessante notar que um efeito cooperativo da ligação de hidrogênio foi observado na epoxidação de álcoois alílicos acíclicos. Uma epoxidação seletiva pode ser realizada *via* ligação de hidrogênio cooperativa (**60**) como pode ser observado na **Figura 29**.⁸⁴

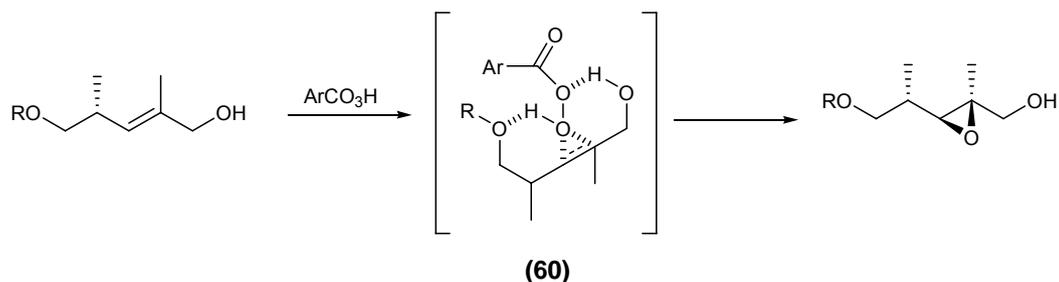


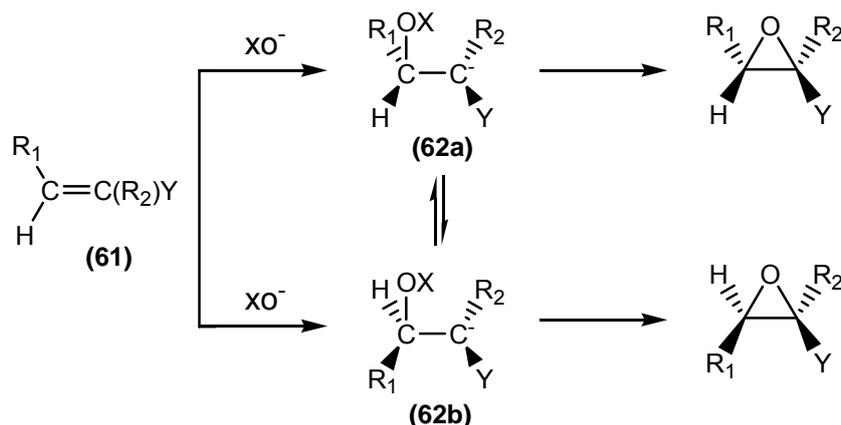
Figura 29 – Efeito cooperativo de grupos de coordenação na reação de epoxidação.

A utilização de perácidos para obtenção de epóxidos de olefinas, que possuem ligações duplas C-C ricas em elétrons é talvez o método mais utilizado na síntese orgânica. Contudo, quando estas olefinas possuem ligações duplas deficientes de elétrons, outros métodos sintéticos devem ser empregados para obtenção dos epóxidos com rendimentos satisfatórios e uma dessas metodologias é a epoxidação nucleofílica.

1.7.2 - Epoxidação Nucleofílica

Alcenos, nos quais as ligações duplas estão conjugadas com grupos retiradores de elétrons podem ser prontamente epoxidados com a utilização de reagentes nucleofílicos em meio alcalino.⁹⁵

A reação de íons hidropéroxido com olefinas deficientes de elétrons ((**61**), Y = COR, CO₂R, CN, etc) é conhecida como epoxidação alcalina ou nucleofílica (ou epoxidação de Weitz-Scheffer).⁸⁴ (**Figura 30**)



Y = COR, CO₂R, CN

Figura 30 – Reação de epoxidação nucleofílica.

Notadamente este tipo de epoxidação, ao contrário da realizada com perácidos, é estereosseletiva. Logo ambos isômeros *E* e *Z* de (61) levariam ao mesmo epóxido.⁹⁵

Epoxidações estereosseletivas ou específicas podem ser obtidas simplesmente pela variação do hidroperóxido empregado na reação. Quando se utiliza um peróxido de hidrogênio alcalino (X = OH), é estabelecido um equilíbrio entre os intermediários de Michael (62a e 62b) e o *trans*-epóxido é obtido estereosseletivamente pela ciclização intramolecular do conformero mais estável 62b. Contudo uma estereoespecificidade pode ser obtida se a ciclização de 62 for mais rápida que sua isomerização. Casos como estes foram observados com a utilização de hidroperóxidos com o grupo X de elevada nucleofugacidade (capacidade de “saída” do grupo), p.ex. hipoclorito (X = Cl) e ânions peroxicarboxilatos (X = RCO) e com a diminuição do potencial de atração eletrônica do grupo Y.⁸⁴

Uma epoxidação alcalina típica é conduzida com peróxido de hidrogênio ou com hipoclorito de sódio na presença de hidróxido de sódio ou de potássio em água ou em solução aquosa de metanol. Por exemplo, o trabalho apresentado por Sakakibara *e col.* onde foi realizada a epoxidação do 3-C-ciano-β-D-2-enopiranosídeo (63) com peróxido

de hidrogênio e hidróxido de sódio para formação do derivado **(64)** com rendimento quantitativo.^{84,96} **(Figura 31)**

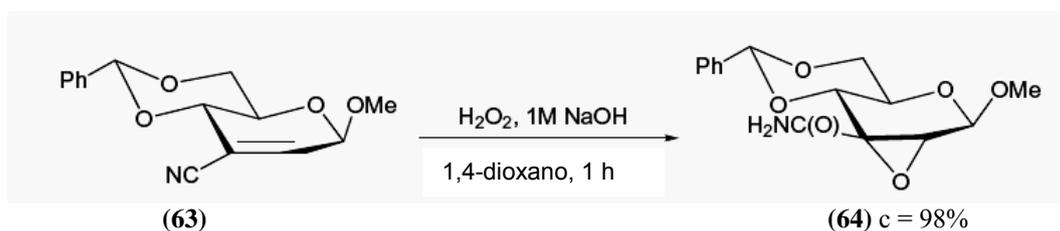


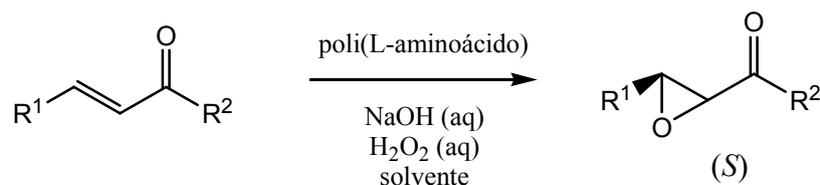
Figura 31 – Epoxidação nucleofílica do 3-C-ciano-β-D-2-enopiranosídeo.⁹⁶

A epoxidação nucleofílica é um excelente método para obtenção de epóxidos a partir de compostos α,β -insaturados derivados de aldeídos, nitro compostos e cetonas; sendo que este último também foi utilizado como substrato para o desenvolvimento de uma nova técnica de epoxidação catalisada por aminoácidos.⁹⁵

1.7.3 – Epoxidação Catalisada por Aminoácidos

A idéia original do uso de poli(L-alanina) (PLA) ou poli(L-leucina) (PLL) como catalisadores para epoxidação de cetonas α,β -insaturadas pode ser atribuída a Juliá (Barcelona) e Colonna (Milão). As equipes de pesquisadores estudaram esta reação no início dos anos 80.^{97,98}

A reação de Juliá-Colonna é realizada em um meio trifásico, obtido através de um catalisador poli(aminoácido) insolúvel, solução aquosa de NaOH e H₂O₂ e uma solução de chalcona em um solvente orgânico. A técnica foi utilizada pelos autores e outros grupos de pesquisa para preparação de um grande número de epóxidos como demonstrado na **Figura 32**.⁹⁹

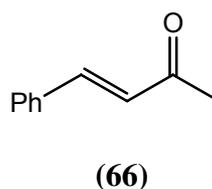
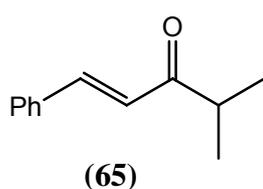


R ¹	R ²	catalisador	c(%)	ee(%)
Ph	Ph	PLA	85	93
Ph	2-tienil	PLA	96	80
Ph	2-naftil	PLL	90	93
4-piridil	2-naftil	PLL	67	>96
Ph	<i>t</i> -butila	PLL	92	>98
<i>t</i> -BuO ₂ C	Ph	PLL	66	≥95

Figura 32 – Epoxidação assimétrica de cetonas α,β -insaturada catalisada por poli(L-aminoácidos).

Uma característica importante na epoxidação de Juliá-Colonna é que o catalisador insolúvel pode ser facilmente separado dos produtos reacionais, lavado e reutilizado. Contudo, após freqüentes reutilizações foi observada uma redução na enantiosseletividade, um fenômeno que ocorre devido à degradação do catalisador sob um meio reacional fortemente alcalino.⁹⁹

Entre as limitações do método de Juliá-Colonna está o tempo reacional; e mesmo substratos relativamente reativos como chalconas e seus derivados simples, requerem pelo menos 24 h para uma conversão completa. Compostos menos reativos também geram produtos com baixos rendimentos e excessos enantioméricos ou não apresentam a formação do epóxido. Particularmente substratos “enolizáveis”, como **(65)** (c = 60%, ee = 62%) e **(66)** foram ruins para reações no sistema trifásico.⁹⁹



As limitações de reciclagem do catalisador e de baixa reatividade foram superadas por modificações apresentadas por Adger *e col.*. Procedimentos em sistema bifásicos foram desenvolvidos e reduziram o tempo reacional de chalconas para menos de 30 min. O primeiro uso desses sistemas era essencialmente anidro.¹⁰⁰ O peróxido utilizado era proveniente do complexo uréia-peróxido de hidrogênio (UPH). Tais complexos são baratos, estáveis, fáceis de manusear e mais seguros que soluções concentradas de H₂O₂. A base inorgânica utilizada por Juliá e Colonna foi trocada pelo 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) e a reação realizada em THF. (**Figura 33**)⁹⁹

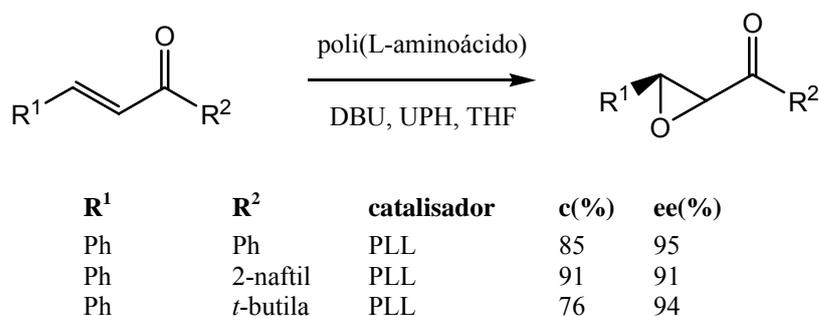


Figura 33 - Epoxidação assimétrica de cetonas α,β -insaturada catalisada por poli(L-leucina) (PLL); reação de Juliá-Colonna modificada.

Este sistema bifásico se tornou um dos métodos mais testados e confiáveis de epoxidação catalisada por poli(aminoácidos). Exemplos descritos pelo autor tipicamente utilizam a PLL, contudo reações que utilizaram a poli-L-neopentilglicina demonstraram aumento na velocidade e enantiosseletividade da reação.⁹⁹

Uma das desvantagens, dos sistemas bifásicos citados acima, é que estes são menos atrativos financeiramente que o sistema trifásico de Juliá-Colonna devido ao uso de 1,5 equivalentes de DBU, um oxidante de preço elevado. Não foram obtidos bons

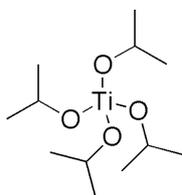
resultados com o uso estequiométrico deste reagente, logo esta condição não se mostrou ideal para produção em larga escala.⁹⁹

Outra técnica de obtenção de epóxidos quirais bastante estudada nos centros acadêmicos são as reações catalisadas por complexos metálicos.

1.7.4 – Epoxidação Catalisada por Complexos Metálicos

O químico norte-americano Barry Sharpless ganhou o Prêmio Nobel de 2001 pela sua grande contribuição no campo da epoxidação assimétrica, a qual é reconhecida como uma das técnicas mais importantes dos últimos 30 anos. Esta descoberta foi fundamental para expansão da síntese assimétrica permitindo a obtenção de mais fármacos, como antibióticos, antiinflamatórios e outros medicamentos.¹⁰¹

No início dos anos 80, Sharpless *e col.* utilizaram ligantes quirais complexados a metais de transição Mo, Ti e V, sendo essa técnica posteriormente conhecida como epoxidação assimétrica de Sharpless. Eles converteram com sucesso álcoois alílicos em epóxidos assimétricos com altas conversões e mais de 90 % de excesso enantiomérico, através da utilização de catalisadores de metais de transição (tetraisopropóxido de titânio, $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$ - **67**) e hidroperóxido de *terc*-butila (TBHP) como oxidante associados à um aditivo quiral (tartarato de dietila, DET).¹⁰²



(67)

As primeiras tentativas de epoxidação de álcoois alílicos produziram epóxidos com ees menores que 20 %, mas com a utilização hidroperóxidos derivados de açúcares foram obtidos altas enantiosseletividades (>50 %). Contudo, este sistema possui algumas limitações, um baixo *turnover number*[‡] do catalisador, o qual estimulou o interesse na busca de catalisadores mais eficientes.¹⁰¹

Makita *e col.* prepararam complexos quirais de vanádio (**68**), que demonstraram maior eficiência na epoxidação de álcoois alílicos dissustituídos com ee >96 % e rendimentos quantitativos. Em 2003, o mesmo grupo de pesquisa descreveu novamente que estes catalisadores quirais poderiam também ser usados para epoxidação assimétrica de álcoois homoalílicos 3-monosustituídos com alta enantiosseletividade (ee = 84-91%) e com rendimentos moderados (42-89 %), como demonstrado na **Figura 34**.¹⁰³

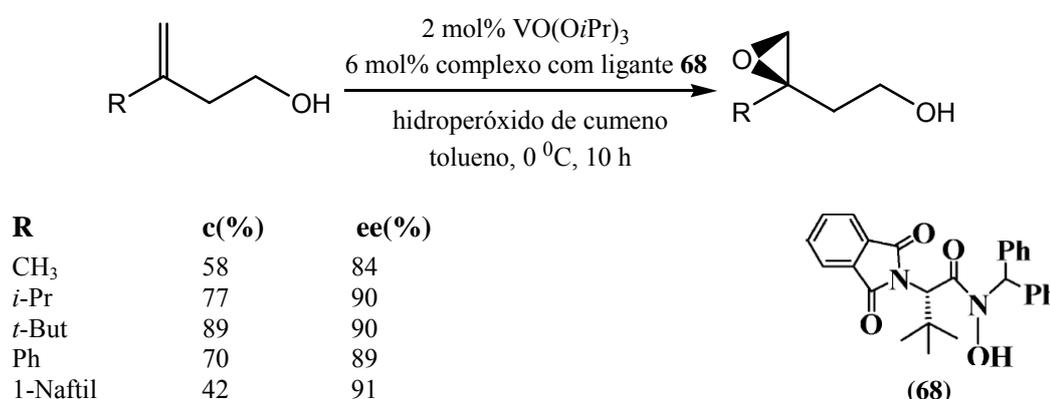


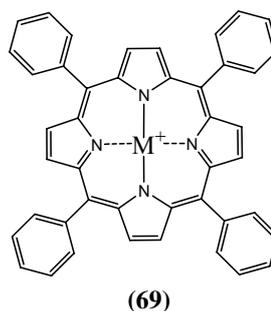
Figura 34 – Epoxidação assimétrica de álcoois homoalílicos catalisada por complexos de vanádio.

Complexos porfirínicos também têm sido amplamente investigados como ligantes para estabilização de metais para evitar a decomposição indesejada e regular a reatividade dos mesmos. Em alguns casos, metaloporfirinas quirais podem catalisar a

[‡] *Turnover number* (TON) é o número de moles de substratos que um mol de catalisador converte antes de ser inativado.

oxidação de derivados de estireno com bons valores de excesso enantiomérico, mas baixos rendimentos.^{101,104}

Vários são os metais complexados com metaloporfirinas com para utilização em epoxidação, entre estes talvez os mais estudados sejam os de ferro e manganês; como no estudo realizado por *Costa e col.*, onde foram utilizados complexos de tetrafenilporfírina (**69**).^{101,105}



Os pesquisadores utilizaram esses complexos suportados em MCM-41[§] como catalisadores na oxidação do cicloexeno, a **Figura 35** apresenta alguns dos resultados obtidos para esta reação.¹⁰⁵

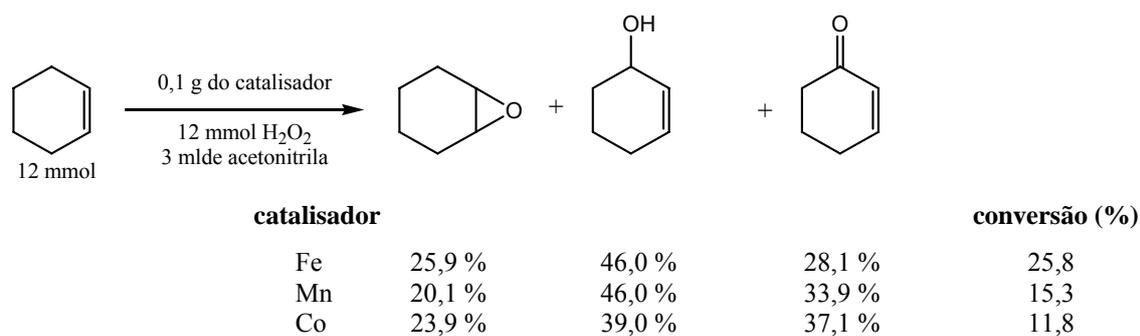
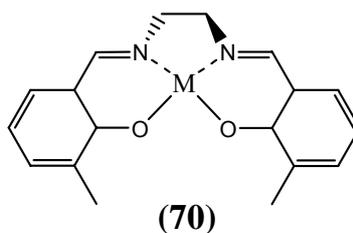


Figura 35 - Comportamento catalítico de complexos de metaloporfirinas suportados em MCM-41 na reação de epoxidação do cicloexeno.

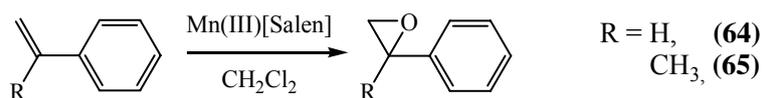
[§] Mobil Composition of Mater – é uma peneira molecular mesoporosa utilizada em catálise heterogênea, com poros de tamanho uniforme, de elevadas área superficial e capacidade de absorção.

Observa-se através da **Figura 35** que as reações catalisadas pelos complexos estudados apresentaram valores baixos de seletividade e conversão. Porém os catalisadores demonstraram altos valores de TON, sendo 1.76×10^4 , 1.54×10^5 e 2.93×10^3 (mmol de produto/mmol de metal complexado) para o ferro, manganês e cobalto respectivamente. Estes últimos resultados demonstraram a atividade catalítica acentuada desses complexos, contudo um melhor controle na seletividade dos produtos deve ser investigado para que o processo tenha aplicações sintéticas práticas.¹⁰⁵

Outro grupo de complexos organometálicos bastante utilizado em epoxidações seletivas são os catalisadores de Salen que apresentam uma estrutura básica do tipo **(70)**, seus ligantes (p.ex., *N,N'*-etileno-bis(salicilidenoaminato)) são mais estáveis e solúveis que as porfirinas e possibilitam a presença de carbonos estereogênicos próximos aos centros catalíticos. Devido à localização destes centros estereogênicos, podem ser obtidas melhores induções assimétricas pela utilização de complexos de Salen oticamente ativos como catalisadores.^{84,101}



O trabalho realizado por Zhao *e col.*, apresenta reações catalisadas por complexos de Mn(III)[Salen], utilizando *m*CPBA e NaClO como oxidantes na epoxidação de ligações duplas de alcenos não funcionalizados.¹⁰⁶ (**Figura 36**)



Substrato	Oxidante	Temper. (°C)	Tempo	Conv. (%)	ee (%)
64	<i>m</i> CPBA	-78	20 min	99	37
64	NaClO	0	7 h	44	20
65	<i>m</i> CPBA	-78	20 min	93	51
65	NaClO	0	10 h	78	60

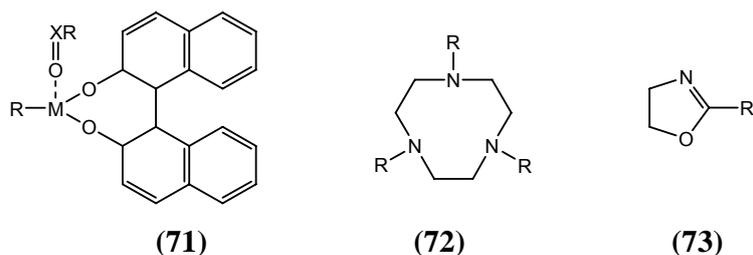
Figura 36 – Epoxidação de alcenos não funcionalizados por complexos de Salen.

Os resultados obtidos, demonstrados na **Figura 36**, revelaram que as reações com as olefinas terminais apresentaram boas conversões (44-99 %), mas baixos e.e. (20-60 %). Pôde também ser observado que o *m*CPBA levou a maiores valores de conversões e e.e. em um tempo menor (20 min) em relação ao NaClO (7-10 h). Uma das desvantagens do sistema que utiliza o *m*CPBA é a temperatura de -78 °C, enquanto que para o sistema com NaClO as temperaturas utilizadas foram de 0 °C.

Além do Mn(III), outros íons metálicos (Cr, Co, Pd, Ru) também podem ser complexados para formação dessas classe de catalisadores metalorgânicos.¹⁰¹

Os complexos de Salen são catalisadores efetivos para epoxidação assimétrica de olefinas conjugadas *cis*-di-, tri-, e algumas tetra-substituídas. Além disso, podem ser facilmente preparados, o que os tornam catalisadores atrativos para futuras aplicações industriais.^{101,104}

Vários outros complexos de coordenação catalisam a epoxidação de alcenos com H₂O₂, p.ex., binóis (**71**), 1,4,7-triazociclononanos (TACN) (**72**), oxazolinas (**73**) e compostos de coordenação de rutênio.^{101,104}



A utilização complexos metalorgânicos na síntese de epóxidos possui uma vasta literatura contendo diferentes métodos, ligantes e substratos. Contudo, ainda existem desafios nesta área, para que alguns desses processos sejam aplicáveis de forma prática, como a solubilidade destes catalisadores ou o coeficiente de partição entre em um meio contendo substratos aquosos (p.ex., soluções de H_2O_2) e o solvente orgânico e as recorrentes questões ambientais/toxicológicas de processos envolvem a utilização de catalisadores de complexos de coordenação metálicos.¹⁰⁴

Outra linha de pesquisa que utiliza biocatalisadores na obtenção de epóxidos, é a epoxidação químio-enzimática de olefinas descrita inicialmente por Björkling *e col.* no início dos anos 90.¹⁰⁷

1.7.5 – Epoxidação Enzimática de Alcenos

A biotransformação é uma ferramenta importante na síntese orgânica, especialmente para produção de moléculas quirais.

As oxigenases são enzimas que introduzem um ou dois átomos de oxigênio em uma molécula orgânica. Elas são catalisadores interessantes para síntese e biorremediação, pois reagem com uma grande variedade de substâncias orgânicas (**Figura 37**). Além disso, as oxigenases podem ser enantio-, químio- ou regioseletivas

e desta forma podem produzir compostos opticamente puros em reações onde catalisadores químicos não alcançam êxito.¹⁰⁸

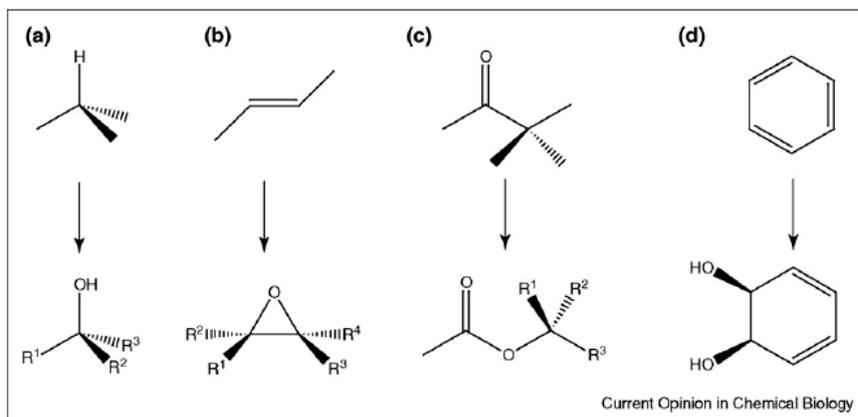


Figura 37 – Reações típicas catalisadas pelas oxigenases: (a) hidroxilação por monoxigenase, (b) epoxidação por monoxigenase, (c) oxidação de Baeyer-Villiger, (d) dioxigenação por dioxigenase.

Pinheiro e Marsaioli utilizaram células de *Trichosporum cutaneum* CCT 1903 para biotransformação de terpenos. Um dos compostos estudados foi a *cis*-jasmona (**74**). A reação foi realizada em um erlenmeyer contendo tampão fosfato de sódio. A mistura reacional foi agitada em um agitador orbital a 28 °C por 48 h.

O sistema reacional utilizado pelos pesquisadores está representado na **Figura 38**.¹⁰⁹

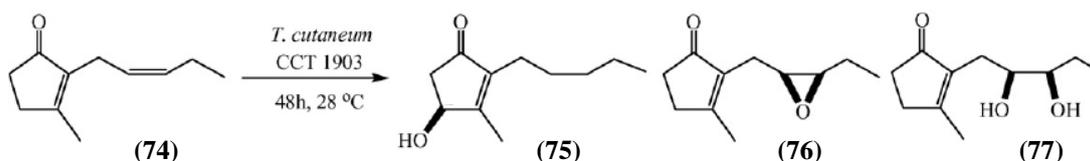


Figura 38 – Biotransformação da *cis*-jasmona nos produtos **75**, **76** e **77** usando células de *Trichosporum cutaneum* CCT 1903.

As análises realizadas pelos autores de CG revelaram a formação de 3,4 % da 4-hidroxijasmona (**75**), 13 % da 7,8-epoxijasmona (**76**) e 6,2 % da 7,8-diidroxijasmona (**77**). O epóxido (**76**) foi obtido com 94 % de configuração *cis* (ee = 92 %) e os outros 6 % de configuração *trans*, derivado da *trans*-jasmona presente como impureza na amostra comercial.

Eles demonstraram que a *T. cutaneum* CCT 1903, um microorganismo disponível comercialmente, apresentou uma elevada atividade de oxigenase.

Em outro trabalho, realizado por McClay *e col.*, foi testada a capacidade de diversos organismos produtores de tolueno monoxigenase para epoxidação de alcenos com cadeias alquílicas de 3 – 8 carbonos.¹¹⁰

Na **Figura 39** está representado um dos experimentos realizados pelos autores, onde uma cepa de *Escherichia coli* expressando o clone tolueno-2-monoxigenase (T2MO) de *B. cepacia* G4 foi utilizada na epoxidação do 1,3-butadieno.

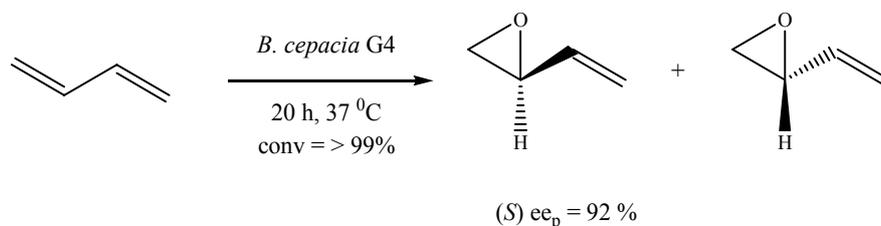


Figura 39 – Produção enzimática de monoepóxidos de 1,3-butadieno utilizando a tolueno-2-monoxigenase (T2MO) de *B. cepacia*.

Pode-se observar que o clone tolueno-2-monooxigenase (T2MO) de *B. cepacia* G4 foi capaz de oxidar o 1,3-butadieno formando o seu epóxido de forma seletiva ((S) ee_p = 92 %) com conversões quantitativas.

Estes e trabalhos são exemplos de sucesso na utilização de oxidases em processos de epoxidação seletiva de ligações duplas, porém o alto custo envolvido na obtenção comercial e na manipulação genética desses biocatalisadores ainda é uma dificuldade na sua utilização em processos sintéticos laboratoriais e industriais.

Outra possibilidade na utilização de biocatalisadores para obtenção de epóxidos é a epoxidação químio-enzimática. Neste processo são associados o uso de enzimas com doadores de grupos acila e peróxido para formação de peróxi-ácidos, e estes utilizados *in situ* na obtenção dos epóxidos.

1.7.6 – Epoxidação Químio-Enzimática de Alcenos

Muitos dos estudos para a utilização de lipases em síntese têm envolvido conversão assimétrica, um dos temas centrais da síntese orgânica moderna. A epoxidação químio-enzimática pode se tornar uma ferramenta importante nesta área, visto que a utilização de lipases, como catalisadores nas reações de peridrólise, podem fornecer perácidos carboxílicos com diferentes capacidades de oxidação e conseqüentemente com diferentes seletividades.

Sharpless e Michaelson demonstraram que as reações de epoxidação, via perácidos, podem ser seletivas, pois o produto da reação de epoxidação do 2 cicloexen-1-ol (**78**) com o ácido *meta*-cloro-perbenzóico (*m*CPBA) apresentou elevada pureza diastereomérica com 92% de formação do epóxido *syn*.⁸⁴ (**Figura 40**)

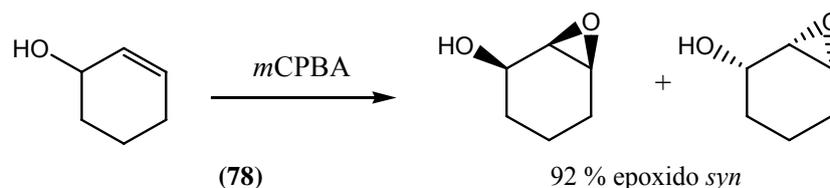


Figura 40 – Epoxidação do 2 cicloexen-1-ol com *m*CPBA.

Após os primeiros trabalhos de Björkling, como citado anteriormente, outros grupos também apresentaram estudos utilizando este método.

Em 1995, Warwel e Klaas publicaram a auto-epoxidação químico-enzimática de ácidos carboxílicos insaturados utilizando como catalisador uma lipase imobilizada industrialmente em resina aniônica (Novozyme 435[®] - CALB) e como oxidante solução aquosa de peróxido de hidrogênio 60 %.¹¹¹ (**Figura 41**)

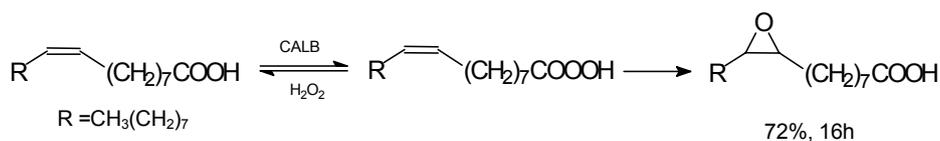


Figura 41 – Epoxidação químico-enzimática do ácido oléico catalisada pela CALB.

Os resultados mostraram excelentes conversões, chegando à 91 % para o ácido linoléico, após 16 h de reação à temperatura ambiente (72–91 %). O estudo da reutilização do biocatalisador demonstrou que, mesmo na presença do oxidante forte (H₂O₂ 60 %), este pôde ser utilizado por 15 repetições sem que houvesse uma perda considerável da atividade catalítica (da 1^a. à 12^a. utilização ≈10% e nas seguinte ≈20%).

Recentemente Sarma *e col.* realizaram a epoxidação químico-enzimática seletiva de derivados do estireno utilizando uma série de ácidos quirais (*N*-2,4-dinitrofenil-L-prolina (**79**), éster metílico da *N*-benzil-L-prolina (**80**), L-(+)-ácido tartárico (**81**),

(*S*)-(-)-2-ácido cloropropiônico (**82**) e (*S*)-(+)-2-ácido metilbutírico (**83**) com uréia peróxido de hidrogênio (UPH) ou peróxido de hidrogênio aquoso (50 %) e com a lipase de *Pseudomonas sp.* G6.¹¹² (**Figura 42**)

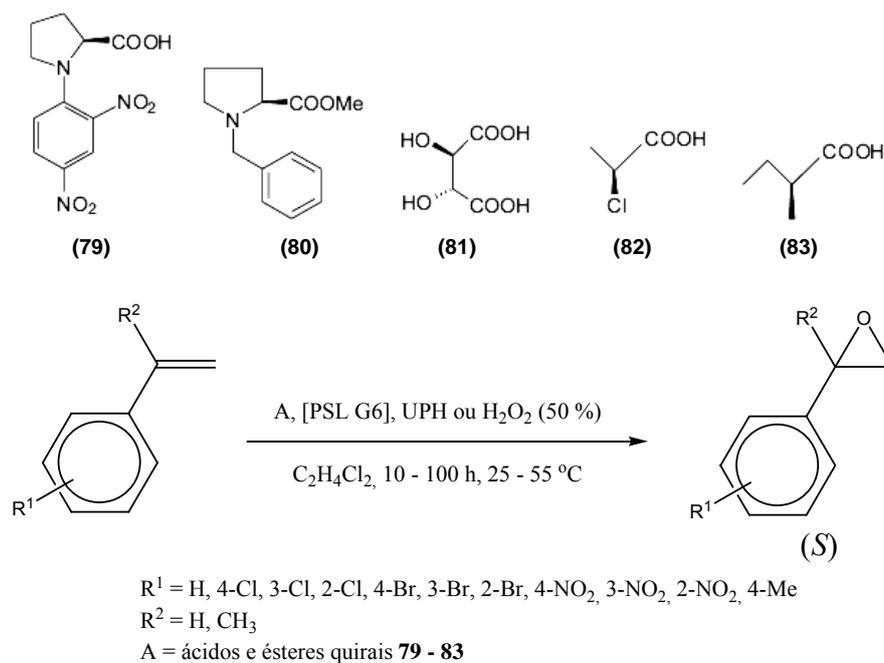


Figura 42 – Epoxidação químico-enzimática de derivados de estireno utilizando ácidos quirais na presença da LPS-G6 e peróxido de hidrogênio.

Foram obtidos bons resultados de conversão e enantiosseletividade (c 5-85%, ee_p 60-81%) de epóxidos quirais. Os melhores resultados de enantiosseletividade (ee_p 70-81 %) foram obtidos utilizando o ácido *N*-2,4-dinitrofenil-*L*-prolina (**79**).¹¹²

De acordo com os pesquisadores, o grupo volumoso *N*-2,4-dinitrofenil do peróxi-ácido formado durante o curso da reação, provavelmente orientou a transferência do oxigênio para a ligação dupla olefínica somente para o lado do estireno menos impedido estericamente, resultando numa inserção preferencial em relação aos outros ácidos com grupos menos volumosos.¹¹²

A indústria farmacêutica tem demonstrado grande interesse nos compostos assimétricos, visto que a atividade biológica de fármacos racêmicos muitas vezes reside em um único enantiômero. Sintetizar tais fármacos, em sua forma enantiomericamente pura, está se tornando um caminho importante na química da biotransformação.

Alguns fármacos, resolvidos via catálise enzimática são descritos na literatura tais como: 1,4-benzodioxano, agente cardiovascular¹¹³, Naproxen¹¹⁴ e Ibuprofen¹¹⁵, agentes antiinflamatórios, Atenolol, tratamento de hipertensão e angina¹¹⁶ e Cloranfenicol, agente antimicrobial.¹¹⁷

Além da sua utilização na resolução de racematos, o uso de enzimas em síntese orgânica, também tem como um de seus objetivos a minimização de condições reacionais drásticas, como por exemplo, a substituição de ácidos minerais por estes catalisadores versáteis em reações de epoxidação.

Neste trabalho foram estudadas reações químio-enzimáticas catalisadas por enzimas hidrolíticas para a obtenção de epóxidos que são compostos de grande interesse sintético devido à sua alta reatividade causada pela tensão existente no anel de três membros.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

Utilizar lipases de diferentes fontes como biocatalisadores em reações de peridrólise de ésteres e de ácidos carboxílicos para formação de seus respectivos perácidos e a utilização destes na epoxidação *in situ* de compostos que contenham ligação dupla. (Figura 43)

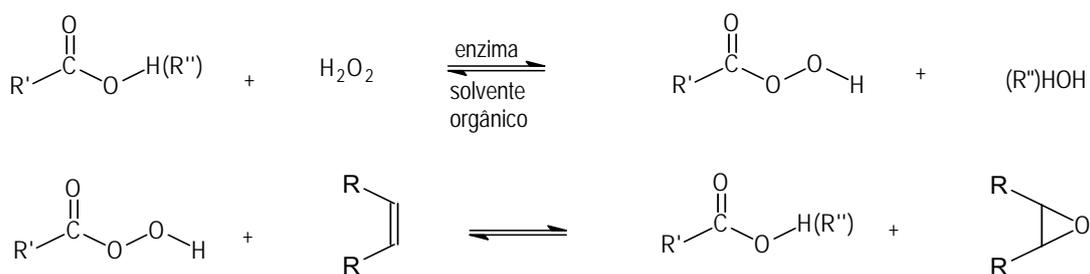


Figura 43 – Equação geral das reações estudadas neste trabalho.

2.2 - Objetivos específicos

- i. Investigar a estabilidade de lipases de *Pseudomonas cepacia*, *Rhizopus oryzae*, *Mucor javanicus*, *Rhizomucor miehei*, *Thermomices lanuginosus*, *Candida antarctica*, Pancreática de porco, *Aspergillus niger*, *Candida rugosa*, *Mucor miehei* entre outras, na reação de peridrólise dos ácidos octanóico, láurico, mirístico, palmítico e esteárico para formação de seus respectivos perácidos.
- ii. Utilizar os perácidos formados “*in situ*”, pelo processo descrito anteriormente, na epoxidação de terpenóides como D-limoneno, (±)-carvona, (α)-pineno, (β)-pineno, eugenol, isoeugenol, (+)-3-careno, (±)-citronelol, (β)-cariofileno e o terpinoleno.

- iii. A partir dos resultados dos itens I e II, estudar o efeito da variação da massa de lipases, dos ácidos carboxílicos e dos terpenos na formação dos seus correspondentes epóxidos.
- iv. Utilizar o peróxido de hidrogênio aquoso e a uréia peróxido de hidrogênio como doadores de grupo peróxido na reação de peridrólise dos ácidos.
- v. Investigar o efeito da temperatura e dos solventes tolueno, diclorometano, hexano, acetonitrila puros e com os líquidos iônicos tetrafluorborato de 1-butil-3-metil imidazólio, [BMIm][BF₄] e hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazólio, [BMIm][PF₆] nas reações acima citadas.
- vi. Estudar o efeito dos substituintes nas ligações duplas dos terpenos em relação à velocidade e seletividade nas reações de epoxidação.
- vii. Caracterizar os produtos por técnicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, cromatografia gasosa, cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa, além de medidas de rotação óptica (quando necessárias).
- viii. Comparar os resultados obtidos com dados da literatura.

3 – PARTE EXPERIMENTAL

3.1 – Reagentes

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

- *Aldrich*: ácido octanóico, tetrametil silano (TMS), CDCl_3 , (β)-cariofileno (80 %); (+)-3-careno (90 %), (\pm)-carvona (98 %);
- *Merck*: tolueno, xileno;
- *Vetec*: hexano, peróxido de hidrogênio 30%, tetracloreto de carbono; ácido hexadienóico, ácido láurico; acetato de etila, etanol, hexano, heptano;
- *Reagen*: diclorometano; clorofórmio; éter etílico;
- *Citro Suco*: D-limoneno;
- *Fluka*: sílica gel, (α)-pineno (98 %), (β)-pineno (80 %), (\pm)-citronelol (95 %), terpinoleno (85%), tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazólio, [BMIm][BF₄]; hexafluorofosfato de 1-butil-4-metilpiridínio, [BMIm][PF₆].

As hidrolases que foram utilizadas estão descritas na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Hidrolases utilizadas neste trabalho.

Fonte	Nome comercial	Atividade*
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Lipase PSL	30000 u/g
<i>Pseudomonas</i> sp.	Lipase C	Não informado
<i>Pseudomonas</i> sp.	Lipase D	Não informado
<i>Rhizopus orizae</i>	Lipase F-AP15	150000 u/g
<i>Mucor javanicus</i>	Lipase M	10000 u/g
<i>Rhizomucor miehei</i>	Lipozyme [®]	5-6 BAUN/g
** <i>Rhizomucor miehei</i>	Lipozyme RM IM [®]	5-6 BAUN/g
** <i>Thermomices lanuginosus</i>	Lipozyme TL IM [®]	250 IUN/g
<i>Thermomices lanuginosus</i>	Lipolase [®]	100000 u/g
** <i>Candida antarctica</i> Pancreática de porco	CALB (Novozym 435 [®])	10000 PLU/g
<i>Aspergillus niger</i>	Lipase PPL	135000 u/g
<i>Candida rugosa</i>	Lipase A	120000 u/g
<i>Mucor miehei</i>	Lipase CrL	746000 u/g
<i>Aspergillus oryzae</i>	Palatase M	1000 LU/g
<i>Aspergillus niger</i>	Protease A	20000 u/g
<i>Aspergillus niger</i>	Protease ácida A	35000 u/g
<i>Aspergillus melleus</i>	Protease P	60000 u/g
<i>Bacillus subtilis</i>	Proleather FG-F [®]	10000 u/g

* A atividade catalítica obtida pelos fornecedores das proteases A, ácida A, P e Proleather FG-F e lipases PP, CrL, A, AY, F, M (Amano) e Palatase M (Novozymes) é definida como a quantidade de enzima que libera um μmol de ácido graxo por minuto (unidade/grama (u/g) ou unidade de lipase/grama (LU/g)). Para a Lipolase a unidade de atividade catalítica obtida pelo fornecedor (Novozymes), é a mesma utilizada pelas lipases acima citadas. Para a Lipozyme, o fornecedor (Novozymes) determina unidades de atividade catalíticas diferenciadas. Para a Lipozyme é baseada em experimento de acidólise.

** Lipases industrialmente imobilizadas.

3.2 – Equipamentos

As reações foram realizadas com auxílio de um banho termostaticado MQBTZ99-20 (Micro Química) e um agitador magnético MQAMA-301 (Micro Química) ou em um agitador orbital Certomat MO (B. Braun Biotech International). Os solventes orgânicos, quando necessário, foram extraídos com auxílio de um evaporador rotatório à pressão reduzida da marca Büchi E11-461.

Os espectros de RMN-¹H foram obtidos nos espectrômetros Bruker AC 200MHz ou Varian EM 360L de 400MHz com CDCl₃ como solvente e TMS como padrão interno, $\delta = 0,0\text{ppm}$.

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu, modelo 14B. Este aparelho foi equipado com uma coluna capilar Shimadzu CPB5-M25-025 utilizando H₂ como gás carreador e tendo como parâmetros analíticos: temperatura inicial 100 °C; taxa de aquecimento 10 °C/min; temperatura final 250 °C; temperatura do injetor 280 °C; temperatura do detector 290°C.

As amostras analisadas por espectrometria de massas foram previamente tratadas com diazometano para metilação do ácido octanóico. As análises foram realizadas num cromatógrafo gasoso com espectrômetro de massas acoplado da marca Shimadzu, modelo QP5000; utilizando H₂ como gás carreador e tendo como parâmetros analíticos: temperatura inicial 50 °C; taxa de aquecimento 2 °C/min; temperatura final 250 °C; temperatura do injetor 280 °C; temperatura do detector 290°C. Este equipamento está instalado no laboratório do Professor Dr. José Augusto R. Rodrigues do Instituto de Química da UNICAMP.

As amostras da reação com o (+)-3-careno também foram analisadas no CG equipado com uma coluna cromatográfica de fase quiral (CP-chirasil-Dex CB) utilizando H₂ como gás carreador e tendo como parâmetros analíticos: temperatura inicial 60 °C; taxa de aquecimento 3 °C/min; temperatura final 150 °C; temperatura do injetor 250 °C ; temperatura do detector 275 °C.

As titulações potenciométricas foram realizadas com solução padrão de KOH 0,1 mol.L⁻¹ em um potenciômetro Digimed DM20μP, equipado com termocompensador DMF-N1 tipo NTC.

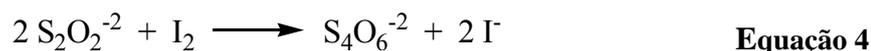
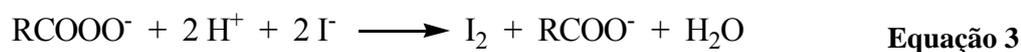
3.3 – Determinação da Concentração de Perácido por Titulação Iodométrica

A quantificação dos perácidos formados na peridrólise dos ácidos hexanóico, octanóico, láurico, palmítico, malônico e benzóico foi realizada através de titulação iodométrica, na ausência de alcenos.¹¹⁸

O sistema reacional foi montado utilizando um balão de fundo redondo de 125 mL, neste foram adicionados 5 mL de água destilada, 10 mmol de peróxido de hidrogênio (solução aquosa 30%), 6 mL de tolueno, 50 mg de CALB e 5 mmoles de um dos ácidos carboxílicos citados acima.

Após 20 min de reação à 35 °C, foi colocado uma solução de KMnO₄ 0,0125 mol.L⁻¹ para remoção do peróxido de hidrogênio residual, **Equação 2**. Na solução resultante foi adicionado então 30 mL de etanol, 10 mL de ácido acético e 10 mL de solução de KI 10 %, **Equação 3**. Por titulação do I₂ formado com solução de Na₂S₂O₃ 0,00562 mol.L⁻¹ é possível determinar de forma indireta a quantidade de peróxido formado, **Equação 4**.¹¹⁶

As reações envolvidas na titulação são:



3.4 - Determinação da Concentração de Perácido por Titulação Potenciométrica

O sistema reacional foi montado utilizando um balão de fundo redondo de 125 mL, neste foram adicionados 5 mL de água destilada, 10 mmol de peróxido de hidrogênio (solução aquosa 30%), 6 mL de tolueno, 50 mg de CALB e 1-40 mmoles do ácido octanóico.

Na seqüência foi colocada uma barra de agitação magnética no balão e este acondicionado em um reator, com temperatura controlada (35 °C) por um banho termostaticado; todo o sistema foi colocado sobre uma placa magnética para sua agitação por 20 min. Após este período, a enzima foi decantada e a fase orgânica separada da fase aquosa. O solvente orgânico foi retirado com auxílio de um evaporador rotatório e a mistura de ácido e perácido octanóico diluída em metanol e titulada com solução de NaOH 1,0 mol.L⁻¹. Os pontos de viragem e as conversões foram determinados por curvas potenciométricas obtidas com auxílio do programa Origin 7.5.

3.5 - Imobilização de Lipases em Filme de Caseínato de Sódio (CS)

O filme de caseínato de sódio (CS) foi preparado pesando-se 1,5 g do sal de caseínato comercial e 0,5 g de glicerol, em um béquer de 50 mL. Adicionaram 15 mL de água destilada e a mistura foi mantida sob agitação magnética por 2 h. A seguir, adicionaram-se 50 mg de LRO ou LPS. O sistema foi agitado por mais 10 min. A mistura foi transferida para uma placa de Petri e o solvente evaporado a temperatura ambiente por 24 h, obtendo-se o filme com a enzima imobilizada. Este foi cortado em pedaços de aproximadamente 2 mm e utilizado nas reações de epoxidação.

3.6 - Imobilização de Lipases em Filme de Poli (Álcool Vinílico) (PVA)

O filme de poli (álcool vinílico) (PVA) foi preparado pesando-se 500 mg do polímero e 25 mL de água destilada, em um béquer de 50 mL. A mistura foi mantida sob agitação magnética por 2 h. A seguir, adicionaram-se 50 mg de LRO ou LPS. O sistema foi agitado por mais 10 min. A mistura foi transferida para uma placa de Petri e o solvente evaporado a temperatura ambiente por 24 h, obtendo-se o filme com a enzima imobilizada. Este foi cortado em pedaços de aproximadamente 2 mm e utilizado nas reações de epoxidação.

3.7 - Epoxidação Químio-Enzimática de Terpenos Realizada em Reator Termostatizado

O sistema reacional foi montado utilizando um balão de fundo redondo de 125 mL, neste foram adicionados 5 mL de água destilada, 10 mmol de peróxido de hidrogênio (solução aquosa 30% ou UPH 18 %), 6 mL de um dos solventes orgânicos estudados (p. ex., diclorometano), 0-500 mg de enzimas de diferentes fontes (**Tabela 4, pág. 71**). 0 - 15 mmoles do ácido orgânico (p. ex., octanóico), 5 mmoles do reagente contendo a ligação dupla C-C (p. ex., D-limoneno). Na seqüência foi colocada uma barra de agitação magnética no balão e este acondicionado em um reator, com temperatura controlada por um banho termostatizado. Todo o sistema foi colocado sobre uma placa magnética para sua agitação. (**Figura 44**)

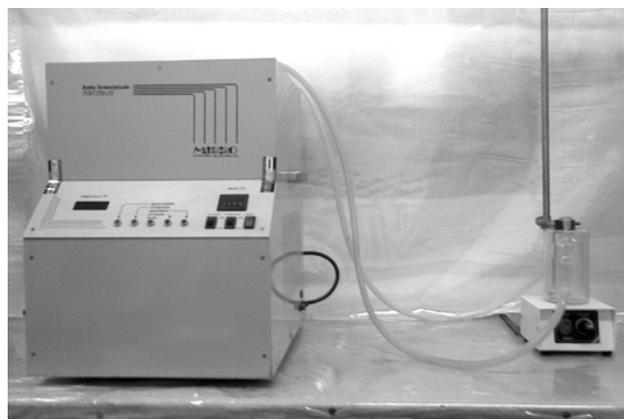


Figura 44 – Sistema realizado em reator termostatizado com agitação por barras magnéticas

Aliquotas destas reações foram retiradas em tempos pré-determinados e posteriormente analisadas por CG. Também foram realizadas reações controle sem a

adição da enzima, ou do ácido carboxílico, nas quais em nenhum dos experimentos foi observada a formação de produto.

Utilizando o sistema básico, foram avaliados outros parâmetros tais como a influência do doador acila, temperatura operacional, estrutura dos substratos e o uso de diversos solventes orgânicos.

3.8 - Epoxidação Químio-Enzimática Realizada em Agitador Orbital

O sistema reacional foi montado utilizando um erlenmeyers de 125 mL e neste foram adicionados 10 mmol de peróxido de hidrogênio (solução aquosa 30% ou UPH 18 %), 6 mL de um dos solventes orgânicos estudados (p.ex., diclorometano), 50-500 mg lipases de diferentes fontes (**Tabela 4, pág. 71**). 0 - 15 mmoles do ácido orgânico (p. ex.; octanóico), 5 mmoles do reagente contendo a ligação dupla C-C (p. ex., D-limoneno). Na seqüência o erlenmeyer contendo os reagentes foi acondicionado em um agitador orbital com velocidade controlada 0 – 300 rpm (**Figura 45**). Aliquotas destas reações foram retiradas em tempos pré-determinados e posteriormente analisadas por CG, CG/MS e RMN-¹H.



Figura 45 – Banho orbital usado nas reações de epoxidação químio-enzimática.

Utilizando o sistema básico, foram avaliados outros parâmetros, tais como a influência do doador acila, temperatura operacional, estrutura dos substratos e o solventes orgânicos.

Foram também realizadas reações em sistema trifásico, onde além dos reagentes citados, foi adicionado 1,0 mL de um dos líquidos iônicos tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIm][BF₄] ou hexafluorostato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIm][PF₆].

3.9 - Determinação das Conversões, Isolamento e Caracterização dos Produtos

As reações foram monitoradas retirando-se alíquotas do meio reacional em tempos pré-determinados e analisadas por CG, CGEM ou RMN-H¹.

Quando foi utilizado o CG, primeiramente foram injetados padrões para determinação dos tempos de retenção dos substratos e na seqüência alíquotas da reação para determinação da conversão relativa em produto. As amostras foram previamente diluídas em hexano (grau CLAE).

As análises do produto das reações com o cicloexeno foram feitas por RMN-H¹ utilizando a **Equação 2**:

$$\text{Conv.\%} = [\mathbf{B}/(\mathbf{A}+\mathbf{B})]\times 100 \qquad \text{Equação 2}$$

onde **A** é o valor da integral da área do singlete dos hidrogênios ligados aos carbonos da dupla ligação ($\delta = 5,6\text{ppm}$) e **B** é o valor da integral da área do singlete dos hidrogênios ligados aos carbonos do anel oxirano ($\delta = 3,1\text{ppm}$). (**Figura 46**)

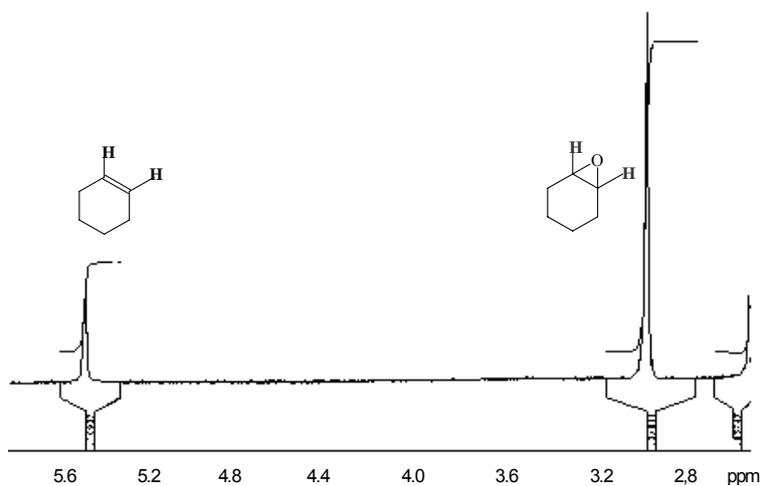
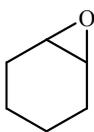


Figura 46 – Espectro de RMN- ^1H da fase orgânica da reação de epoxidação químio-enzimática do cicloexeno. CALB = 50mg, 30°C , 6 horas, conv. 77%.

Os produtos obtidos foram isolados utilizando colunas de sílica de aproximadamente 8 cm de altura por 1,5 cm de diâmetro, empacotadas com *n*-hexano e utilizando como eluente uma mistura de *n*-hexano:acetato de etila 9:1.

Após a purificação, as estruturas dos epóxidos correspondentes foram determinadas por técnicas de espectroscópicas de RMN de hidrogênio e carbono.

A seguir serão apresentados os dados espectroscópicos obtidos para os epóxidos após o isolamento e purificação.

7-oxabicyclo[4.1.0]heptanoC₆H₁₀O

M.M = 98,07

RMN-¹H (CDCl₃): δ(ppm) = 3,13 (2H, m), 2,00–1,91 (2H, m), 1,86–1,76 (2H, m), 1,49–1,36 (2H, m), 1,31–1,16 (2H, m);

RMN-¹³C (CDCl₃): δ(ppm) = 52,0 (2CH); 25,0 (2CH₂); 20,0 (2CH₂).

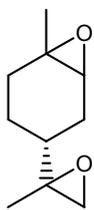
4-isopropenil-1-metil-7-oxabicyclo[4.1.0]heptanoC₁₀H₁₆O₁

M.M = 152,12

t.r. = 5,2 min

RMN-¹H (CDCl₃): δ(ppm) = 1,32 (s, 3H), 1,55 (m, 2H), 1,71 (s, 3H), 1,74 (m, 2H), 1,86 (m, 2H), 2,14 (m, 1H), 3,07 (t, 1H), 4,70 (d, 2H).

RMN-¹³C (CDCl₃): δ(ppm) = 21,0; 24,0; 26,0; 28,0; 31,0; 36,0; 57,0; 60,0; 109,0; 149,0.¹¹⁹

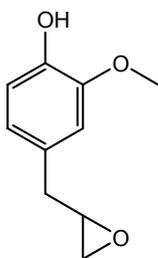
1-metil-4-(2-metil-oxirani)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptanoC₁₀H₁₆O₂

M.M = 168,12

t.r. = 6,0 min

RMN-¹H (CDCl₃): δ(ppm) = 1,01 (m, 1H), 1,14 (s, 3H), 1,23 (s, 3H), 1,26 (m, 1H), 1,44 (m, 1H), 1,55 (q, 1H), 1,57 (m, 1H), 1,86 (m, 1H), 1,97 (dm, 1H), 2,37–2,47 (m, 2H), 2,85 (d, 1H).

RMN-¹³C (CDCl₃): δ(ppm) = 17,5; 22,0; 24,7; 29,0; 31,0; 39,3; 52,9; 57,5; 58,6; 60,1.

epóxi-eugenolC₁₀H₁₂O₃

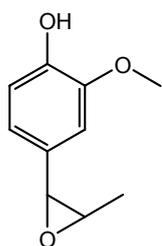
M.M = 164,20

t.r. = 8,3 min

RMN-¹H (CDCl₃): δ(ppm) = 2,29 (s, 1H), 3,32 (d, 2H), 3,87 (s, 3H), 5,07 (m, 2H), 5,95 (td, 1H), 6,69 (2H), 6,84 (d, 1H)

RMN-¹³C (CDCl₃): δ(ppm) = 39,9; 46,9; 52,9; 55,9; 111,6; 114,7; 121,1; 131,8; 144,2; 146,9.

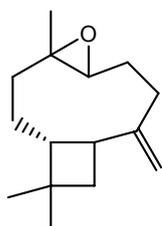
EIMS 70 eV m/z: (int. rel.): 180 [M]⁺ (35), 137 (100).

epóxi-isoegenolC₁₀H₁₂O₃

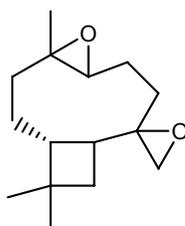
M.M = 180,08

t.r. = 9,9 min**RMN-¹H** (CDCl₃): δ(ppm) = 1,18 - 1,21; 3,76 - 3,85; 7,20 - 7,36.**RMN-¹³C** (CDCl₃): δ(ppm) = 56,0; 108,0; 114,0; 127,0; 130,0; 147,0; 152,0.**EIMS** 70 eV m/z: (int. rel.): 180 [M]⁺ (11), 137 (100).**(+)-(1S, 3S, 4R, 6R)-3,4-Epoxi-3,7,7-trimetilbiciclo-[4.1.0]heptano**C₁₀H₁₆O

M.M = 180,08

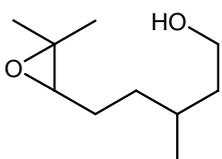
t.r. = 5,5 min**RMN-¹H** (CDCl₃): δ(ppm) = 2,81 (s, 1H); 2,28 (dd, 1H); 2,13 (q, 1H); 1,64 (d, 1H); 1,49 (d, 1H); 1,25 (s, 3H); 1,01 (s, 3H); 0,73 (s, 3H); 0,54-0,42 (m, 2H).**RMN-¹³C** (CDCl₃): δ(ppm) = 58,1; 55,8; 27,8; 23,4; 23,2; 19,3; 16,1; 16,0; 14,6; 13,9.**epóxi-cariofileno**C₁₅H₂₄O

M.M = 220,18

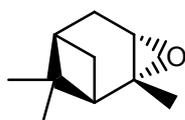
t.r. = 13,0 min**RMN-¹H** (CDCl₃): δ(ppm) = 0,95 (s, 3H); 0,99 (s, 3H), 1,18 (s, 3H), 1,28 (m, 2H), 1,34 1,53-1,77 (m, 5H), 2,10 (m, 2H), 2,22 (q, 1H), 2,32 (m, 1H), 2,60 (d, 1H), 2,86 (q, 1H), 4,85 (s, 1H), 4,96 (s, 1H)**RMN-¹³C** (CDCl₃): δ(ppm) = 151,7; 112,7; 63,7; 59,8; 50,6; 48,6; 39,7; 39,0; 33,9; 30,1; 29,8; 29,7; 27,1; 21,6; 16,0.**diepóxi-cariofileno**C₁₅H₂₄O

M.M = 220,18

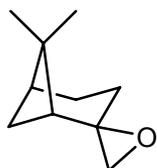
t.r. = 16,5 min**RMN-¹H** (CDCl₃): δ(ppm) = 0,97 (s, 3H), 1,28 (s, 3H), 1,34 (s, 3H), 1,65-1,34 (m, 2H), 1,68-1,77 (m, 2H), 1,91 (m, 2H), 2,10-2,16 (m, 6H), 2,36 (m, 1H), 2,56 (d, 1H), 2,67 (t, 2H), 2,88 (q, 1H), 2,98 (d, 1H), 3,09 (q, 1H).**RMN-¹³C** (CDCl₃): δ(ppm) = 62,4; 60,9; 59,4; 56,5; 49,3; 47,7; 46,6; 39,6; 35,0; 30,1, 29,5; 27,2; 25,1; 21,6; 16,3.

epóxi-(±)-citronelolC₁₀H₂₀O

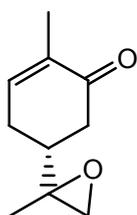
152,12

t.r. = 10,0 min**RMN-¹H** (CDCl₃): δ(ppm) = 3,47 (m, 3H); 2,57 (t, 1H); 1,46 – 1,38 (m, 5H); 1,24 (d, 2H); 1,16 (s, 3H); 1,12 (s, 3H); 0,76 (d, 3H).**RMN-¹³C** (CDCl₃): δ(ppm) = 64,8; 60,2; 58,7; 39,4; 33,6; 29,2; 26,1; 24,8; 19,5; 18,6.**epóxi-α-pineno**C₁₀H₁₆O

152,12

t.r. = 5,5 min**RMN-¹H** (CDCl₃): δ(ppm) = 3.07 (dd, 1H) 2.00-1.95 (m, 4H) 1.63(s, 1H) 1.60 (s, 1H) 1.35 (s, 3H) 1.29 (s, 3H) 0.94 (s, 3H)**RMN-¹³C** (CDCl₃): δ(ppm) = 61,0; 55,9; 48,5; 40,3; 39,7; 25,7; 24,8; 23,1; 21,9; 20,8.**epóxi-β-pineno**C₁₀H₁₆O

152,12

t.r. = 5,0 min**RMN-¹H** (CDCl₃): δ(ppm) = 0,67 (s, 3H), 0,99 (s, 3H), 1,06(d, 1H), 1,25 (t, 1H), 1,40 (d, 1H), 1,60 (m, 2H), 1,73 (d, 1H), 1,90 (m, 1H), 2,01 (m, 1H), 2,33 (d, 1H), 2,50 (d, 1H)**RMN-¹³C** (CDCl₃): δ(ppm) = 20,0; 22,0; 25,7; 26,0; 27,0; 39,0; 40,0; 45,0; 57,0; 60,0.**epóxi-carvona**C₁₀H₁₄O₂

166,10

t.r. = 9,9 min**RMN-¹H** (CDCl₃): δ(ppm) = 4,63-4,57 (d, 2H), 3,31 (t, 1H), 2,55-2,52 (m, 1H), 2,45-2,37 (m, 1H), 2,25-2,16 (m, 1H), 1,92-1,83 (dd, 1H), 1,81-1,72 (m, 1H), 1,57 (s, 3H), 1,24 (s, 3H);**RMN-¹³C** (CDCl₃): δ(ppm) = 15,0; 18-17,9; 27,4-27,2; 39,6-39,3; 40,6-40,3; 52,2-51,9; 57,4-57,3; 134,8-134,7; 143,8-143,6; 198,2-198,1.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma das possíveis dificuldades do uso dos sistemas estudados neste trabalho seria a desnaturação da enzima provocada pelo peróxido de hidrogênio se colocado diretamente em contato com o biocatalisador.

Devido a este fato, buscou-se estudar um sistema reacional onde o peróxido de hidrogênio pudesse ser incorporado sem que houvesse o contato de uma grande concentração do mesmo com a enzima. Optou-se, então, pelo uso dos sistemas bifásico água/solvente orgânico ou trifásico água/líquido iônico/solvente orgânico, pois a água além de proteger a lipase da desnaturação pelo solvente orgânico também diminuiria a velocidade de ataque do peróxido à enzima pela diluição do mesmo.

Nas próximas seções serão inicialmente apresentados e discutidos alguns resultados preliminares, realizados pelo nosso grupo de pesquisa, que serviram de base para esta tese e outros trabalhos em andamento no Laboratório de Biocatálise deste Departamento. Serão também apresentados e discutidos os resultados obtidos nas reações dos terpenos como o β -cariofileno, (\pm)-citronelol, α -pineno, β -pineno, carvona, eugenol, isoeugenol, (+)-3-careno, mirceno, (+)-terpineno-4-ol, *cis*-verbenol, terpineol, terpinoleno e D-limoneno em função da variação de diversos parâmetros reacionais, tais como a fonte do biocatalisador, doador peróxido e acila, temperatura, solvente orgânico externo, tempo e quantidade de grupos substituintes nas ligações duplas dos substratos.

4.1 - Resultados Preliminares

Nesta seção serão avaliados os diversos fatores que podem afetar as velocidades de formação do epóxido do cicloexeno (**40**), tais como; solvente externo, fonte da lipase utilizada e reutilização do biocatalisador. (**Figura 47**)

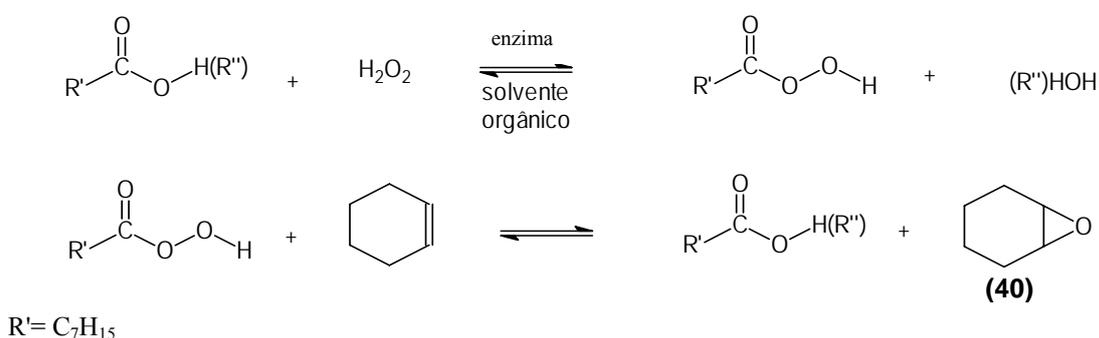


Figura 47 – Epoxidação químio-enzimática do cicloexeno.

Lipases de fontes variadas foram utilizadas na reação de epoxidação do cicloexeno como descrito na **seção 3.5** (pág. 75). As maiores conversões em epóxido foram obtidas quando empregaram-se como catalisadores as lipases de *Candida antarctica* (CALB), de *Rhizopus oryzae* (LRO) e de *Pseudomonas* sp. (LPS) sendo de 93, 84 e 53%, respectivamente.

Observou-se que quando a reação foi catalisada pelas lipases de *Mucor javanicus* (LMJ), de *Candida rugosa* (LCR) e de *Rhizomucor miehei* (LRM), as reações apresentaram conversões muito baixas sendo 12, 2 e <1 %, respectivamente e não houve formação do produto utilizando as de *Thermomices lanuginosus* (LTL), pancreática de porco (LPP) e de *Aspergillus niger* (LAN).⁵⁸

Os resultados demonstraram que as conversões podem estar relacionadas à interação enzima/substrato, e esta se deve à conformação do sítio catalítico das lipases, que segundo Pleiss *e col.* se diferenciam muito de uma lipase à outra, fazendo com que cada uma delas tenha uma maior eficiência catalítica dependendo do substrato empregado.¹²⁰

As lipases CALB, LRO e a LPS, três das enzimas que apresentaram os melhores resultados, foram utilizadas como catalisadores na reação de epoxidação do cicloexeno com o ácido octanóico como doador acila, para avaliação da influência do solvente orgânico (éter etílico, diclorometano, clorofórmio, tolueno, tetracloreto de carbono, xileno, hexano, heptano) a ser empregado no sistema bifásico. Neste experimento as conversões em epóxido foram de 30 - >99 % dependendo do solvente empregado, sendo que os maiores valores (>99 %) foram obtidos quando foi empregado o sistema bifásico contendo água e tolueno, ou diclorometano ou tetracloreto de metila (todos na proporção 1:1 v/v), independente da fonte da lipase.

Utilizando a LPS, foram obtidas conversões menores em cicloexeno, estando estas na faixa de 12-53 %. Contudo, foi obtido uma grande melhora com o uso do líquido iônico (LI) tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazólio ([BMIm][BF₄]) em um sistema trifásico composto por água/diclorometano/LI (50:42:8 v/v %), aumentando a conversão de 20 para 40%.⁵⁸ Este resultado está de acordo com o descrito por Lau *e col.* para a aminólise do octanoato de etila onde também foram observados aumentos de 40 para 99 % em octanoamida quando o [BMIm][BF₄] foi utilizado.¹²¹

Também foi realizado pelo nosso grupo um estudo da reutilização da CALB na reação de epoxidação do cicloexeno, sendo a mesma utilizada até 10 vezes sem perdas

significativas na atividade. As conversões em epóxido do cicloexeno foram de aproximadamente 80%.¹²²

Na seqüência, a formação de diversos perácidos foi quantificada por titulação iodométrica (**seção 3.3**, pág. 73). Nestas reações não foram adicionados alcenos. Os resultados obtidos nas titulações estão demonstrados na **Figura 48**.

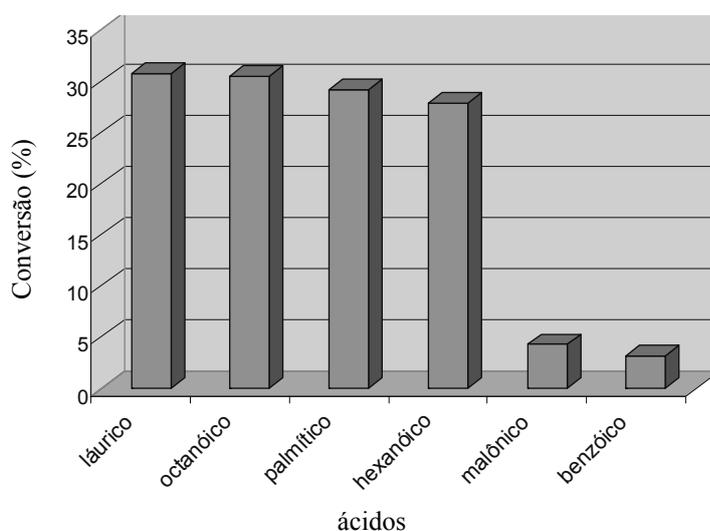


Figura 48 – Conversão em perácido em função do doador acila na reação de peridrólise de ácidos carboxílicos (5 mmol) com solução aquosa de peróxido de hidrogênio 30% (10 mmol) catalisada pela CALB (50 mg) após 24 h à 35 °C.

Pode-se observar na **Figura 48** que os maiores valores de conversão em perácidos ($\approx 30\%$) foram obtidos com os ácidos monocarboxílicos com a cadeia variando de 6-16 carbonos. Com os ácidos malônico, um ácido dicarboxílico e com o benzóico estas foram menores, sendo $<5\%$. Também foi avaliada a formação de perácidos com os sistemas com os ácidos octanóico e palmítico após 24 h. Os valores de conversão observados foram os mesmos obtidos anteriormente, sendo de $\approx 30\%$, para ambos os ácidos.

As conversões observadas em função do tamanho das cadeias alquílicas, podem estar relacionadas a efeitos estéreo, pois como citado anteriormente, as lipases possuem sítios ativos muito seletivos e esta especificidade em relação ao tamanho da cadeia está ligada ao fato de que, em seu ambiente natural estas enzimas catalisam a reação de hidrólise de compostos como os triacilgliceróis, com cadeias alquílicas extensas e alifáticas. Portanto as maiores conversões foram observadas com os sistemas que utilizaram os ácidos hexanóico, octanóico, láurico, palmítico. Em relação aos valores máximos de conversão não ultrapassarem 30 % em função de um tempo maior, provavelmente se deve ao fato do sistema estar em equilíbrio, como representado na **Figura 49**, e à maior quantidade de água no meio fazendo com que os valores máximos obtidos sejam os mesmos da concentração da solução de peróxido de hidrogênio aquoso (30%).

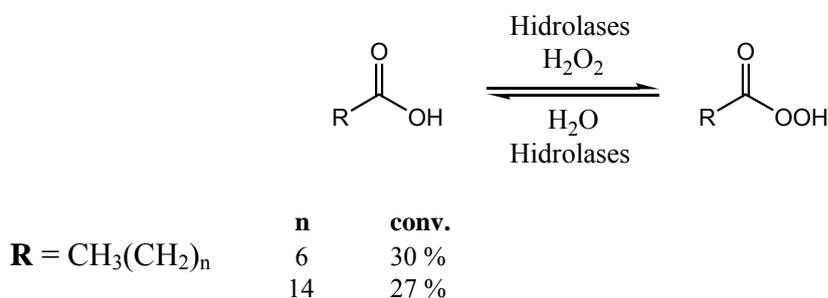


Figura 49 – Reação de peridrólise dos ácidos octanóico e palmítico catalisada pela CALB com PHA 30 %, 24 h, 30 °C.

Os resultados obtidos nesta primeira etapa do trabalho demonstraram que as maiores conversões em peroxiácido e epóxido de cicloexeno foram obtidas utilizando como catalisador a CALB, ácidos carboxílicos de cadeias de 6-16 carbonos e tolueno, ou diclorometano ou tetracloreto de carbono como solventes externos. Portanto, estes parâmetros foram utilizados na seção seguinte para a epoxidação dos terpenos.

4.2 – Epoxidação Químio-Enzimática de Terpenos

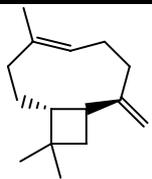
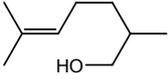
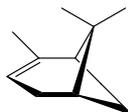
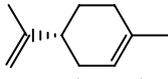
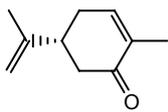
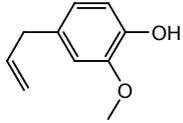
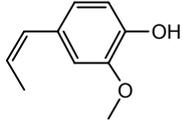
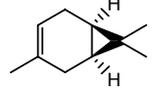
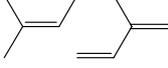
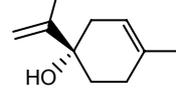
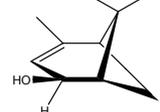
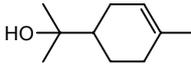
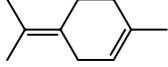
A partir dos resultados obtidos na epoxidação do cicloexeno e na peridrólise dos ácidos carboxílicos, iniciaram-se os estudos com os terpenos. Primeiramente foram realizados estudos com uma série de terpenos que foram isolados e doados pelo Prof. Ademir Farias Morel do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (RS), bem como com produtos comerciais.

As reações foram realizadas como descrito na **seção 3.8** (pág. 77). Neste estudo preliminar não foi possível isolar todos os produtos de epoxidação, pois alguns terpenos (mirceno, (+)-terpineno-4-ol, *cis*-verbenol, terpineol, terpinoleno) apresentavam baixo grau de pureza e as quantidades disponíveis para as reações eram muito pequenas (<0,5 mmol). Outros como o eugenol, isoeugenol e o D-limoneno foram doados pelos fabricantes em quantidades maiores, mas também com presença de impurezas. Os terpenos β -cariofileno, (\pm)-citronelol, α -pineno, β -pineno, carvona e o (+)-3-careno foram adquiridos comercialmente.

As formações dos produtos, após 24 h de reação, foram determinadas por cromatografia gasosa (CG), através da comparação dos cromatogramas dos meios reacionais com os obtidos de reações realizadas com o ácido *meta*-cloroperbenzóico (*m*CPBA).

Os resultados preliminares obtidos com os diversos terpenos estão apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5 – Epoxidação químio-enzimática de terpenos catalisada pela CALB^(a).

Entrada	Terpeno	Estrutura	Conversão (%)
1	β -cariofileno		>99
2	(\pm)-citronelol		>99
3	α -pineno		>99
4	D-limoneno		>99
5	β -pineno		10
6	carvona		<1
7	eugenol		42
8	isoeugenol		>99
9	(+)-3-careno		>99
10	mirreno		>99
11	(+)-terpinen-4-ol		>99
12	<i>cis</i> -verbenol		<1
13	terpineol		>99
14	terpinoleno		>99

(a) 50 mg de CALB, 10 mmol de peróxido de hidrogênio (solução aquosa 30%), 6 mL de diclorometano, 10 mmoles do ácido octanóico, 0,2-0,5 mmoles do terpeno. 30 °C, 24 h.

Apesar de nesta etapa não ter sido possível o isolamento dos produtos obtidos nas entradas 10 - 14, ficou evidente a potencialidade do processo químico-enzimático na epoxidação dos terpenos. A maioria reagentes que possuíam ligações duplas endocíclicas (β -cariofileno, α -pineno, (+)-3-careno, (+)-terpineno-4-ol, terpineol, terpinoleno, D-limoneno) foram completamente epoxidados, exceto o *cis*-verbenol e a carvona.

As reações com o mirceno e o (\pm)-citronelol também apresentaram conversões quantitativas, provavelmente devido ao fato destes possuírem ligação dupla tri-substituída, o que confere à insaturação uma reatividade similar às observadas para as ligações duplas endocíclicas.

Quando foram utilizados o β -pineno e o eugenol as conversões foram menores que as citadas anteriormente sendo de 10 % e 42 %, respectivamente. Este fato se deve provavelmente ao número menor de substituições presentes na ligação dupla, o que confere a esta uma menor densidade eletrônica comparada às ligações duplas endocíclicas.¹²³ Resultado similar foi obtido na epoxidação das ligações duplas externas ao anel do β -cariofileno e da carvona, que também não apresentaram picos referentes aos produtos de epoxidação.

As baixas conversões observadas nas reações com o *cis*-verbenol e com a carvona (em ambas <1 %) ocorreram provavelmente porque o primeiro é um álcool alílico e bicíclico, e portanto a epoxidação ocorre pela face *syn* do grupo hidroxila e esta é claramente impedida pela ponte com dois grupos metilas. A carvona contém duas ligações duplas, uma endocíclica em um sistema α,β -insaturado, fator que a torna a segunda altamente deficiente em elétrons devido à conjugação com a carbonila e a

primeira (terminal), como observado anteriormente para outros terpenos, têm sua velocidade de epoxidação reduzida em relação às ligações duplas mais substituídas.

Estes resultados mostram que para a formação do epóxido, o processo reacional ocorreu como esperado, e seguiu os mesmos padrões das reações catalisadas por *m*CPBA descritos na literatura. Portanto fatores estéreos e eletrônicos devem ser considerados para cada substrato em particular.

Na seqüência, foram efetuados estudos com os terpenos disponíveis comercialmente (entradas 1-9, **Tabela 5**). Nesta etapa do trabalho foi possível isolar os produtos para a caracterização de sua estrutura.

4.2.1 - Epoxidação do (±)-Citronelol

Na seqüência investigou-se a epoxidação do (±)-citronelol. As reações foram realizadas como descrito na **seção 3.6** (pág.76). (**Figura 50**)

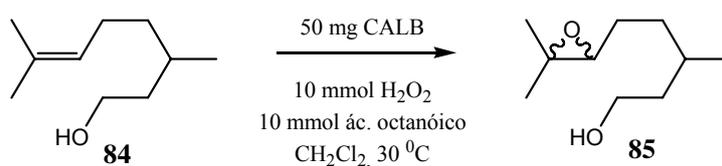


Figura 50 - Epoxidação químio-enzimática do (±)-citronelol.

Neste experimento foi estudada a velocidade de conversão do (±)-citronelol (**84**) em seu respectivo epóxido (**85**) em função da quantidade de CALB utilizada, variando a mesma de 250 – 4000 unidades. Foram retiradas alíquotas em tempos pré-determinados e as conversões em epóxido determinadas por CG. Uma amostra de (±)-citronelol padrão foi injetada para fins comparativos.

As conversões em epóxido de (±)-citronelol estão demonstradas na **Figura 51**.

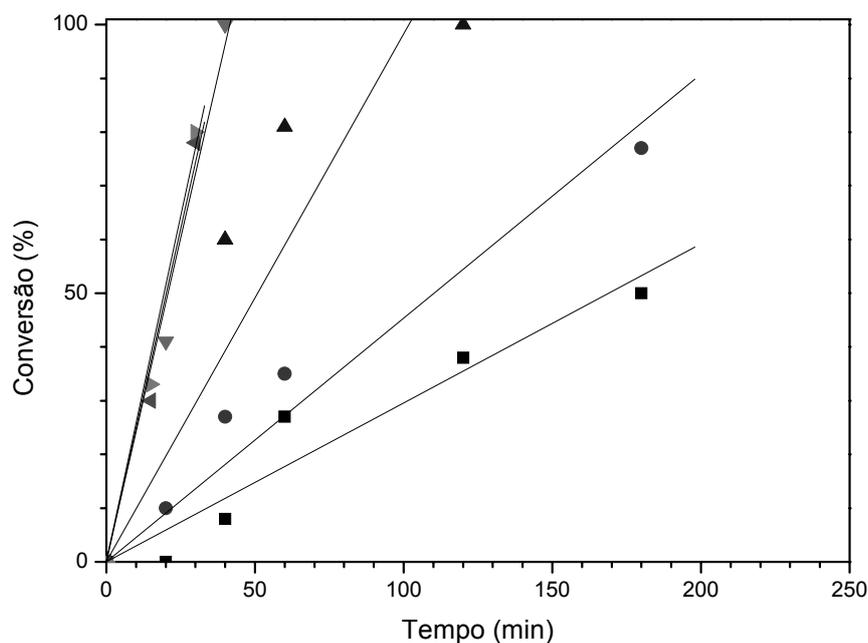


Figura 51 – Variação da conversão em éóxido de (±)-citronelol em função do tempo de reação utilizando diferentes quantidades de CALB em unidades de proteína: (■) 250, (●) 500, (▲) 1000, (●) 2000, (◄) 3500, (►) 4000. [10 mmol de PHA 30 %, 6 mL de CH₂Cl₂, 10 mmoles do ácido octanóico, 200 rpm, 30 °C]

Na **Figura 51** pode-se observar que com o aumento da quantidade de lipase a conversão em éóxido também aumentou. A conversão total em éóxido foi obtida quando foram utilizadas de 100-450 mg (1000-4500 unid) de biocatalisador após 90-30 min, respectivamente. Quando foram utilizadas 50 mg (500 unid) de lipase, foi obtido 80 % de conversão em 180 min; e com 25 mg (250 unid), neste mesmo tempo reacional, a conversão foi de 47%. Na ausência do biocatalisador e do doador peróxido, não houve formação do produto.

Através dos dados de conversão em éóxido em função do tempo, pôde-se calcular a velocidade média de formação do éóxido de (±)-citronelol. Desta forma, foi

obtido um novo gráfico de velocidade média em função da massa de lipase utilizada.

(Figura 52)

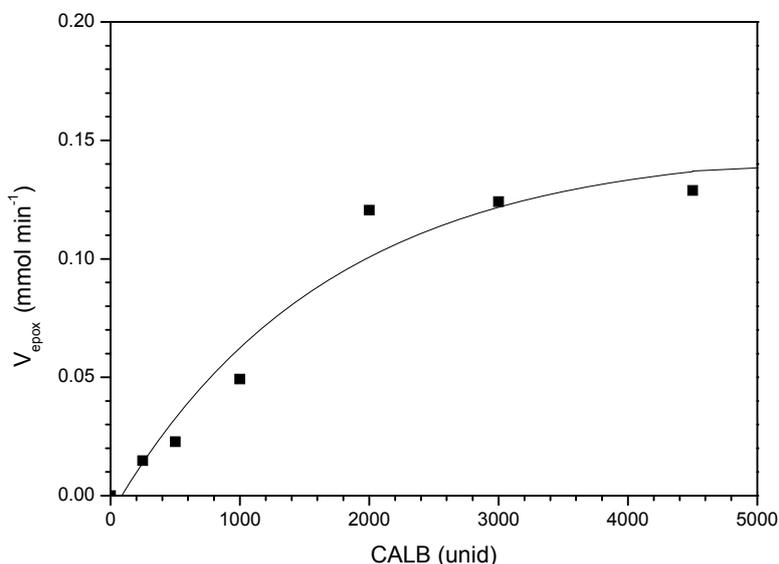
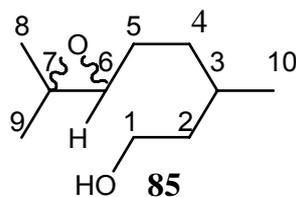


Figura 52 - Velocidade de conversão em epóxido de (±)-citronelol em função da quantidade de CALB em unidades de proteína. Condições experimentais como descrito na Figura 51.

Pode-se observar na **Figura 52**, que para epoxidação químico-enzimática do (±)-citronelol, a velocidade máxima da reação obtida foi de $\approx 0,13 \text{ mmol}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando aproximadamente 250 mg (2500 unid.) de CALB.

A formação do epóxido de (±)-citronelol pôde ser confirmada através da análise dos espectros de RMN-¹H e ¹³C do produto isolado, onde foram observados os sinais em 2,48 ppm (RMN-¹H) referente ao hidrogênio ligado ao carbono 6 e em 58 e 60 ppm (RMN-¹³C) referentes aos carbonos 7 e 6, característicos do anel oxirano. Os outros dados espectroscópicos estão apresentados na pág. 82.



Em outro estudo foi avaliada a seletividade do método químico-enzimático utilizando terpenos de estruturas químicas semelhantes, porém com as ligações duplas em posições diferenciadas. Estes resultados serão discutidos nos itens subseqüentes.

4.2.2 – Epoxidação do Eugenol e Isoeugenol

O eugenol (**86**) e o isoeugenol (**87**) são alilbenzenos que podem ser obtidos naturalmente de plantas. O isoeugenol também pode ser obtido pela isomerização do eugenol.¹²⁴

Nesta etapa foram realizadas as reações com estes dois terpenos, como demonstrado na **Figura 53**. As reações foram realizadas como descrito na **seção 3.5** (pág.70).

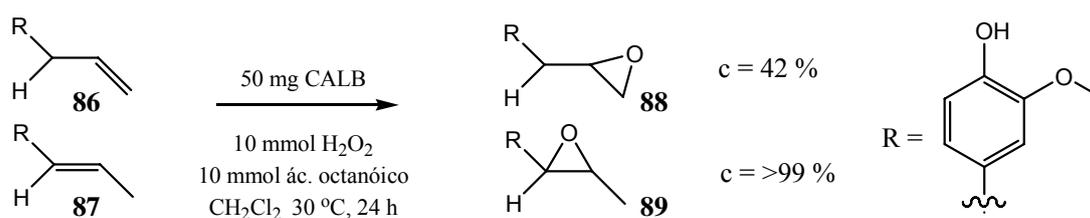


Figura 53 - Epoxidação químico-enzimática do eugenol e do isoeugenol.

As conversões foram determinadas por CGEM após 24 h de reação através da comparação dos picos dos reagentes, que foram determinados pela injeção de padrões, com o dos produtos, identificados pelo espectro de massas.

Não foram observadas formações de produtos sem adição do biocatalisador e do doador peróxido. (**Figuras 54 e 55**)

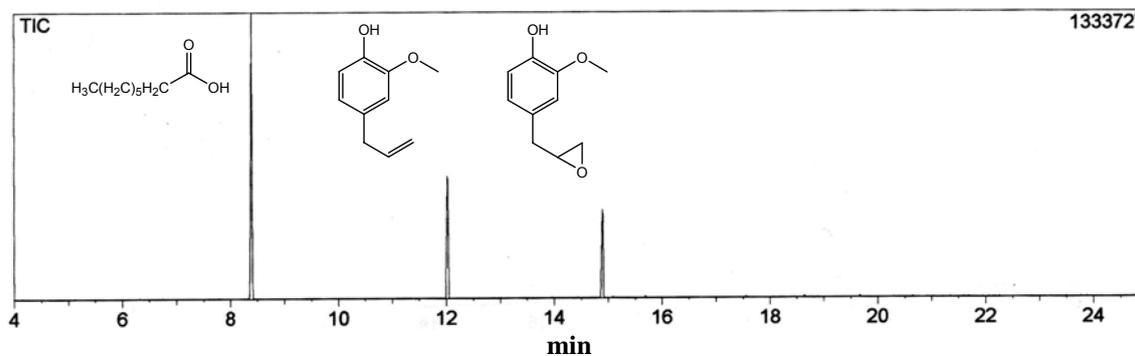


Figura 54 – Cromatograma de uma alíquota da fase orgânica da reação de epoxidação químio-enzimática do eugenol catalisada pela CALB utilizando solução aquosa de H_2O_2 30%, 30 °C, 24 h, conv. 42 %. (*Inj.* = 270°C, *Det.* = 280°C, T_i = 50°C, T_f = 100°C, Δ_{aq} = 2°C/min, P_{H_2} = 75 kPa).

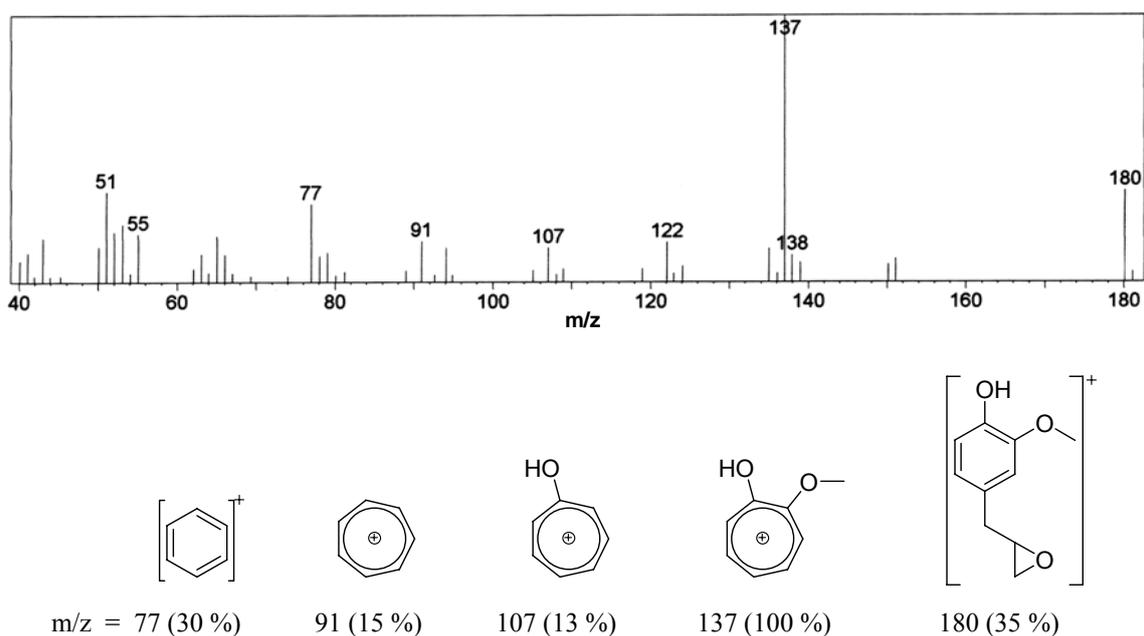


Figura 55– Espectro de massas do epóxido do eugenol (conv. = 42%, $m/z = 180$), obtidos por CGEM da fase orgânica da reação de epoxidação químio-enzimática catalisada pela CALB utilizando solução aquosa de H_2O_2 30%, 30 °C, 24 h. (*Inj.* = 270°C, *Det.* = 280°C, T_i = 50°C, T_f = 100°C, Δ_{aq} = 2°C/min, P_{H_2} = 75 kPa).

Para a reação que utilizou o eugenol (t.r.=12,02 min) como substrato, observou-se através da análise do cromatograma e do espectro de massas da **Figura 55** a formação de um produto (t.r. = 14,89 min). Este apresenta massa molar correspondente ao epóxido do eugenol ($m/z = 180$). Contudo, nestas condições, o eugenol não foi totalmente convertido em produto sendo observada conversão de 42 % em epóxido.

Além das informações estruturais obtidas pelo espectro de massas, a formação do epóxido de eugenol também pôde ser confirmada através da análise dos espectros de RMN- ^1H e ^{13}C do produto isolado.

Nos espectros obtidos foram observados os sinais em 2,68 e 3,20 ppm (RMN- ^1H) referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos 8 e 9 respectivamente e em 52 e 55 ppm, (RMN- ^{13}C) referentes a estes mesmos carbonos. Na **Figura 56** está demonstrado o espectro de RMN- ^{13}C para o epóxido de eugenol obtido químicamente-enzimaticamente. Outros sinais espectroscópicos estão apresentados na pág. 80.

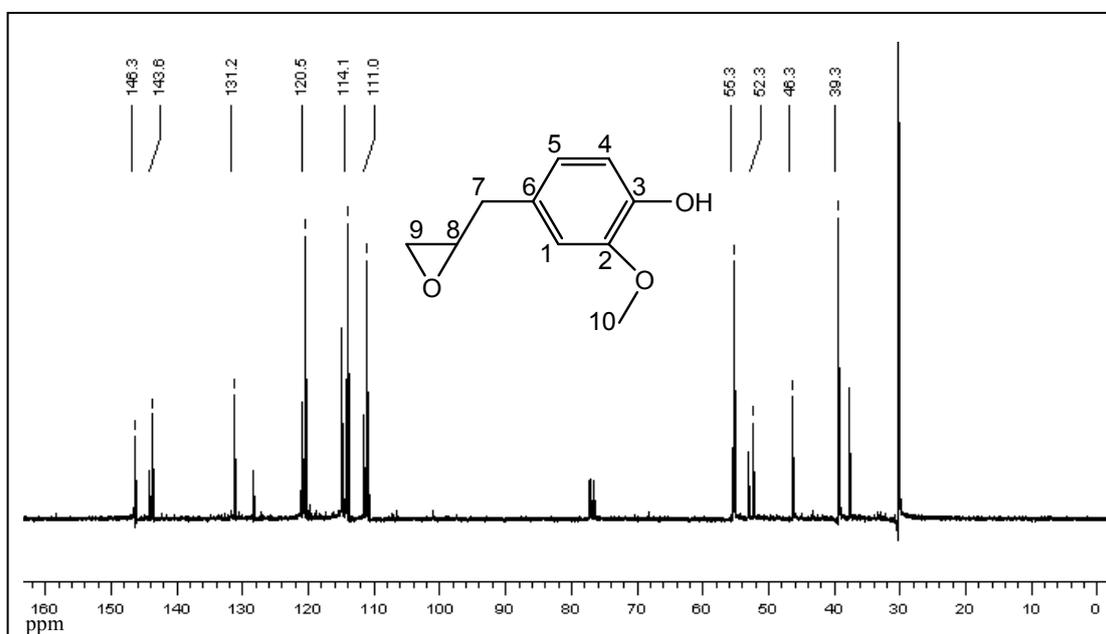


Figura 56 - Espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz) do epóxido do eugenol isolado, obtido na reação de epoxidação químicamente-enzimática catalisada pela CALB utilizando solução aquosa de H_2O_2 30%, 30 $^\circ\text{C}$, 24 h.

Na seqüência fez-se a reação utilizando o isoeugenol. As conversões foram determinadas por CGEM após 24 h de reação através da comparação dos picos dos reagentes, que foram determinados pela injeção de padrões, com o dos produtos, identificados pelo espectro de massas. (**Figuras 57 e 58**)

Também foram realizadas reações controle, sem adição do biocatalisador e do doador peróxido. Nestas condições, não foram observadas formações de produtos.

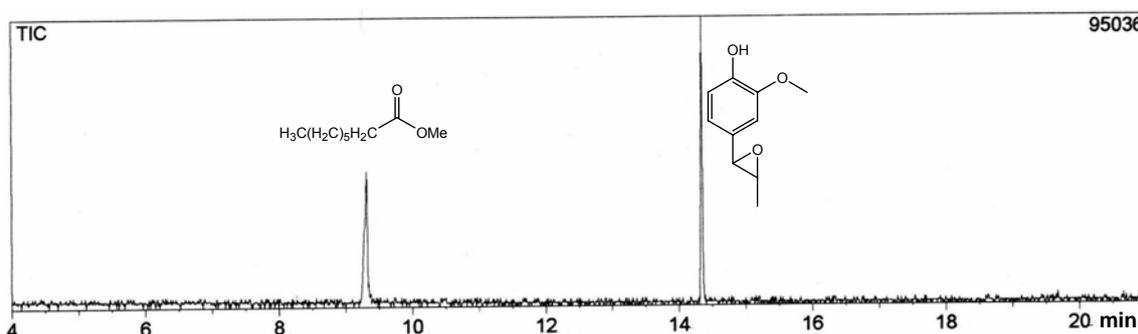


Figura 57 - Cromatograma de uma alíquota da fase orgânica da reação de epoxidação químico-enzimática do isoeugenol catalisada pela CALB utilizando solução aquosa de H₂O₂ 30% como doador peróxido, 30 °C, 24 h. (*Inj.* = 270°C, *Det.* = 280°C, *T_i* = 50°C, *T_f* = 100°C, Δ_{aq} = 2°C/min, *PH₂* = 75 kPa).

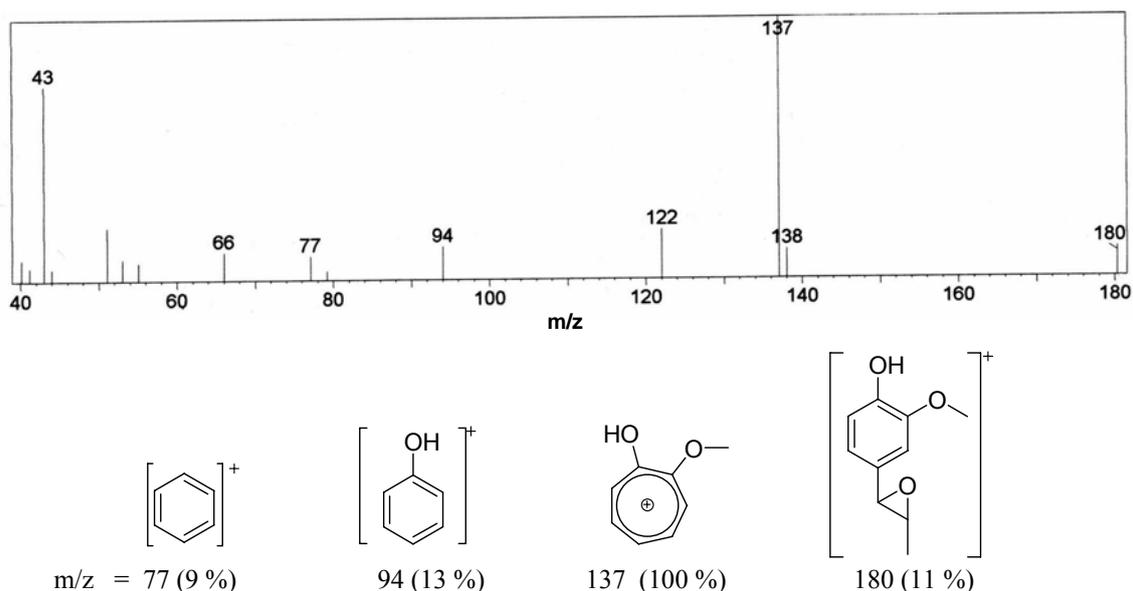
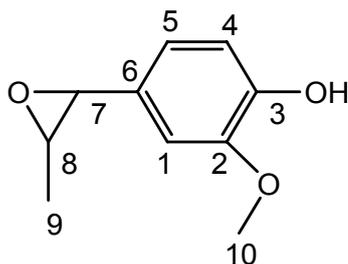


Figura 58 - Espectro de massas do produto (conv. = > 99 %, m/z = 180), obtidos por CGEM da fase orgânica da reação de epoxidação químico-enzimática do isoeugenol catalisada pela CALB utilizando solução aquosa de H₂O₂ 30% como doador peróxido, 30 °C, 24 h. (*Inj.* = 270°C, *Det.* = 280°C, *T_i* = 50°C, *T_f* = 100°C, Δ_{aq} = 2°C/min, *PH₂* = 75 kPa).

Quando o isoeugenol (**87**) foi utilizado como substrato observou-se através do cromatograma a formação de um único produto (t.r. = 14,34 min). Através da análise de CGEM verificou-se que este produto apresenta massa molar correspondente ao epóxido do isoeugenol ($m/z = 180$) que foi obtido com conversão >99 %. (**Figura 58**)

Além das informações estruturais obtidas pelo espectro de massas, a formação do epóxido de isoeugenol também pôde ser confirmada através da análise dos espectros de RMN- ^1H e ^{13}C do produto isolado, onde foram observados os sinais em 3,76 - 3,85 ppm (RMN- ^1H) referente aos hidrogênios ligado aos carbonos 7 e 8 em 56 ppm (RMN- ^{13}C) referentes aos mesmos carbonos, característicos do anel oxirano. Outros dados espectroscópicos estão descritos na pág. 81.



A maior conversão na reação de epoxidação com o isoeugenol em relação à do eugenol (**86**) pode ser explicada pelo fato da ligação dupla do primeiro composto possuir maior número de substituintes. Como foi apresentado anteriormente (pág. 49), sistemas com duas substituições na ligação dupla, como as presentes no isoeugenol, podem ser 20 vezes mais reativos para reações de epoxidação do que os sistemas com uma substituição, como no eugenol. Este fato se deve a uma maior concentração de carga eletrônica provocada pelo efeito indutivo dos substituintes alquila presentes em

maior quantidade na ligação dupla do isoeugenol, tornando este sistema mais susceptível à inserção do oxigênio pelo peróxi-ácido.⁸⁴

O estudo da epoxidação, do eugenol e do isoeugenol, mostrou novamente a regioseletividade do processo químico-enzimático.

Para a continuidade desta investigação, sobre regioseletividade, foram utilizados o α - e o β -pinenos, terpenos como isoeugenol e o eugenol semelhantes porém com as ligações duplas em posições distintas.

4.2.3 – Epoxidação do α – Pineno e β – Pineno

Nesta etapa do trabalho foram estudadas as epoxidações químico-enzimática do α -pineno (**90**) e do β -pineno (**91**). Como demonstrados na **Figura 59** respectivamente.

As reações foram realizadas como descrito na **seção 3.6** (pág.71).

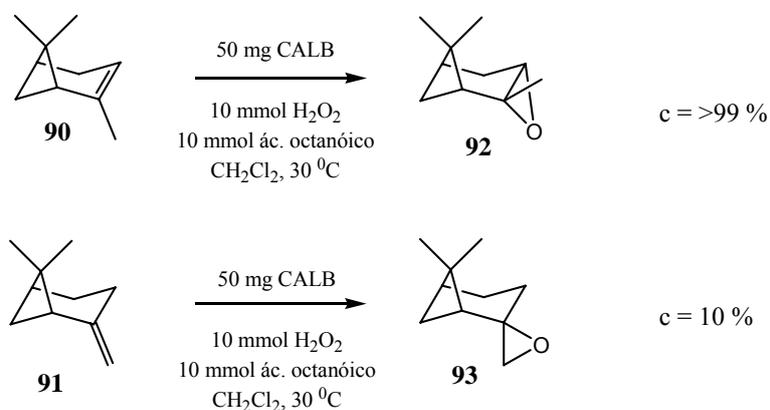


Figura 59 - Epoxidação químico-enzimática do α - e β -pineno.

Quando foi utilizado o β -pineno como reagente a reação apresentou conversão em epóxido inferior a 20 % após 24 h, já com o α -pineno as conversões foram quantitativas (>99 %).

A formação dos epóxidos do α -pineno e do β -pineno também foram confirmadas através da análise dos espectros de RMN- ^1H e ^{13}C dos produtos isolados. A **Figura 60** demonstra o espectro de RMN- ^1H do α -pineno obtido e isolado da reação de epoxidação químico-enzimática.

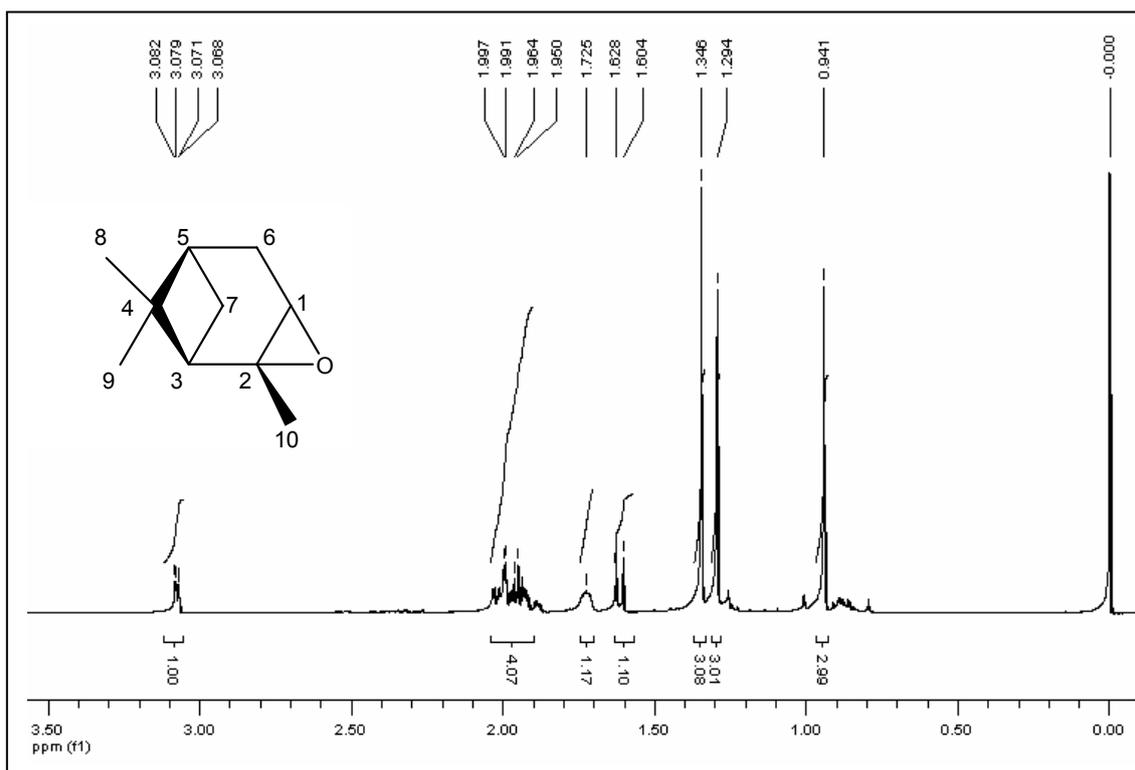
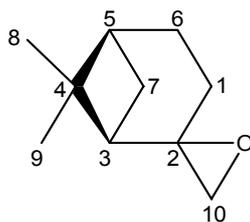


Figura 60 - Espectro de RMN- ^1H (400 MHz) do epóxido do α -pineno isolado, obtido na reação de epoxidação químico-enzimática catalisada pela CALB utilizando solução aquosa de H_2O_2 30%, 30 $^\circ\text{C}$, 24 h.

Através da análise dos espectros puderam ser observados os sinais em 3,07 ppm (RMN- ^1H) referente ao hidrogênio ligado ao carbono 1 e em 56 e 61 ppm (RMN- ^{13}C) referentes aos carbonos 1 e 2 do α -pineno e em 2,33 e 2,50 ppm (RMN- ^1H) referentes aos hidrogênios ligados ao carbono 10 e em 57 e 60 ppm (RMN- ^{13}C) referentes aos carbonos 2 e 10 do β -pineno, característicos dos anéis oxirano. Outros dados espectroscópicos estão descritos na pág. 82.



(93)

A seguir foi realizado um estudo da conversão em epóxidos do α -pineno em função da massa de enzima utilizada, variando a mesma de 25–200 mg. As reações foram monitoradas retirando-se alíquotas em tempos pré-determinados e as conversões determinadas por CG. Uma amostra do α -pineno padrão foi injetada para fins comparativos.

Os dados obtidos de conversão em função do tempo e das diversas massas de CALB estão apresentados na **Figura 61**.

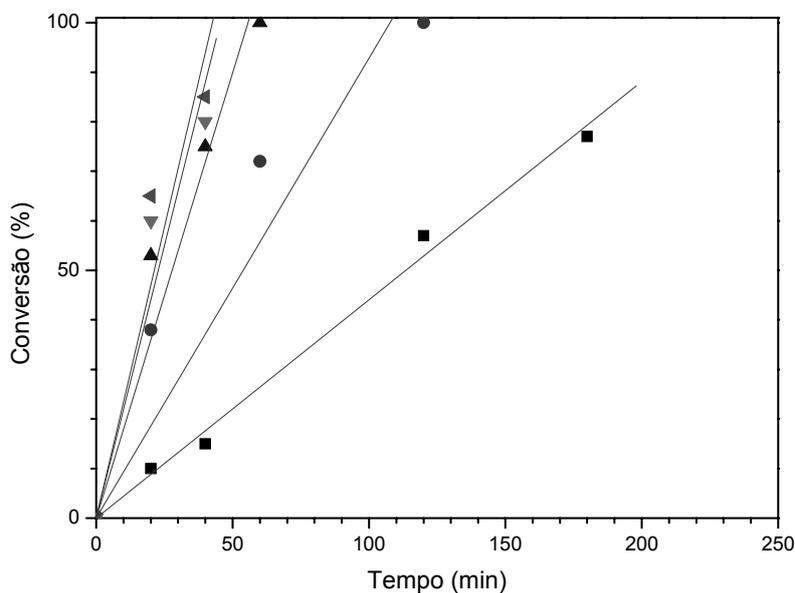


Figura 61 - Conversão em epóxido de α -pineno em função do tempo com diferentes massas (mg) de CALB, (■) 25, (●) 100, (▲) 200 (▼) 300 e (◄) 450. [10 mmol de PHA 30 %, 6 mL de CH_2Cl_2 , 10 mmoles do ácido octanóico, 200 rpm, 30 °C]

Como esperado, com o aumento da quantidade de lipase utilizada foi observado um aumento na conversão em epóxido, sendo verificada conversão total entre 60 e 120 min quando foram utilizados de 100 - 450 mg, respectivamente de CALB. Utilizando 25 mg de biocatalisador a conversão máxima alcançada em 180 min foi de 80 %.

Através dos dados obtidos para a conversão em epóxido em função do tempo, pôde-se calcular a velocidade de formação do epóxido de α -pineno e foi obtido um novo gráfico da velocidade de epoxidação em função da massa de lipase utilizada.

(Figura 62)

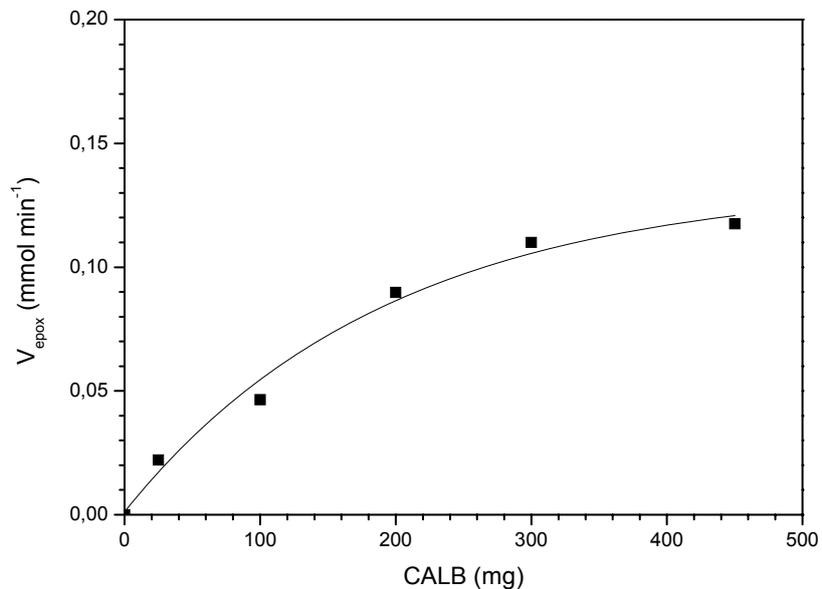


Figura 62 - Velocidade de conversão em epóxido de α -pineno em função da massa de CALB. [condições reacionais como descrito na Figura 61]

Pode-se observar na **Figura 62** que, através da equação obtida da curva, a velocidade máxima de reação para epoxidação químio-enzimática do α -pineno pode ser alcançada utilizando aproximadamente 300 mg de CALB e foi de $\approx 0,12 \text{ mmol.min}^{-1}$.

Este ensaio não foi realizado para o β -pineno, pois nas condições reacionais utilizadas neste estudo, as conversões obtidas com este terpeno foram baixas, devido provavelmente à posição da sua ligação dupla (terminal) e do impedimento estérico provocado pela ponte na posição 1,5 do anel cicloexano. Estudos utilizando outros meios reacionais, com este terpeno, serão abordados posteriormente neste trabalho.

No experimento seguinte, serão discutidos alguns parâmetros analisados na reação que utilizou o β -cariofileno como substrato.

4.2.4 - Epoxidação do β -Cariofileno

O β -cariofileno é também um substrato interessante devido à presença, na sua estrutura, de duas ligações duplas distintas, sendo que uma delas faz parte do anel de 9 membros e a outra é exocíclica.

Na epoxidação do β -cariofileno (**94**), como demonstrado na **Figura 63**, foram realizados testes para se determinar o tempo necessário para conversão total deste composto em seus respectivos mono (**95**, **96**) e/ou di-epóxidos (**97**). As reações foram realizadas como descrito na **item 3.8** (pág. 77).

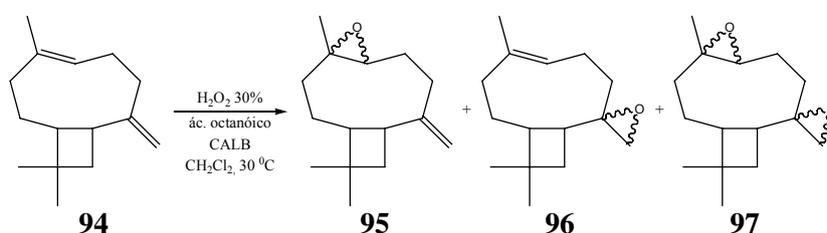


Figura 63 – Epoxidação químio-enzimática do β -cariofileno.

Foram retiradas alíquotas em tempos pré-determinados e as conversões em epóxido determinadas por CG. Uma amostra de β -cariofileno padrão foi injetada para fins comparativos.

Os cromatogramas do padrão do cariofileno e das alíquotas das reações, após 20 e 120 min, estão apresentados na **Figura 64**.

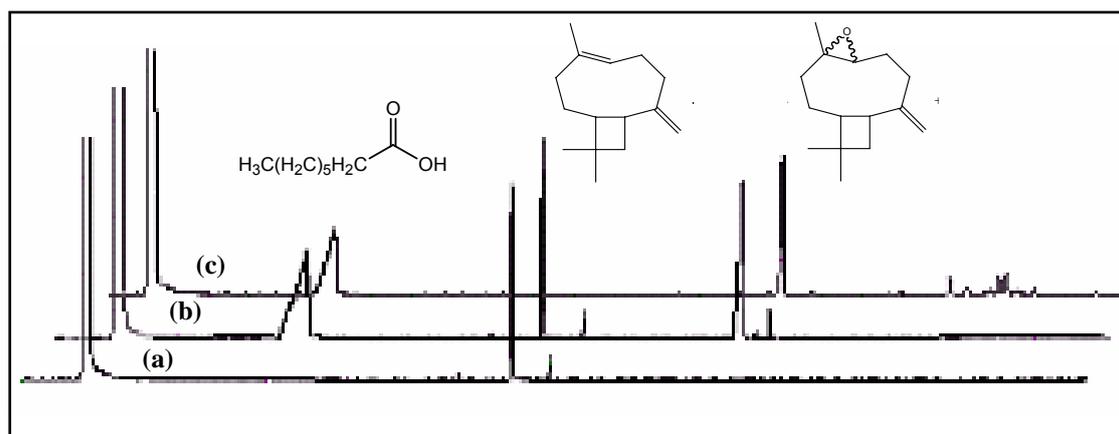


Figura 64 – Cromatogramas obtidos por CG de alíquotas da reação com β -cariofileno, **(a)** β -cariofileno (pureza 80%), **(b)** após 20 min de reação, **(c)** após 2 h de reação. (*inj.*=280°C, *det.*=290°C, *taxa de aquecimento*=10°C/min, *temp. inicial*=100°C, *temp. final*=250°C, *split*=100:1, *pressão de H₂*=75K, *coluna Shimadzu-CPB5*)

Após 120 min praticamente todo o β -cariofileno foi consumido. Contudo foi observada uma conversão de 80 % ao monoepóxido e o aparecimento do diepóxido e/ou de subprodutos da reação, provavelmente os produtos de hidrólise devido à grande quantidade de água presente no sistema.

A formação dos epóxidos do β -cariofileno puderam ser confirmadas através da análise dos espectros de RMN-¹H e ¹³C dos produtos isolados. A **Figura 65** mostra o espectro de RMN-¹³C do monoepóxido do β -cariofileno obtido e isolado da reação de epoxidação químico-enzimática.

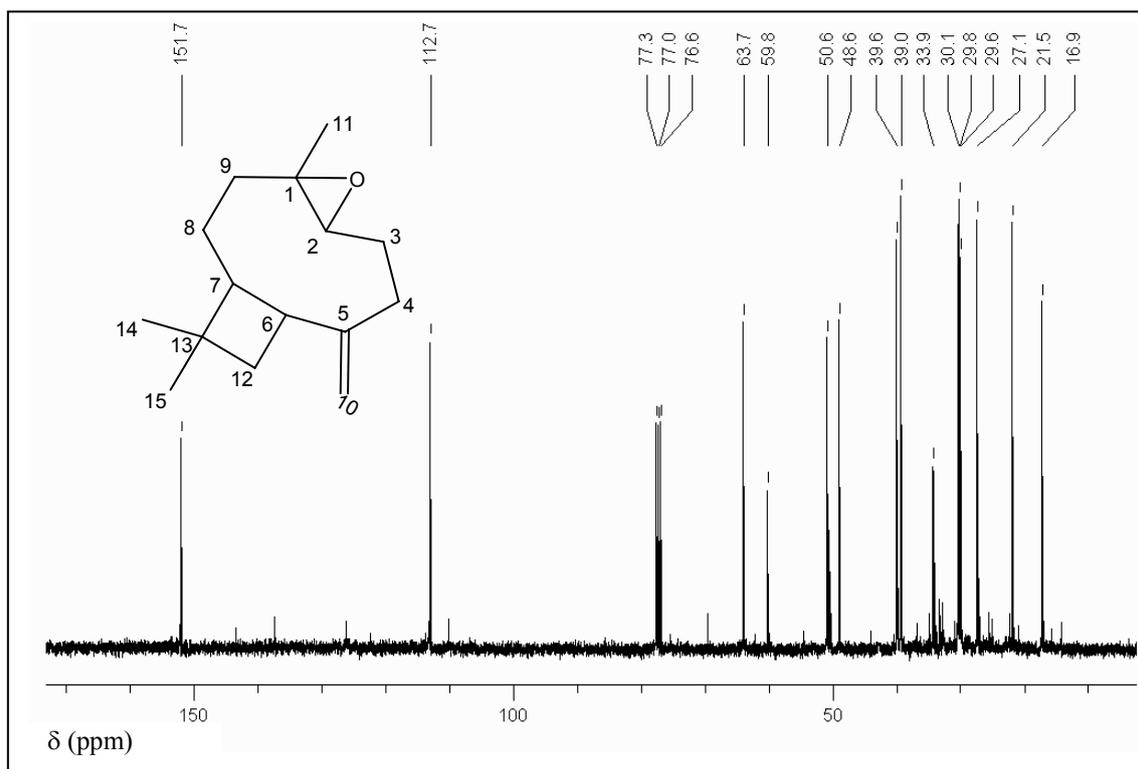
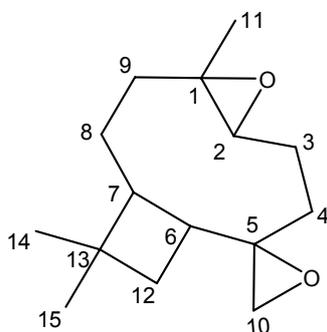


Figura 65 - Espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz) do monoepóxido endocíclico β -cariofileno isolado, obtido na reação de epoxidação químio-enzimática catalisada pela CALB utilizando solução aquosa de H_2O_2 30%, 30 $^\circ\text{C}$, 24 h.

Através da análise dos espectros de RMN puderam ser observados os sinais em 2,86 ppm (RMN- ^1H) referente ao hidrogênio ligado ao carbono 2, e em 59,8 e 63,7 ppm (RMN- ^{13}C) referentes aos carbonos 1 e 2 do anel oxirano e em 112 e 151 ppm (RMN- ^{13}C) os sinais referentes aos carbonos 5 e 10 da ligação dupla do monoepóxido endocíclico. Na análise dos espectros de RMN do diepóxido pôde ser observado, além dos sinais referentes ao anel oxirano endocíclico, o desaparecimento dos sinais em 112 e 151 ppm (RMN- ^{13}C) e o aparecimento em 56 e 61 ppm (RMN- ^{13}C) referentes aos carbonos 5 e 10 do epóxido exocíclico e em 2,88 e 3,08 ppm (RMN- ^1H) referentes aos

hidrogênios ligados ao carbono 10. Os outros dados espectroscópicos estão descritos na pág. 82.



Quando a reação foi realizada em um meio anidro, utilizando como doador peróxido a uréia peróxido de hidrogênio (UPH), as conversões foram quantitativas em monoepóxido do β -cariofileno sem que fosse observada por CG a presença do diepóxido ou subprodutos da reação. Os resultados com a UPH serão discutidos posteriormente. Com o intuito de se evitar a formação de subprodutos foram feitos estudos para avaliar a influência da quantidade de água e o pH nesta reação. Foram utilizados sistemas bifásicos com água/diclorometano (1:1 v/v) e solução tampão fosfato de sódio pH 8,4/diclorometano (1:1 v/v). Os resultados obtidos foram comparados com os do sistema que utilizou somente PHA 30 %.

Os resultados obtidos de conversão em função do tempo estão apresentados na

Figura 66.

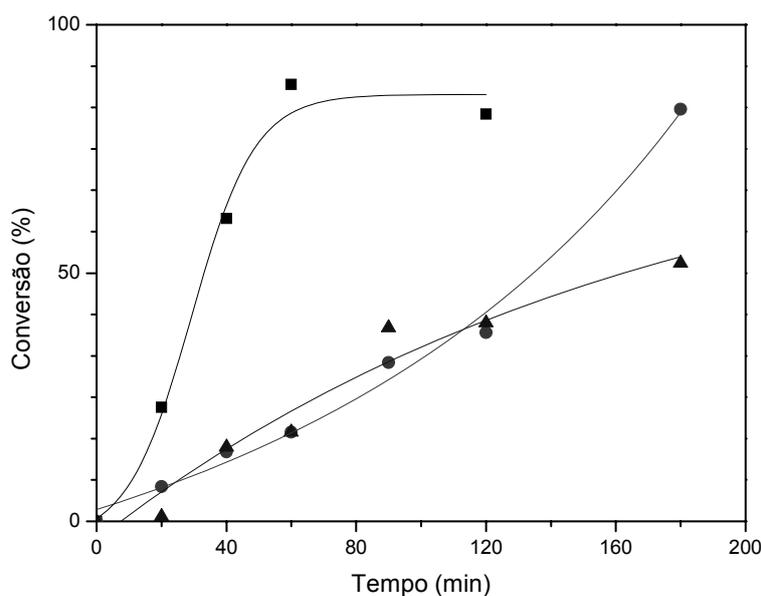


Figura 66 – Conversão em mono-epóxido de β -cariofileno em função do sistema utilizado: (■) PHA 30%, (●) PHA 30% + 5 mL de água, (▲) PHA 30% + 5 mL de tampão fosfato pH 8,4; CALB 100 mg, 6 mL de CH_2Cl_2 , 30 $^{\circ}\text{C}$.

Pode-se observar pelos resultados apresentados na **Figura 63** que quando a reação foi realizada somente com PHA 30 %, as conversões em produto foram mais rápidas que as reações realizadas com sistema bifásico, tamponado ou não.

Em relação aos sistemas bifásicos, o uso do meio tamponado não apresentou uma diferença considerável na velocidade média de conversão quando comparado ao sistema sem a adição de solução tampão sendo ambas de aproximadamente $1,7 \cdot 10^{-2} \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1}$. Quando foram retiradas alíquotas após 6 h de reação, em ambos sistemas também foram detectados, por CG a presença de subprodutos.

As menores velocidades de conversão obtidas com sistemas bifásicos ocorreram provavelmente, devido a menor interação enzima substrato pois o ácido octanóico permanece na porção orgânica enquanto que a enzima permanece na porção aquosa mais volumosa devido à adição de água. O uso de tampão do meio reacional não evitou

a formação de subprodutos nem alterou a velocidade de reação de formação do epóxido no sistema bifásico.

Na seqüência foi avaliado o efeito da massa de enzima utilizada na velocidade de conversão do β -cariofileno em seu respectivo epóxido, variando a mesma de 50 – 300 mg. (**Figura 67**)

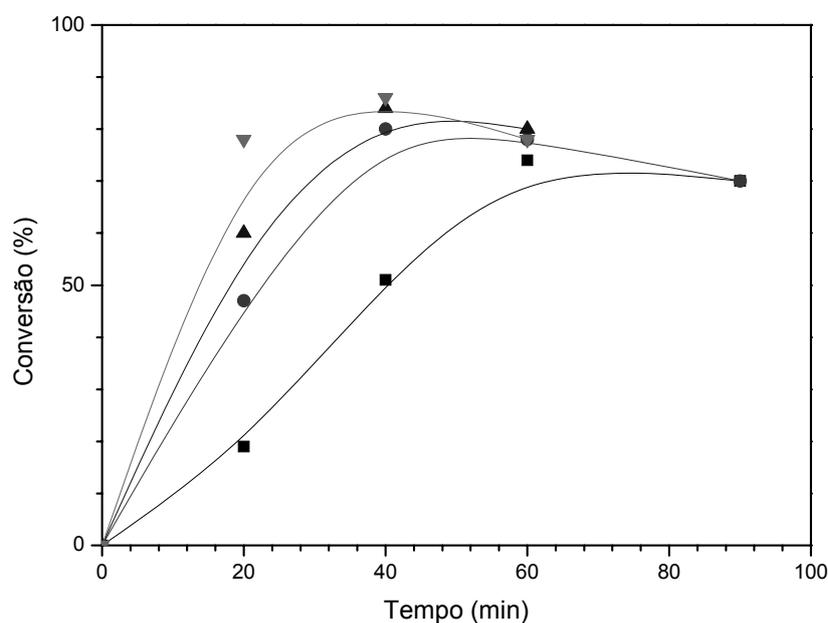


Figura 67 – Conversão em epóxido de β -cariofileno em função do tempo e da massa de CALB: (■) 50, (●) 100, (▲) 200 (▼) 300 mg. [10 mmol de PHA 30 %, 6 mL de CH_2Cl_2 , 10 mmoles do ácido octanóico, 200 rpm, 30 °C]

Como esperado, com o aumento da quantidade de lipase utilizada foi observado um aumento na conversão em epóxido, sendo verificadas conversões de aproximadamente 80 % em 40 min quando foram utilizados de 100 - 300 mg de CALB. Utilizando 50 mg de biocatalisador a conversão máxima alcançada foi de 70 % em 60 min.

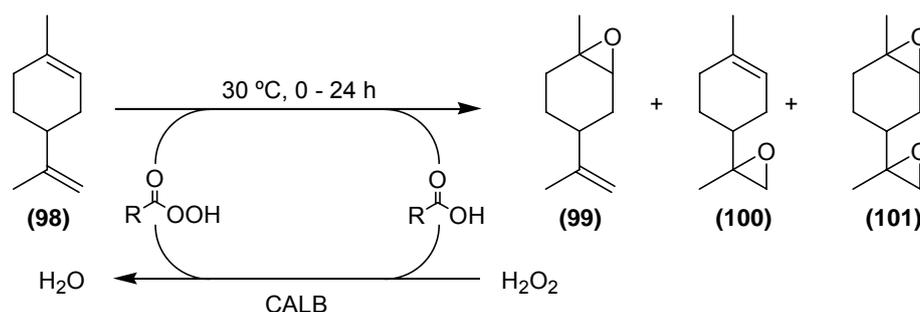
Como nos estudos anteriores, aqui também foi observada uma diminuição no tempo de conversão com aumento da massa de lipase. Contudo ao ser alcançado cerca de 85 % de conversão em epóxido, pôde-se observar a presença de subprodutos da reação, provavelmente produtos de hidrólise do epóxido de β -cariofoleno o que foi determinante para que as conversões se mantivessem nestes valores.

Apesar da presença de subprodutos nesta reação, novamente pôde-se comprovar a regioselectividade das reações através da obtenção de um único produto de epoxidação, o qual foi caracterizado por RMN- ^1H e ^{13}C e apresentou os sinais referentes ao monoepóxido (**95**).

4.2.5 – Epoxidação do D-Limoneno

O limoneno apresenta um carbono quiral e é opticamente ativo, sendo que ambas as formas (D e L) ocorrem naturalmente. Ele é usualmente epoxidado em etapas intermediárias para elaboração de fragrâncias, perfumes e aditivos na indústria alimentícia. Contudo, a epoxidação seletiva de monoterpenos é difícil de ser obtida com perácidos comerciais (p.ex., *m*CPBA) devido a sua força oxidativa, pela qual mono- e di-epóxidos, assim como produtos clivados são obtidos simultaneamente.¹²⁵

A **Figura 68** representa o esquema de epoxidação químico-enzimática do D-limoneno (**98**), catalisada pela CALB e seus possíveis produtos de reação, os monoepóxidos endocíclico (**99**), o e externo ao anel cicloexano (**100**) e o diepóxido (**101**).



R = CH₃(CH₂)_n n = 6 - 12

Figura 68 - Epoxidação químio-enzimática do D-limoneno.

A partir destas informações e visando obter o monoepóxido, fez-se um estudo da epoxidação químio-enzimática do D-limoneno. As reações foram realizadas como descrito na **seção 3.8** (pág. 77).

A reação de epoxidação do D-limoneno foi realizada utilizando o sistema **3.1.1** (pág. 66) catalisado pela CALB com o PHA 30 % como doador peróxido, o ácido octanóico como doador acila e tolueno como solvente, a 30 °C por 24 h.

Foram realizadas duas reações controles nas mesmas condições, uma sem a adição do biocatalisador e outra sem a adição do ácido octanóico; e em ambas não houve formação do produto.

Inicialmente fêz-se um estudo do tempo de reação através da retirada de alíquotas da fase orgânica para a observação da formação dos possíveis produtos por cromatografia gasosa (CG) como demonstrado na **Figura 69**.

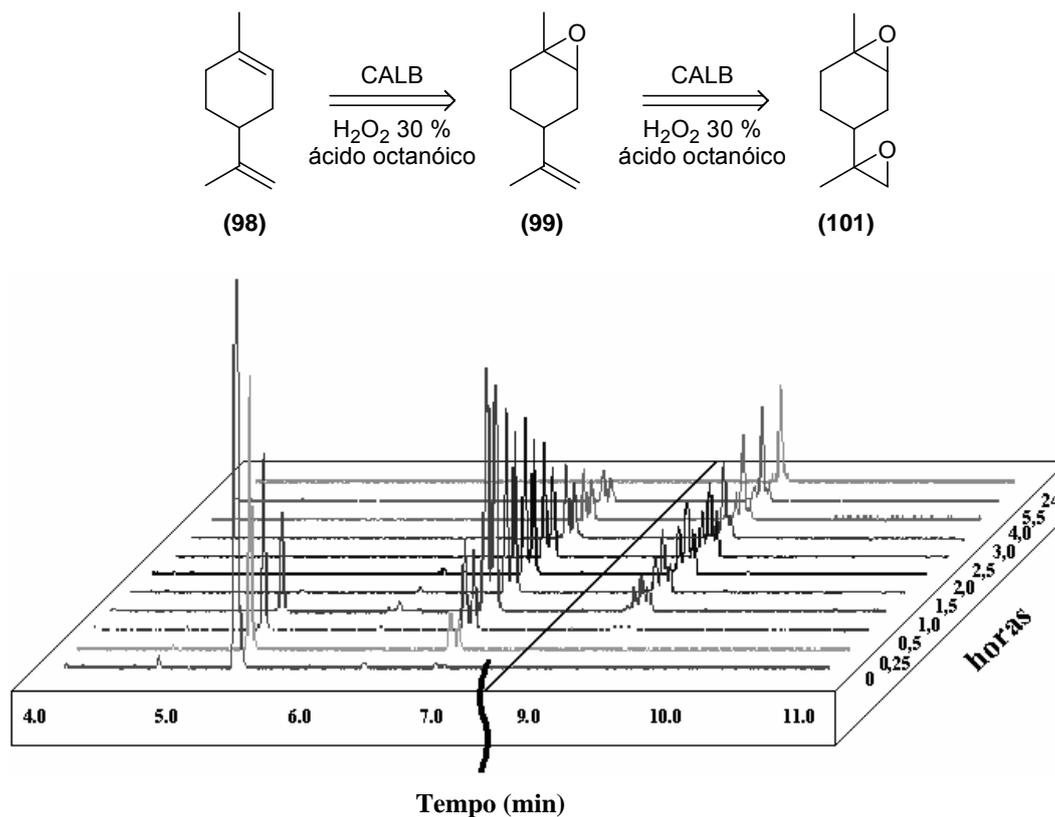


Figura 69 – Esquematização dos cromatogramas da epoxidação regioseletiva do D-limoneno (5mmol). [50 mg de CALB, 10 mmol de PHA 30 %, 6 mL de CH₂Cl₂, 10 mmoles do ácido octanóico, 200 rpm, 30 °C, *Inj.* = 270°C, *Det.* = 280°C, *T_i* = 100°C, *T_f* = 200°C, Δ_{aq} = 5°C/min, *PH₂* = 75 kPa].

Através dos resultados obtidos constatou-se que quando há uma relação de equimolar de peróxi-ácido e de D-limoneno ocorre a epoxidação das duas ligações duplas do terpeno, sendo que esta se procede de forma regioseletiva. Pôde-se observar que, até 15 min de reação, só ocorreu a formação de um único produto com t.r. = 7,0 min. Análises posteriores de RMN demonstraram que este era o monoepóxido endocíclico (99). A partir de 30 min, observa-se a formação de um segundo produto com t.r = 9,6 min e as análises posteriores de RMN revelaram que este era o di-epóxido (101). Após 1,5 h de reação, praticamente não havia mais D-limoneno no meio reacional, e em 24 h somente foi observado o pico referente ao di-epóxido.

O cromatograma e o espectro de massas obtidos da reação após 24 h estão demonstrados nas **Figuras 69 e 70**.

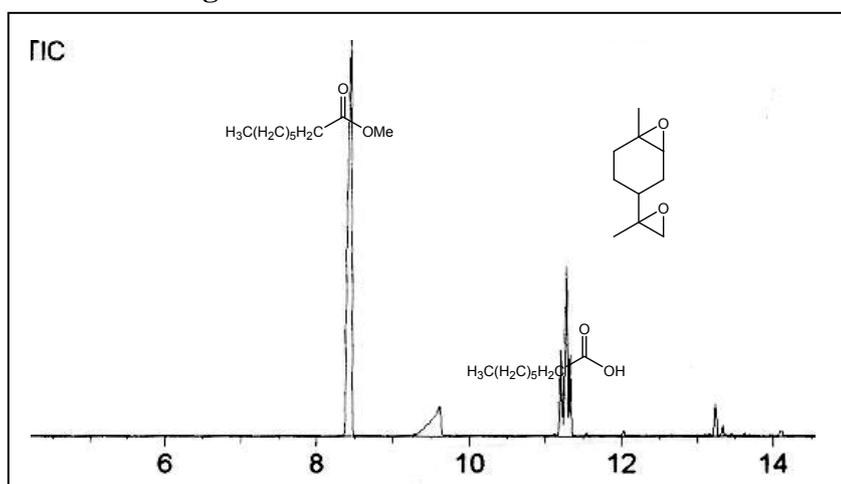


Figura 70 - Cromatograma obtido por CGEM da fase orgânica da epoxidação químio-enzimática do D-limoneno com a CALB em sistema bifásico água/tolueno, 30 °C, 24 h. (*Inj.* = 270°C, *Det.* = 280°C, $T_i = 50^\circ\text{C}$, $T_f = 200^\circ\text{C}$, $\Delta_{aq} = 2^\circ\text{C}/\text{min}$, $PH_2 = 75\text{ kPa}$).

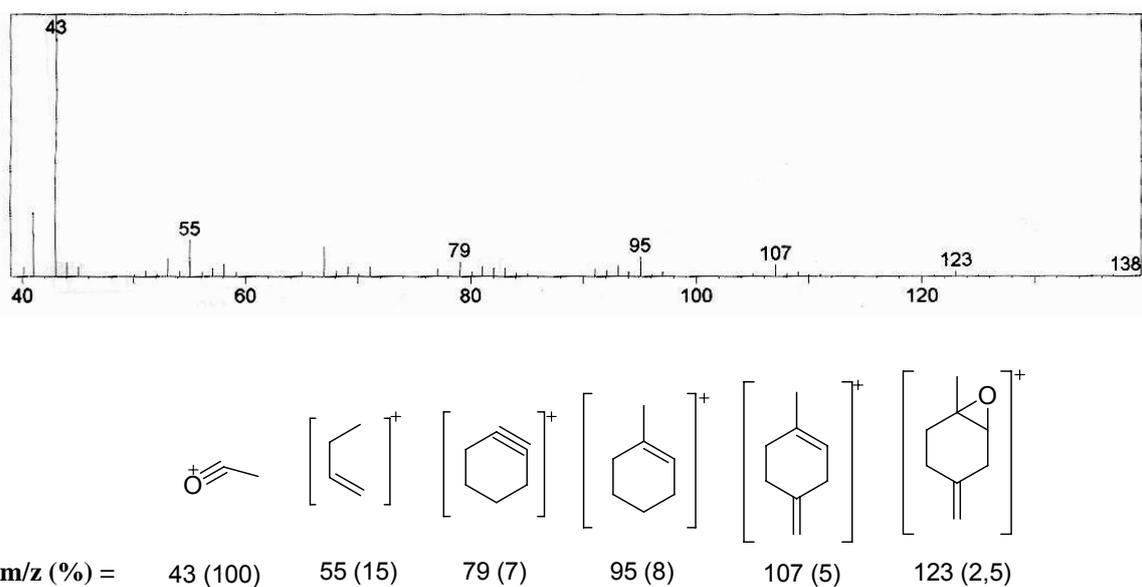
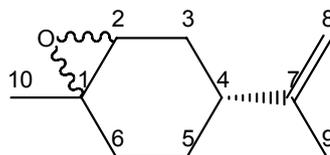


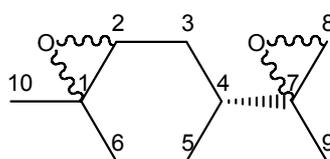
Figura 71 - Espectro de massas do produto (**101**) ($c \approx 99\%$, $m/z = 138$) obtidos por CGEM da fase orgânica da reação de epoxidação químio-enzimática do D-limoneno, com a CALB em sistema bifásico água/tolueno, 30 °C, 24 h. (*Inj.* = 270°C, *Det.* = 280°C, $T_i = 50^\circ\text{C}$, $T_f = 200^\circ\text{C}$, $\Delta_{aq} = 2^\circ\text{C}/\text{min}$, $PH_2 = 75\text{ kPa}$).

Pode-se observar, através da **Figura 71**, que após 24 h houve formação de apenas um produto de epoxidação (t.r. = 11,2 min), e que de acordo com os picos observados no espectro de massas e é referente ao diepóxido (**101**). O sinal com t.r. de 13,2 min, pertence a impurezas não especificadas oriundas do reagente comercial. Os sinais com t.r. de 8,5 e 9,5 min são referentes ao octanoato de metila e ácido octanóico, respectivamente. As diferenças nos tempos de retenção observadas entre as **Figuras 69** e **70**, foram ocasionadas pelas diferentes temperaturas de iniciais da coluna e equipametos utilizados.

As formações dos epóxidos do D-limoneno puderam ser confirmadas através da análise dos espectros de RMN-¹H e ¹³C dos produtos isolados, onde foram observados os sinais em 3,07 e 4,70 ppm (RMN-¹H) referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos 2 e 8 e em 57, 60, 109 e 149 ppm (RMN-¹³C) referentes aos carbonos 1, 2, 7 e 8 do monoepóxido endocíclico. Outros dados espectroscópicos estão descritos na pág. 82.



No espectro obtido do diepóxido além dos sinais do anel oxirano endocíclico em 2,85 ppm (RMN-¹H) e 57, 58 ppm (RMN-¹³C) foi também observado os sinais em 2,37 e 2,47 ppm (RMN-¹H) referentes aos hidrogênios ligados ao carbono 8 e em 53 e 58 ppm (RMN-¹³C) referentes aos carbonos 7 e 8 do epóxido exocíclico. Outros dados espectroscópicos estão descritos na pág. 82.



Na seqüência, fez-se um estudo das velocidades de peridrólise do ácido octanóico e de epoxidação do D-limoneno em função da concentração de ácido octanóico com objetivo de avaliar qual é a etapa determinante na reação global de epoxidação químio-enzimática do D-limoneno.

A determinação das conversões de diversas concentrações do ácido octanóico (1-40 mmol) em peróxi-ácido foi realizada através de titulações potenciométricas como descrito na **seção 3.4** (pág. 74). A titulação pôde ser realizada devido a diferença de pKa's entre o ácido octanóico ($4,78 \pm 0,10$, 25°C) e o perácido octanóico ($7,95 \pm 0,40$, 25°C).** A **Figura 72** mostra a curva potenciométrica obtida para a titulação do sistema com 5,0 mmol de ácido octanóico catalisada pela CALB (100 mg) na presença de peróxido de hidrogênio 30 % (10 mmol), após 20 min à 30°C .

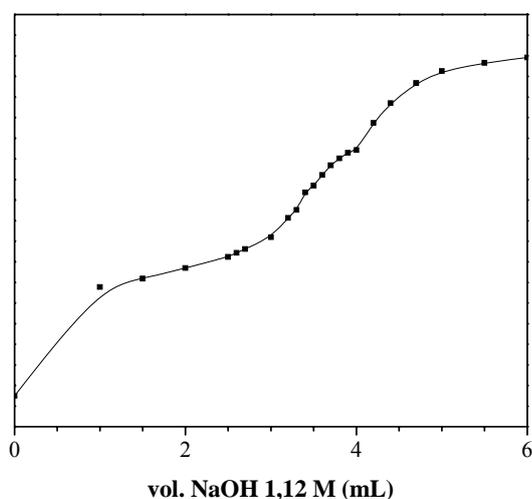


Figura 72 – Curva potenciométrica obtida na titulação, com solução de NaOH 1,12 M, da reação de peridrólise do ácido octanóico (5,0 mmol) catalisada pela CALB na presença de peróxido de hidrogênio 30 %, após 20 min à 30°C .

As curvas derivadas das curvas potenciométricas, como o exemplo apresentado na **Figura 73**, obtidas através do programa Origin 7.5, forneceram os volumes de NaOH

** Calculado pelo Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V8.14 for Solaris (© 1994-2008 ACD/Labs)

dos pontos de viragem para esta titulação. A partir destes dados puderam ser calculadas as conversões em peróxi-ácido para os sistemas com diferentes concentrações do ácido octanóico.

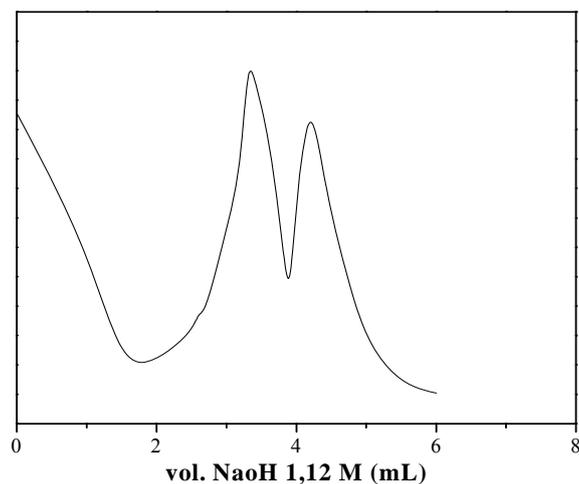


Figura 73 – Gráfico da derivada da curva potenciométrica obtida da titulação da reação de peridrólise do ácido octanóico (**Figura 72**).

Pode-se observar através da **Figura 73** que foram gastos 3,34 mL de solução de NaOH 1,12 M para a titulação do ácido octanóico e 0,90 mL, obtido pela diferença dos valores, para a do perácido. Calculando o número de mols de ácido e de perácido octanóico obteve-se uma conversão de 21 % em peróxi-ácido.

Na **Figura 74** estão relacionados os resultados obtidos através da titulação potenciométrica com os obtidos nas reações de epoxidação do D-limoneno por CG. O objetivo neste experimento foi determinar se a conversão em perácido medida estava coerente com a formação do epóxido de D-limoneno.

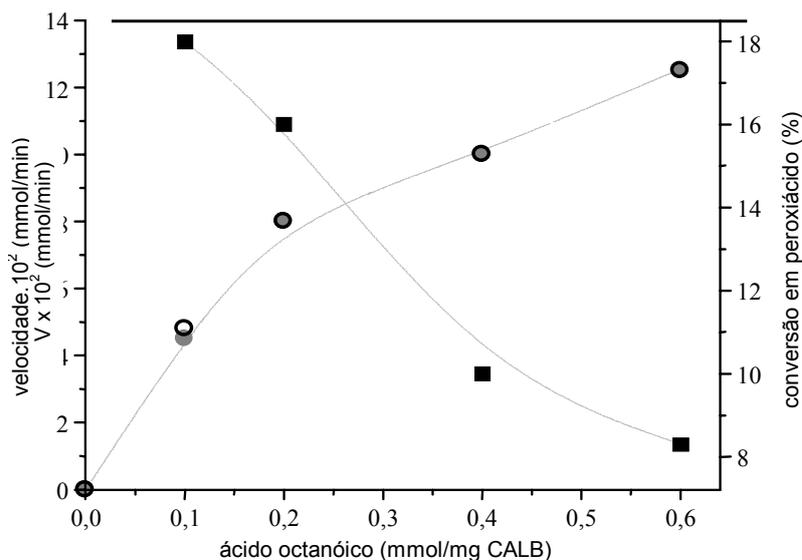


Figura 74 - (●) Velocidade de peridrólise do ácido octanóico, (○) velocidade de epoxidação do D-limoneno e (■) conversão percentual em peroxiácido octanóico em função da concentração de ácido octanóico utilizado na reação de epoxidação químio-enzimática do D-limoneno à 30 °C. Cond. exp. descritas na Figura 72.

Os resultados apresentados na **Figura 74** mostraram que a peridrólise é dependente da quantidade de ácido octanóico utilizada, sendo a velocidade do processo mais rápido com $0,26 \text{ mmol.mg}^{-1}$ de CALB. A conversão em monoepóxido (**99**) é diretamente proporcional ao tempo reacional e à formação do peroxiácido carboxílico que, após formado, é prontamente consumido na etapa de epoxidação. Também foi observada uma pequena formação do produto (**101**) (5%) com 10 e 20 mmoles de ácido octanóico e a formação de (**100**) não foi observada.

O cruzamento dos dados obtidos por titulação potenciométrica com os obtidos por cromatografia gasosa, demonstrou a grande exatidão na determinação direta, com NaOH, da concentração do peróxi-ácido em soluções contendo ácido carboxílico, como pode ser observado na **Figura 74**. Estes resultados estão de acordo com os obtidos anteriormente na titulação iodométrica (**Figura 48**, pág. 86) e foram iguais aos observados para formação químio-enzimática do epóxido do D-limoneno por CG.

Apesar de aparentemente simples, não foi encontrado na literatura um método de determinação por titulação potenciométrica da concentração de peróxi-ácido em soluções contendo ácidos carboxílicos baseado na diferença de pKa entre esses compostos. Em geral os métodos estão baseados em reações de oxidorredução.¹²⁶

A síntese de peróxi-ácidos de cadeias longas pela via química tradicional exige o uso de ácidos minerais e condições reacionais drásticas, fatores que limitam o uso deste reagente. Porém estes peróxi-ácidos podem ser obtidos e utilizados *in situ* em condições brandas, como no experimento citado anteriormente (temperatura de 30 °C, pH neutro), quando se aplica a catálise enzimática como *via* de obtenção dos mesmos, sendo esta uma das vantagens desta metodologia.

Na seqüência foi realizado um estudo da epoxidação do (+)-3-careno.

4.2.6 - Epoxidação do (+)-3-Careno

A reação de epoxidação químio-enzimática do (+)-3-careno foi realizada como descrito na seção 3.8 (pág. 77).¹²⁷ (Figura 75)

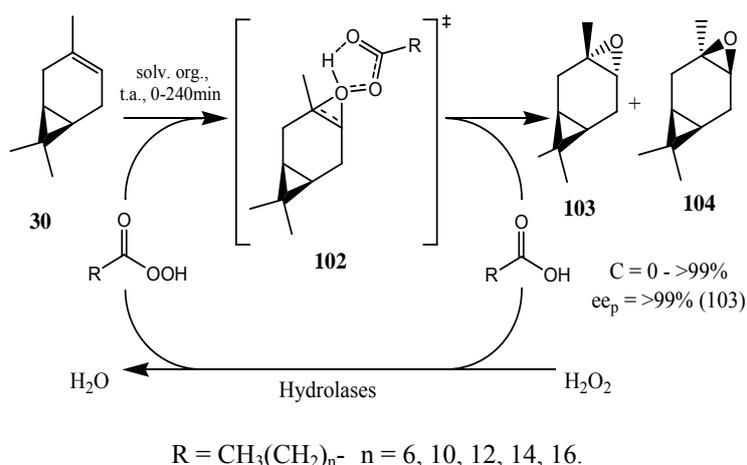


Figura 75 – Epoxidação químio-enzimática do (+)-3-careno.

Foram investigados diversos parâmetros, tais como o tipo de biocatalisador e sua reutilização, o doador acila e o solvente empregado, a velocidade de agitação do sistema e a estereosseletividade do processo.

Primeiramente foram testadas na reação de epoxidação químio-enzimática do (+)-3-careno, quatro proteases (A, ácida A, P e Proleather FG-F) e cinco lipases (*Pseudomonas* sp. C e D, Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM, CALB).

Somente a reação catalisada pela CALB apresentou formação do epóxido (**103**) com conversão > 99 % em 90 min, e não foi observada a formação do epóxido (**104**). Nestas condições utilizando as outras oito enzimas, não foi detectada a formação do produto. Este resultado reflete a maior estabilidade da CALB provavelmente por estar imobilizada em uma resina aniônica, e portanto esta foi utilizada nos experimentos seguintes.

A formação do epóxido de (+)-3-careno pôde ser confirmada através da análise dos espectros de RMN-¹H e ¹³C do produto isolado. A **Figura 76** traz o espectro de RMN-¹H do epóxido do (+)-3-careno (**103**) obtido e isolado da reação de epoxidação químio-enzimática. Através da análise dos espectros puderam ser observados os sinais em 2,81 ppm (RMN-¹H) referente ao hidrogênio ligado ao carbono 2 e em 55 e 58 ppm (RMN-¹³C) referentes aos carbonos 1 e 2, característicos do anel oxirano.

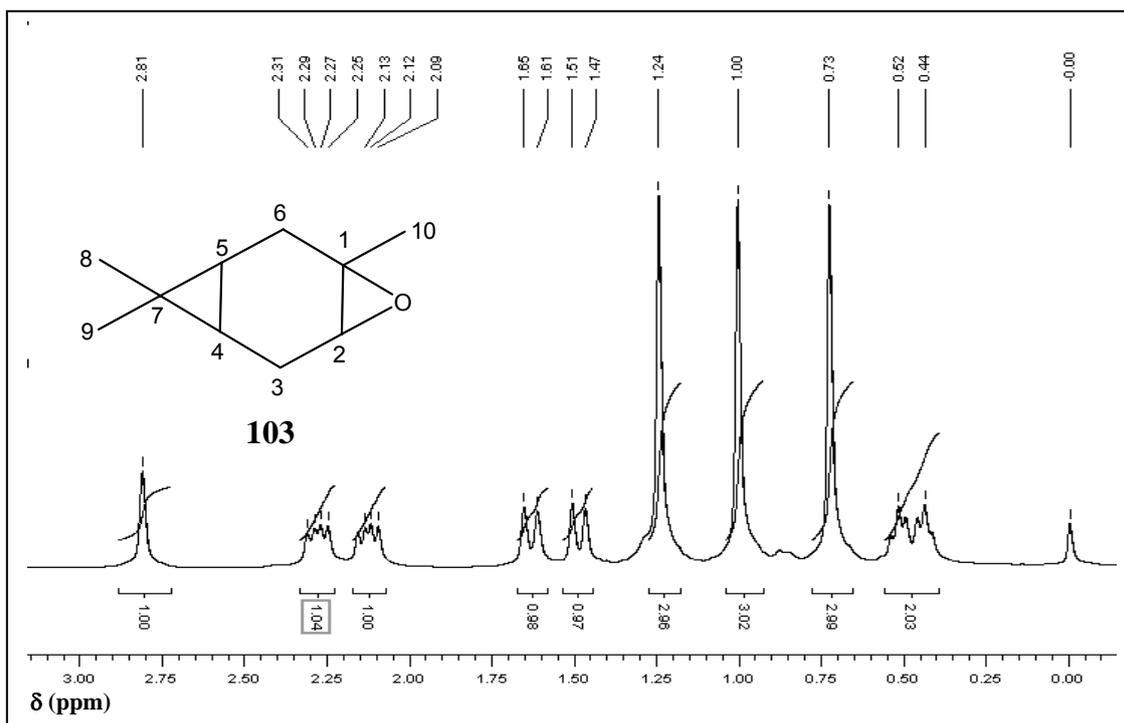


Figura 76 - Espectro de RMN-¹H (400 MHz) do epóxido do (+)-3-careno isolado, obtido na reação de epoxidação químico-enzimática catalisada pela CALB utilizando solução aquosa de H₂O₂ 30%, 30 °C, 24 h.

A formação do epóxido foi avaliada em função da velocidade de agitação do agitador orbital. Resultados diferentes foram observados à diferentes velocidades do agitador.

A conversão em epóxido (**103**) foi dependente da velocidade de agitação. Os resultados estão apresentados na **Figura 77**.

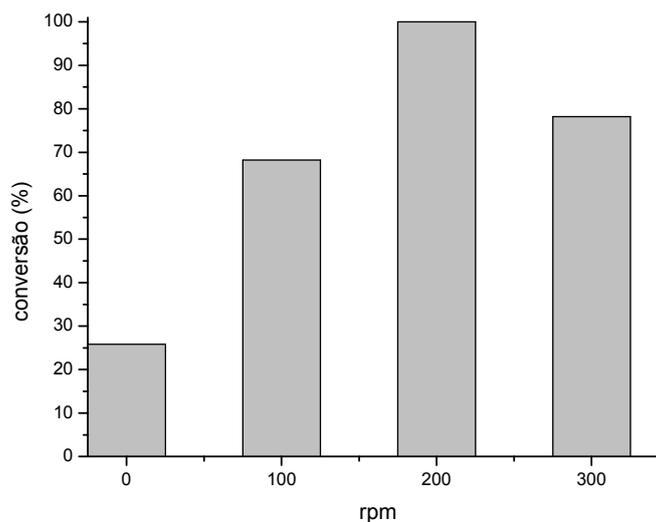


Figura 77 – Variação da conversão em epóxido de (+)-3-careno em função da velocidade de rotação do agitador orbital após 90 min. [50 mg de CALB, 10 mmol de PHA 30 %, 6 mL de CH_2Cl_2 , 10 mmoles do ácido octanóico, 30 °C, agitador orbital Certomat MO, B. Braun Biotech Int]

Como apresentado na **Figura 77** foram obtidas conversões quantitativas do (+)-3-careno em seu epóxido em 90 min com uma velocidade de agitação de 200 rpm. Quando utilizaram-se velocidades de 0, 100 e 300 rpm as conversões alcançadas foram de 26, 68 e 78 %, respectivamente. Como descrito por Cabral *e col.*, para a esterificação do ácido oléico e etanol, utilizando baixas velocidades de agitação o equilíbrio de conversão leva um tempo maior para ser atingido, portanto é necessário mais tempo para que a reação se complete.¹²⁸ Utilizando altas velocidades, como 300 rpm, o sistema apresentou um vortex muito grande, ocasionado pelo pequeno volume de solvente e conseqüentemente foi observada uma diminuição na conversão. Baseado nestes resultados, foi escolhida a velocidade de agitação de 200 rpm para os estudos seguintes.

Foi avaliado o efeito da massa de enzima utilizada na velocidade de conversão do (+)-3-careno em seu respectivo epóxido (**103**), variando a mesma de 25 – 500 mg.

(Figura 78)

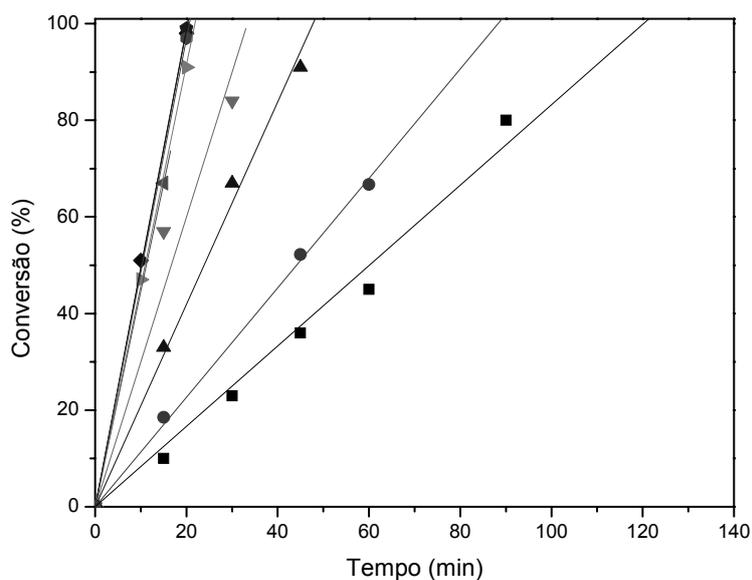


Figura 78 – Conversão em epóxido de (+)-3-careno em função do tempo com diferentes massas de CALB: (■) 25 mg, (●) 50 mg, (▲) 100 mg, (▼) 150 mg, (◀) 200 mg, (▶) 250 mg, (◆) 300 mg, (●) 400 mg, (●) 500 mg. [10 mmol de PHA 30 %, 6 mL de CH₂Cl₂, 10 mmoles do ácido octanóico, 200 rpm, 30 °C].

Aqui, como em outros experimentos o aumento da massa de lipase também levou a um aumento na velocidade de conversão em epóxido, contudo com quantidades acima de 200 mg de lipase as inclinações das curvas permaneceram praticamente inalteradas. Este efeito pode ser melhor observado através do gráfico da velocidade de formação do epóxido de (+)-3-careno em função da massa de lipase utilizada, como apresentado na **Figura 79**.

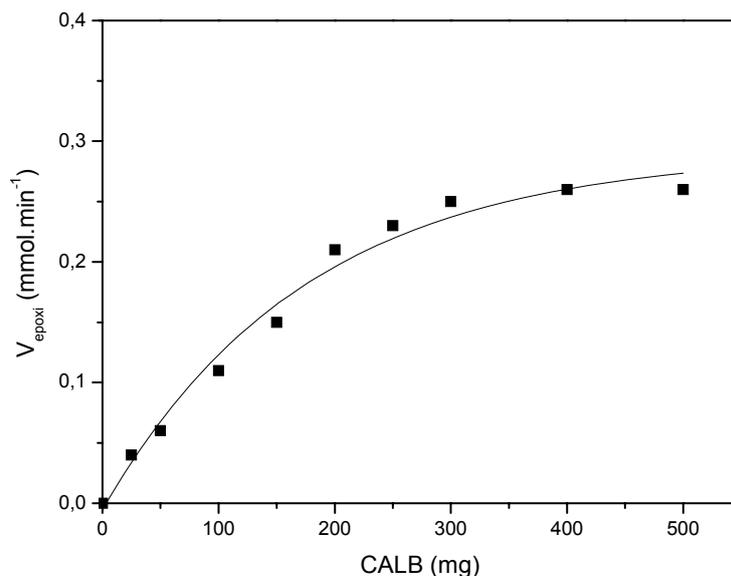


Figura 79 – Velocidade de conversão em epóxido de (+)-3-careno em função da massa de CALB. [Condições experimentais como descritas na **Figura 78**].

Como observado na **Figura 79**, a velocidade de conversão aumentou em função do aumento da massa de lipase utilizada, sendo praticamente linear até 200 mg com um coeficiente de correlação de 0,9967. A partir deste ponto foi alcançado um platô, demonstrando a saturação do sistema. Em todos os experimentos a conversão em epóxido (**3**) foi >99 %.

As maiores velocidade de epoxidação foram obtidas utilizando 200 – 500 mg de CALB, sendo de $2,50 \times 10^{-1} \text{ mmol.min}^{-1}$. Com 50 mg de CALB, a reação apresentou uma velocidade de $5,56 \times 10^{-2} \text{ mmol.min}^{-1}$. Entretanto, esta massa de CALB foi selecionada para os experimentos seguintes baseado na relação custo-benefício, sendo que tanto para 50 quanto para 200 mg, a conversão em epóxido (**103**) foi >99 % e a duração dos experimentos relativamente baixas (30 min e 90 min, respectivamente).

Em um outro experimento, foi investigado o efeito do comprimento da cadeia do doador acila na epoxidação químio-enzimática do (+)-3-careno com peróxido de

hidrogênio. A **Tabela 6** mostra a conversão do (+)-3-careno ao seu correspondente epóxido utilizando ácidos orgânicos com diferentes tamanhos de cadeia em função do tempo de reação.

Tabela 6 – Influência do comprimento da cadeia do doador acila na epoxidação químio-enzimática do (+)-3-careno catalisada pela lipase de CALB.

Doador acila	Conversão (%)				Veloc. x 10 ² (mmol.min ⁻¹)
	Tempo (min)				
	15	60	90	120	
ácido octanóico	20	66	>99	--	5.6
ácido láurico	25	57	82	>99	4.2
ácido mirístico	21	56	72	90	3.8
ácido palmítico	16	52	73	90	3.8
ácido esteárico	29	62	89	>99	4.2

a) 10 mmol de PHA 30 %, 6 mL de CH₂Cl₂, 10 mmoles do doador acila, 200 rpm, 30 °C].

As velocidades de conversão, demonstradas na **Tabela 6**, foram de mesma magnitude variando de 4 x 10⁻² mmol.min⁻¹ (para os ácidos láurico, mirístico, palmítico e esteárico) à 5.6 x 10⁻² mmol.min⁻¹ (para o ácido octanóico), sendo este último o melhor resultado.

Resultados similares foram descritos por Klass e Warwel para a epoxidação do 1-octeno.¹¹¹ A seletividade ao comprimento da cadeia dos ácidos graxos é geralmente dependente das propriedades nativas da enzima, e mostra a mesma tendência observada em reações de esterificação, como demonstrado por Dalla-Vecchia *e col.* na síntese enzimática de ésteres *n*-pentílicos catalisadas pela lipase de *Candida rugosa*.⁶⁶ A reação

de esterificação envolve em sua primeira etapa a formação de um intermediário tetraédrico acil-enzima, o qual depende do comprimento da cadeia do ácido, e este fator deve ser considerado devido também à afinidade existente entre a enzima e o ácido.⁶

A literatura recente descreve a sensibilidade da atividade enzimática em função da escolha do solvente utilizado na biotransformação.^{23,58} Geralmente observa-se que o uso de solventes com $\log P > 4,0$ (de baixa polaridade) resulta em melhores velocidades de reação. Solventes hidrofóbicos preservam a atividade catalítica sem afetar a microcamada aquosa da enzima como descrito por Klibanov *et al.*^{6,23}

A partir destes resultados, foi também avaliado o efeito de alguns solventes orgânicos de diferentes polaridades, tais como hexano, tolueno, acetonitrila, diclorometano e misturas de diclorometano com os líquidos iônicos (LI) (tetrafluoroborato de 1-butil-3-metil imidazólio ([BMIm][BF₄]) e hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazólio [BMIm][PF₆], 10:1 v/v) no meio reacional para obtenção do epóxido (**103**).

As conversões em epóxido de (+)-3-careno em função do tempo de reação e do solvente orgânico, puro ou em misturas, estão mostrados na **Figura 80** e demonstram ser dependentes do solvente orgânico empregado. Contudo, não foi observada uma relação linear entre a conversão em epóxido e a polaridade do solvente utilizado (expressa em $\log P$).

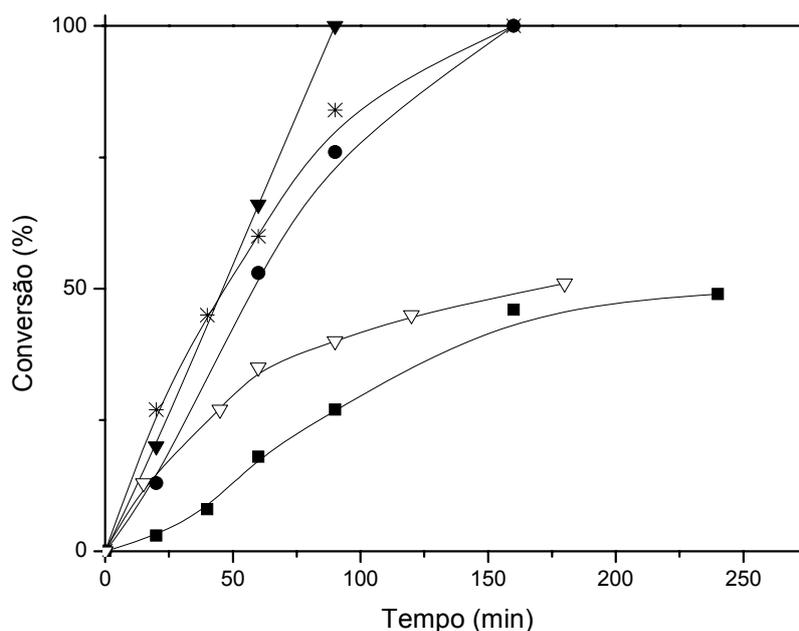


Figura 80 – Conversão em epóxido de (+)-3-careno em função do solvente: (■) hexano, (●)tolueno, (*) acetonitrila, (▼) diclorometano, (▽) diclorometano:[BMIm][PF₆]. [50 mg de CALB, 10 mmol de PHA 30 %, 6 mL de solvente, 10 mmoles do ácido octanóico, 200 rpm, 30 °C].

Observa-se que as maiores conversões foram obtidas quando foram utilizados o tolueno ($\log P = 2,50$), o diclorometano ($\log P = 1,18$) e a acetonitrila ($\log P = -0,33$), sendo todas $>99\%$. As velocidades médias de conversão, calculadas partir dos dados obtidos, foram praticamente as mesmas, sendo $4,0 - 5,5 \times 10^{-2} \text{ mmol min}^{-1}$.

Os resultados obtidos nas reações usando tolueno, diclorometano e hexano ($4,0 \times 10^{-2}$, $5,5 \times 10^{-2}$ e $1,7 \times 10^{-2} \text{ mmol min}^{-1}$, respectivamente) estão de acordo com resultados prévios obtidos na epoxidação químico-enzimática do cicloexeno.⁶⁸

Com a acetonitrila a velocidade de $5,0 \times 10^{-2} \text{ mmol min}^{-1}$, alcançada na formação do epóxido (**103**), foi similar àquelas obtidas com tolueno e diclorometano. Na literatura está bem descrita a habilidade de solventes polares na desativação de enzimas à baixas concentrações de água.^{19,129,130,131} Mas, neste caso, provavelmente o

uso de PHA 30% forneceu a quantidade de água necessária para manter a atividade enzimática, e desta forma pôde-se obter uma conversão quantitativa em epóxido (**103**) após 125 min com este solvente. Zhang *e col.* demonstraram que para a síntese regioseletiva de monoésteres de piridoxina em acetonitrila, somente traços de água foram suficientes para manter a quantidade de água essencial para que a enzima mantivesse sua conformação e sua conseqüentemente as funções catalíticas de forma apropriada.¹³²

Na seqüência foram utilizadas misturas (10:1 v/v) de diclorometano:líquidos iônicos (LI) nas reações. Utilizando a mistura diclorometano:[BMIm][BF₄], não foi detectada a formação do produto. Utilizando um LI mais hidrofóbico [BMIm][PF₆], foi observada a formação de produto, mas a velocidade média de $2,0 \times 10^{-2} \text{ mmol min}^{-1}$ foi inferior a obtida com diclorometano puro sendo $5,5 \times 10^{-2} \text{ mmol min}^{-1}$.

Estes resultados podem ser explicados considerando que o LI mais hidrofílico [BMIm][BF₄] tem a tendência de desorver a água da superfície da enzima e desta forma diminuir sua atividade catalítica.

Para analisar os resultados obtidos, deve-se considerar que o solvente orgânico escolhido, puro ou em mistura, deve ser adequado às condições deste sistema que envolve uma peridrólise biocatalisada seguida por uma epoxidação via peróxi-ácido. Na primeira etapa os melhores solventes são aqueles com um log P entre 2,0 e 4,0, e para segunda aqueles que estabilizam o estado de transição (**102**), através de ligações de hidrogênio.

A reutilização da CALB também foi investigada. Após cada ciclo reacional a lipase foi lavada com diclorometano e com água para remover o ácido octanóico, o (+)-3-careno residual e o PHA 30 %. A enzima foi utilizada por quatro ciclos sem uma

perda considerável de sua atividade, sendo as conversões > 99, 90, 94 e 85 %, respectivamente. Contudo, após o quinto ciclo a conversão foi inferior à 50 %, demonstrando a influência do PHA na atividade enzimática.

Na continuidade do trabalho tentou-se usar um meio reacional sem a presença de água, pois esta em alguns experimentos pode ter conduzido a formação de sub-produtos. Em um meio anidro, também é possível a utilização de filmes biodegradáveis como os de caseinato de sódio, para imobilização de enzimas. Desta forma esperava-se que não ocorresse a desnaturação do biocatalisador provocada pelo contato direto com o peróxido de hidrogênio. Com este intuito, foi utilizada a uréia peróxido de hidrogênio (UPH) como doador peróxido. Os resultados obtidos serão apresentados e discutidos no ítem seguinte.

4.2.7 – Estudo da Variação do Doador do Grupo Peróxido

Fez-se um estudo comparativo da epoxidação químio-enzimática do α -pineno, (+)-3-careno, (\pm)-citronelol, carvona e β -pineno, utilizando a uréia peróxido de hidrogênio (UPH) e o peróxido de hidrogênio aquoso (PHA 30 %) como doadores de peróxido de hidrogênio na reação. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 81**. As reações foram realizadas como descrito na **seção 3.8** (pág.77).

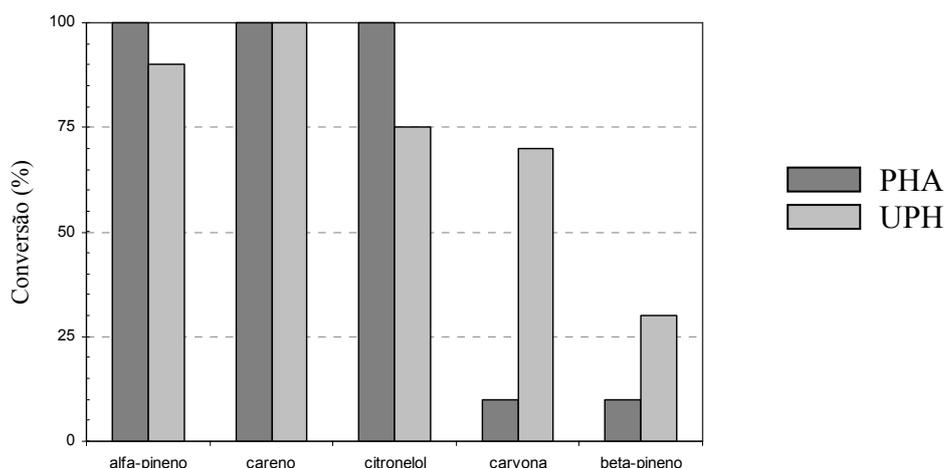


Figura 81 – Conversão em epóxido do α -pineno, (+)-3-careno, (\pm)-citronelol, carvona e β -pineno em função do doador peróxido. [50 mg de CALB, 10 mmol de UPH 18 %, 6 mL de diclorometano, 10 mmoles do ácido octanóico, 200 rpm, 3 h, 30 °C].

Como pode ser observado na **Figura 80**, o α -pineno, o (+)-3-careno e o (\pm)-citronelol apresentaram valores de conversão entre 75 e >99 %, com os dois sistemas. Na epoxidação do β -pineno e da carvona, os sistemas que utilizaram a UPH como doador peróxido apresentaram conversões de 30 e 70 % respectivamente, sendo estes superiores aos resultados obtidos na utilização do PHA, que foi de \approx 10 % para ambos terpenos.

Na seqüência fez-se um estudo da formação de diversos epóxidos em função do tempo de reação utilizando a UPH como doador do grupo peróxido. Os resultados obtidos estão demonstrados na **Figura 82**.

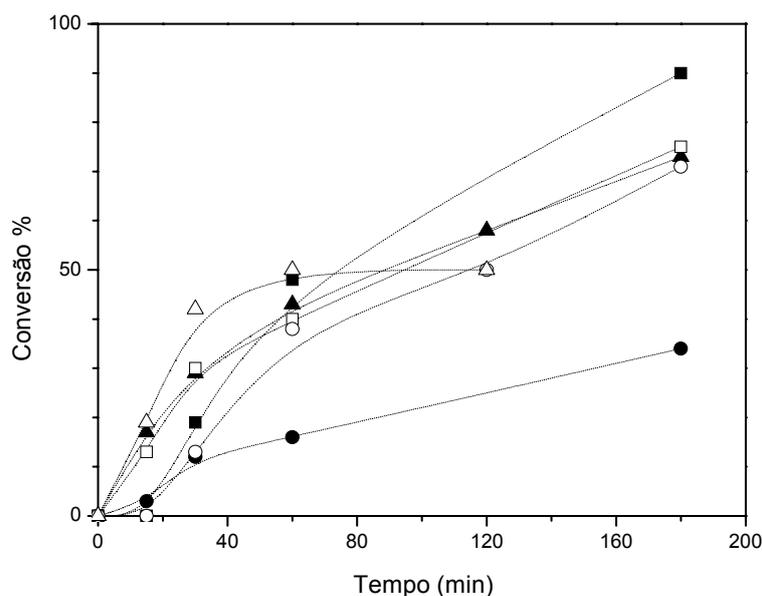


Figura 82 – Conversão em epóxido em função do tempo na reação de epoxidação quimioenzimática de terpenos (5 mmol) utilizando a UPH como doador peróxido e CALB à 35 °C. (■) α-pineno, (●) β-pineno, (▲) (R)-(+)-carvona, (□) (+)-3-careno, (○) (±)-citronelol, (△) D-limoneno. [50 mg de CALB, 10 mmol de UPH 18%, 6 mL de solvente, 10 mmoles do ácido octanóico, 200 rpm, 3 h, 30 °C].

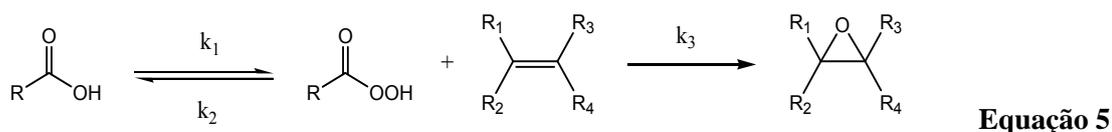
Pode-se observar na **Figura 82** que neste sistema as melhores conversões, de 70 a 90 % em epóxido, foram obtidas com o α-pineno, a (R)-(+)-carvona, o (+)-3-careno e o (±)-citronelol. Com o D-limoneno, apesar de uma conversão de 50 %, só foi observada a formação do monoepóxido e com o β-pineno a conversão foi de 30 %.

A partir dos dados da **Figura 82** puderam ser calculadas as velocidades médias de formação dos epóxidos. Para o sistema com a carvona ($2,0 \times 10^{-2} \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1}$) foi comparável às velocidades alcançadas para os terpenos marcadamente de epoxidação mais fácil como o α-pineno, o careno e o (±)-citronelol ($\approx 2 \times 10^{-2} \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1}$). O sistema com o D-limoneno alcançou a maior taxa de conversão, levando-se em consideração a formação de um único epóxido ($4,5 \times 10^{-2} \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1}$). Já o sistema

com o β -pineno, provavelmente devido ao seu maior impedimento estereo, foi observada uma menor taxa de conversão, sendo esta de $8,3 \times 10^{-3} \text{ mmol}\cdot\text{min}^{-1}$.

Quando comparadas às velocidades calculadas, a partir da **Figura 82**, para os sistemas onde foi utilizada a UPH com as obtidas nos experimentos anteriores com PHA, pode-se observar que, exceto para a carvona e o β -pineno, as taxas de conversão com PHA ($8,3\text{-}12,3 \times 10^{-2} \text{ mmol}\cdot\text{min}^{-1}$) são de uma forma geral maiores que as obtidas com UPH ($2,0\text{-}4,5 \times 10^{-2} \text{ mmol}\cdot\text{min}^{-1}$).

Este comportamento provavelmente está associado às constantes de equilíbrio entre as reações de peridrólise do ácido (k_1), de hidrólise do perácido (k_2) e da epoxidação do terpeno (k_3). (**Equação 5**)



Como a ligação dupla dos terpenos α -pineno, (+)-3-careno e (\pm)-citronelol são facilmente oxidadas, a constante para a reação de epoxidação é maior que a constante de hidrólise do perácido ($k_3 > k_2$). Desta forma, assim que o peróxi-ácido é formado ocorre a epoxidação do terpeno, como observado na **Figura 74** (pág. 117) para o D-limoneno. Postula-se que a quantidade de água no meio não influenciou de forma significativa na velocidade global da reação. Sendo assim, tanto o meio com PHA quanto com UPH apresentaram conversões aos respectivos epóxidos com valores similares. Mas quando as reações foram feitas com terpenos com ligações duplas com baixa densidade de elétrons, como a carvona e o β -pineno, a velocidade de hidrólise do peróxi-ácido é significativa, pois a velocidade de epoxidação se torna menor ($k_3 \leq k_2$), e desta forma

meios reacionais sem a presença de água, como o que utiliza UPH, favorecem a formação do epóxido.

Outra hipótese pode ser a baixa solubilidade da UPH em solvente orgânico, dificultando assim sua interação com a CALB e levando mais tempo para que ocorra a peridrólise do ácido e desta forma diminuindo o valor de k_1 .

Contudo a ausência quase completa de água no meio reacional na utilização da UPH, fornece um meio onde pode ser evitado o surgimento de subprodutos de epoxidação, como p. ex., os observados na reação com o do β -cariofileno.

Com intuito de se tentar evitar a formação destes subprodutos, fêz-se então a reação de epoxidação químico-enzimática do β -cariofileno utilizando a UPH como doador do grupo peróxido em um sistema livre de água. (**Figura 83**)

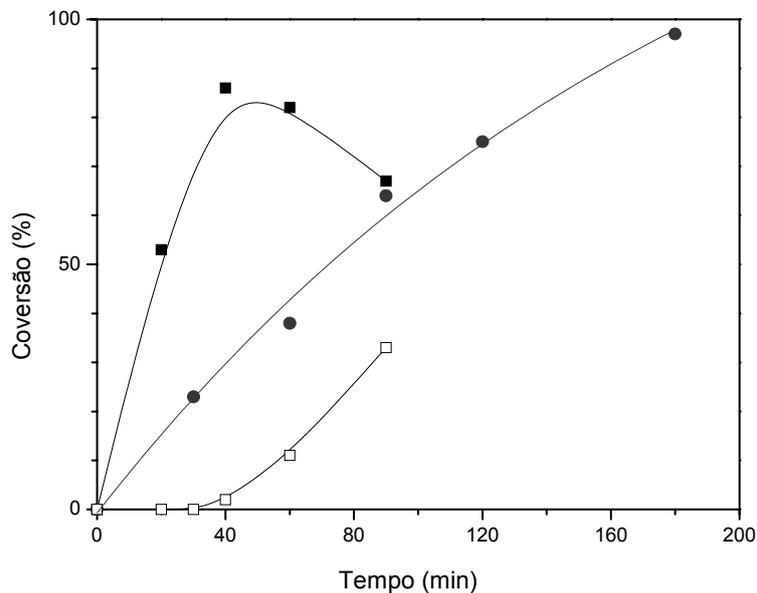


Figura 83 – Conversão em epóxido de β -cariofileno em função do doador do grupo peróxido: (■) PHA, (●) UPH, (□) diepóxido e/ou subprodutos. [100 mg de CALB, 6 mL de solvente, 10 mmoles do ácido octanóico, 200 rpm, 30 °C].

Como pode-se observar na **Figura 83**, o produto epoxidado, utilizando o sistema UPH/CALB 100 mg, foi obtido sem que fossem detectadas as presenças do diepóxido e de subprodutos com rendimentos maiores (97 %) aos obtidos utilizando com o sistema PHA/CALB 100 mg (80 %), em tempo um pouco maior, sendo de 180 min e 40 min, respectivamente.

Outra vantagem da utilização do meio anidro é a possibilidade do uso de lipases imobilizadas em filmes hidrossolúveis, como os de caseinato de sódio (CS) e de poli(álcool vinílico) (PVA).

Com objetivo de investigar o uso destes sistemas filme/enzima nas reações de epoxidação químico-enzimática, foi realizado um estudo onde foram utilizadas as lipases CALB, LPS e LRO, imobilizadas ou não, como biocatalisadores na reação com a carvona e a UPH como doador peróxido. Os resultados das conversões obtidas em função do tempo reacional estão descritos na **Figura 84**.

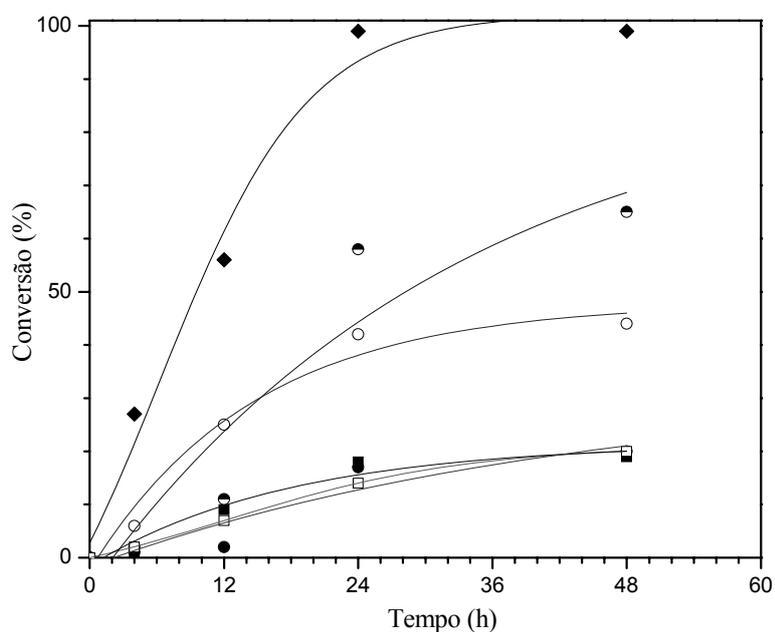


Figura 84 - Conversão em epóxido da carvona em função do tempo utilizando com biocatalisador: (◆)CALB, (●) LPS, (■)LRO, (⊖)LPS-CS, (○) LPS-PVA, (□)LRO-PVA. [6mL de solvente, 10mmoles do ácido octanóico, 200 rpm, 30 °C].

Pode-se observar através da **Figura 84** que, como nos resultados anteriores, a reação catalisada pela CALB apresentou a maior conversão em epóxido (>99 %). A seguir as maiores conversões foram obtidas nas reações catalisadas pela LPS imobilizada em filmes de CS e PVA, sendo de 60 e 40 % respectivamente. As reações que utilizaram a LPS e a LRO livres e esta última imobilizada em filme de PVA apresentaram conversões baixas, sendo de aproximadamente 15 %. Ficou evidente que a imobilização não alterou o comportamento catalítico da LRO nesta reação, mas com relação a LPS verificou-se o efeito positivo da imobilização, sendo que as conversões foram de 30-50 %, e portanto superiores as obtidas com o biocatalisador não imobilizado. Na reação de epoxidação com a LRO imobilizada em filme de CS não foi detectada a formação de produto, provavelmente devido à instabilidade deste filme com a enzima, que se tornou um aglomerado de difícil manuseio. Estes resultados demonstraram a viabilidade da utilização de filmes hidrofílicos na imobilização de biocatalisadores para sua utilização nas reações de epoxidação químio-enzimática em um meio livre de água, ampliando desta forma a possibilidade da utilização de outras enzimas nestas reações.

Neste trabalho pôde-se observar que a formação químio-enzimática de epóxidos é dependente tanto da estrutura do alceno, bem como do doador peróxido, solvente orgânico, tempo de reação, agitação do sistema e da origem do biocatalisador entre outros.

5 – CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados sobre a utilização de enzimas como biocatalisadores em reações de peridrólise de ácidos carboxílicos e da utilização deste na epoxidação do cicloexeno, mirceno, (+)-terpineno-4-ol, *cis*-verbenol, terpineol, terpinoleno, eugenol, isoeugenol, D-limoneno, β -cariofileno, (\pm)-citronelol, α -pineno, β -pineno, carvona e o (+)-3-careno em diferentes sistemas biocatalíticos, as principais conclusões serão descritas, considerando o tipo de sistema empregado. Em seguida serão apresentadas as considerações finais.

- As maiores conversões a epóxido de cicloexeno foram obtidas quando foram empregadas como catalisadores as lipases CALB, LRO e LPS.
- O estudo da reutilização da CALB, na reação de epoxidação do cicloexeno, demonstrou que esta pode ser utilizada até 10 vezes sem uma perda significativa da atividade, apresentando conversões em epóxido de aproximadamente 80 %.
- Os maiores valores de conversão em perácidos (≈ 30 %), nas reações de peridrólise catalisada pela CALB, foram obtidos com os ácidos monocarboxílicos com cadeias alquílicas variando de 6-16 carbonos (hexanóico, octanóico, láurico e palmítico).
- Os ácidos hexanóico, octanóico, láurico, palmítico, mirístico e esteárico levaram a formação quantitativa do epóxido de (+)-3-careno com taxas de conversão com valores próximos, sendo estas de $3,8-5,6 \times 10^{-2} \text{ mmol}\cdot\text{min}^{-1}$.

- De forma geral as reações com os terpenos que continham ligações duplas com pelo menos três substituições e/ou endocíclicas (β -cariofileno, D-limoneno, isoeugenol, (+)-3-careno, mirceno, (+)-terpineno-4-ol, terpineol, terpinoleno, (\pm)-citronelol, α -pineno) apresentaram conversões quantitativas (>99%) em epóxidos.
- As reações com o D-limoneno, (\pm)-citronelol, (+)-3-careno e α -pineno alcançaram valores de conversão quantitativa (>99%) em no máximo 180 min utilizando a CALB como biocatalisador e o PHA como doador peróxido. A reação com o β -cariofileno também apresentou este valor de conversão quando foi utilizada a UPH como doador peróxido.
- As reações de epoxidação químio-enzimática apresentaram regiosseletividade nas reações entre o α - e β -pineno ($c = >99$ e 20 %, respectivamente), o eugenol e isoeugenol ($c = 42$ e >99 %, respectivamente), e entre as duas ligações duplas do β -cariofileno, do D-limoneno, onde a ligação dupla endocíclica foi mais reativa. Na carvona, devido à conjugação da ligação dupla endocíclica com a carbonila, a ligação dupla externa mostrou maior reatividade.
- A reação de epoxidação químio-enzimática do (+)-3-careno foi estereosseletiva devido ao impedimento estéreo do reagente e às condições brandas do processo.
- A utilização da UPH como doador peróxido evitou a formação de subprodutos, contudo as reações com α -pineno, (+)-3-careno, (\pm)-citronelol e o D-limoneno apresentaram menores taxas de conversão ($2,0-4,5 \times 10^{-2}$ mmol.min⁻¹) em relação às reações que utilizaram o PHA ($8,3-12,3 \times 10^{-2}$ mmol.min⁻¹).

- As reações com β -pineno e *R*-(+)-carvona apresentaram maiores taxas de conversão ($0,83\text{-}2,0 \times 10^{-2} \text{ mmol}\cdot\text{min}^{-1}$) com a utilização da UPH em relação às reações que utilizaram o PHA ($\approx 2,7 \times 10^{-3} \text{ mmol}\cdot\text{min}^{-1}$ em ambos casos) como doadores peróxido.
- De forma geral as reações apresentaram maiores conversões em peróxi-ácido e epóxido quando foram utilizados o tolueno e o diclorometano como solventes externos. Na reação com o (+)-3-careno a utilização da acetonitrila também levou à conversões quantitativas. A utilização dos LI, [BMIm][BF₄] e [BMIm][PF₆] não alterou de forma significativa os valores de conversão.
- Quando a UPH foi utilizada como doador peróxido, foi possível utilizar a LPS imobilizada em filmes de caseinato de sódio e PVA. A imobilização aumentou a estabilidade da enzima e conseqüentemente as taxas de conversão ($1,5 \times 10^{-3} \text{ mmol min}^{-1}$) em relação à obtida na utilização de enzima em sua forma livre ($4,6 \times 10^{-4} \text{ mmol min}^{-1}$).

A partir dos resultados apresentados, verifica-se a grande importância da otimização das condições reacionais de sistemas biocatalíticos. As reações de epoxidação mostraram-se fortemente influenciadas pelo solvente, velocidade de agitação do sistema, concentração e tipo de doador do grupo peróxido.

De modo geral, foram obtidos resultados bastante promissores na produção de peróxi-ácidos e na utilização destes na epoxidação dos terpenos estudados, inclusive em alguns casos com elevado excesso enantiomérico na formação de epóxidos quirais de importante interesse sintético.

6 – PERSPECTIVAS

Para a continuidade destes estudos se faz necessário uma avaliação de outros parâmetros físico-químicos, tais como a cinética e a determinação da constante de Michaelis-Menten da reação de peridrólise. Estas informações são importantes para que através da melhor compreensão desta reação possam ser gerados perácidos carboxílicos com diferentes propriedades oxidativas e então aplicados em epoxidações regio- e/ou estereosseletivas.

A investigação de ácidos com cadeias laterais funcionalizadas, p. ex. aminoácidos, para obtenção de perácidos com capacidade de indução quiral na formação de produtos de epoxidação de olefinas proquirais, é outra alternativa bastante interessante para o uso desta metodologia.

Os perácidos obtidos químico-enzimaticamente podem ser empregados em reações de Baeyer-Villiger e na obtenção de oxaziridinas para aplicação *in situ* em epoxidação estereosseletivas.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- 1 SANTOS, E. N.; LAGO, R. M.; **Quim. Nova**, 30 (6), 1480-1483, 2007.
 - 2 NELSON, D. L.; COX, M. M.; **Lehninger: Principles of Biochemistry**, 4th Ed. USA, W. H. Freeman, 2004.
 - 3 POLLARD, D. J.; WOODLEY, J. M.; **Trends Biotechnol.**, 25 (2), 66-73, 2007.
 - 4 CAMPBELL, M. K.; **Bioquímica. 3^a ed.**, Ed. Artmed, Porto Alegre:, 2000.
 - 5 (a) JONES, J. B.; **Tetrahedron**, 42 (13), 3351-3403, 1986. (b) WOLFENDEN R.; SNIDER, M. J., **Acc. Chem. Res.**, 34, 938-945, 2001.
 - 6 FABER, K.; **Biotransformations in Organic Chemistry**. Springer-Verlag New York INC., New York, 1997.
 - 7 SILVERMAN, R. B. **The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions**. San Diego: Academic Press, 2000. 717p.
 - 8 VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**. Ed. Artmed, Porto Alegre, 2000.
 - 9 SOLOMONS, T. W., GRAHAM, L., WHEI, O.; **Química Orgânica /T. W. Graham Solomons**, 7.ed. Ed: LTC , Rio de Janeiro, 2002.
 - 10 ROBERTS, S. M.; TURNER, N. J.; WILLETTS, J.; TURNER, M. K. **Introduction to Biocatalysis Using Enzymes and Micro-Organisms**. New York: Cambridge University Press, 1995.
 - 11 LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. **Industrial Biotransformations**. Weinheim: Wiley-VCH, 2000.
 - 12 UNIVERSTY 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/>>. Acessado em: 09 de agosto de 2007.
 - 13 WHITESIDES, G. M.; WONG, C. H.; **Angew. Chem. Int. Ed.**, 24 (8), 617-638, 1985.
 - 14 BOLAND, W., FRÖBI, C., LORENZ, M.; **Synthesis**, 12, 1991.

-
- 15 CUI, Y., M.; WEI, D., Z.; YU, J. T.; **Biotech. Lett.**, 19 (9), 865-868, 1996.
- 16 CHEN, J.; KIMURA, Y.; ADACH, I. S.; **Biochem. Eng. J.** 22 (2), 145-149, 2005.
- 17 ROMERO, M. D., CALVO, L., ALBA, C., HABULIN, M., PRIMOZIC, M., KNEZ, Z.; **J. Supercrit. Fluids**, 33(1), 77-84, 2005.
- 18 CHEBIL, L.; HUMEAU, C.; FALCIMAIGNE, A.; ENGASSER, J. M.; GHOUL, M.; **Process Biochem.**, 41 (11), 2237-2251, 2006.
- 19 GHANEM, A.; **Tetrahedron**, 63, 1721–1754, 2007.
- 20 ALBUQUERQUE, P. M.; WITT, M. A.; UGARTE, B.; NASCIMENTO, M. G.; **Process Biochem.**, 42 (2), 141-147, 2007.
- 21 LOUGHLIN, W.; **Bioresour. Technol.** 74, 49-62, 2000.
- 22 MORISSO, F. D. P.; COSTA, V. E. U.; **Tetrahedron: Asymmetry**, 12, 2641-2647, 2001.
- 23 KLIBANOV, A. M., **Nature**, 409, 241-246, 2001.
- 24 KOBAYASHI T, A. S.; **Biotechnol. Lett.**, 26 (19), 1461-1468, 2004.
- 25 GHANEM, A.; ABOUL-ENEIN, H. Y.; **Tetrahedron: Asymmetry**, 15 (21), 3331-3351, 2004.
- 26 GHAMGUI, H.; MILED, N.; KARRA-CHAÂBOUNI, M.; GARGOURI, Y.; **Biochem. Eng. J.**, 37 (1), 34-41, 2007.
- 27 VILLENEUVE, P.; **Biotechnol. Adv.**, 25 (6), 515-536, 2007.
- 28 **SciFinder Scholar®**, versão 2006, American Chemical Society, copyright ©2005.
- 29 REJEB, I. B.; ARDUINI, F.; AMINE, A.; GARGOURI, M.; PALLESCHI, G.; **Anal. Chim. Acta**, 594(1), 1-8, 2007.
- 30 **Biotimes** – Revista Bioindustrial Trimestral da Novozymes®, disponível em: <<http://www.novozymes.com/en/MainStructure/Publications/BioTimes/>> Acessado em: 20 de janeiro de 2008.
- 31 HASAN, F.; ALI SHAH, A.; HAMEED, A.; **Enz. Mic. Technol.**; 39, 235–251, 2006.
- 32 GOTOR-FERNANDEZ, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V.; **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 40, 111–120, 2006.

-
- 33 Protein Data Bank. Disponível em: www.rcsb/pdb/. Acessad a em: 20 de janeiro de 2008.
- 34 CYGLER, M.; GROCHULSKI, P.; KAZLAUSKAS, R. J.; SCHRAG, J.D.; BOUTHILLIER, F.; RUBIN, B.; SERREQLI, A. N.; GUPTA, A. K.; **J. Am. Chem. Soc.**, 116, 3180-3186, 1994.
- 35 CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M.; **Engenharia Enzimática**, Ed. Lidel – Edições Técnicas, Lda.; Lisboa, 2003.
- 36 MANTAROSIE, L.; COMAN, S.; PARVULESCU, V. I.; **J. Mol. Catal. A: Chem.**, 79 (2), 223-229, 2008.
- 37 YU, D.; WANG, L.; GU, Q.; CHEN, P.; LI, Y.; WANG, Z.; CAO, S.; **Process Biochem.**, 42, 1319–1325, 2007.
- 38 ORELLANA-COCA, C.; BILLAKANTI, J. M.; MATTIASSON, B.; HATTI-KAUL, R.; **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 44, 133–137, 2007.
- 39 OTHMAN, S. S.; BASRI, M.; HUSSEIN, M. Z.; RAHMAN, M. B. A.; RAHMAN, R. N. Z. A.; SALLEH, A. B.; JASMANI, H.; **Food Chem.**, 106, 437–443, 2008.
- 40 LILJEBLAD, A; KAVENIUSA, H. M.; TÄHTINENA, P.; KANERVA, L. T.; **Tetrahedron: Asymmetry**, 18, 181–191, 2007.
- 41 HAA, S. H.; LANB, M. N.; LEE, S. H.; HWANG, S. M.; KOO, Y. M.; **Enzyme Microb. Technol.**, 41(4), 480–483, 2007.
- 42 SALMINEN, J.; PAPAICONOMOU, N.; KUMAR, R. A.; LEE, J. M.; KERR, J.; NEWMAN, J.; PRAUSNITZ, J. M.; **Fluid Phase Equilib.**, 261 (1-2), 421-426, 2007.
- 43 ZHAO, H.; LU, Z.; BIE, X.; LU, F.; LIU, Z.; **J. Food Eng.**, 78, 41–46, 2007.
- 44 SCHØNHEYDER, F.; VOLQVARTZ, K.; **Biochim. Biophys. Acta**, 15 (2), 288-290, 1954.
- 45 HOFMANN, A. F.; BORGSTRÖM, B.; **Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.**, 70, 317-331, 1963.
- 46 PALTAUF, F.; WAGNER, E.; **Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.**, 431 (2), 359-362, 1976.
- 47 ZOTTOR, B.A.K.; WALKER, B.L.; **Nutr. Res. (N. Y., NY, U. S.)**, 9 (6), 679-683, 1989.
- 48 BASHEER, S.; SNAPE, J. B.; MOGI, K.; NAKAJIMA, M., **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 72 (2), 231-237, 1995.

-
- 49 VILLENEUVE, P.; **Biotechnol. Adv.**, 25, 515–536, 2007.
- 50 GOTOR, V.; BRIEVA, R.; REBOLLEDO, F.; **Tetrahedron Lett.**, 29(52), 697369-74, 1988.
- 51 LIU, K. J.; LIU, K. M.; CHANG, H. M.; **Food Chem.**, 102, 1020–1026, 2007.
- 52 MACHADO, A.; LIRIA, C. W.; PROTI, P. B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M. T. M.; **Quim. Nova**, 27 (5), 781-789, 2004.
- 53 GODTFREDSSEN, S. E.; KIRK, O.; BJÖRKLING, F.; **J. Chem. Soc. Chem. Commun.** 19, 1301-1303, 1990.
- 54 SKOURIDOU, V.; STAMATIS, H.; KOLISIS, F. N.; **Biocatal. Biotransform.** 21 (6), 285-290, 2003.
- 55 TORNVALL, U.; ORELLANA-COCA, C.; HATTI-KAUL, R.; ADLERCREUTZ, D.; **Enzyme Microb. Technol.**, 40(3), 447-451, 2007.
- 56 SEBRÃO, D.; SILVA V. D.; NASCIMENTO, M. G.; MOREIRA, M. A.; **Quim. Nova**, 30 (5), 1182-1187, 2007.
- 57 ISI WEB OF KNOWLEDGESM. **Web of Science**® (desenvolvida por The Thomson Corporation), disponível em: <<http://portal.isiknowledge.com> > acessado em: 03 de fevereiro de 2008.
- 58 MOREIRA, M. A., BITENCOURT, T. B., NASCIMENTO, M. G.; **Synth. Commun.**, 35 (15), 2107-2114, 2005
- 59 CAO, L.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R.A.; **Org. Lett.**, 2 (10), 1361–1364, 2000.
- 60 CABANA, H.; JONES, J. P.; AGATHOS, S. N.; **J. Biotechnol.**, 132, 23–31, 2007.
- 61 KENNEDY, J. F.; BARKER, S. A.; ROSEVEAR, A.; **J. Chem. Soc., Perkin Trans.**, 1, 2293 - 2299, 1973.
- 62 CATONI, E.; CERNIA, E.; PALOCCI, C.; **J. Mol. Catal. A: Chem.**, 105 (1-2), 79-86, 1996.
- 63 MERÇON, F.; ERBES, V. L.; SANT'ANNA JR., G. L.; NOBREGA, R.; **Braz. J. Chem. Eng.**, 14 (1), doi: 10.1590/S0104-66321997000100005, 1997.
- 64 KAMORI, M.; HORI, T.; YAMASHITA, Y.; HIROSE Y.; NAOSHIMA, Y.; **J. Mol. Cat. B: Enzym.**, 9, 269-274, 2000.

-
- 65 VECCHIA, R. D.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V.; **Quím. Nova**, 27, 4, 623-630, 2004.
- 66 VECCHIA, R. D.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V.; SEBRÃO, D.; **Process Biochem.**, 40, 2677-2682, 2005.
- 67 MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; **Enzyme Microb. Technol.**, 40, 1451–1463, 2007
- 68 CREMONESI, P.; CERREA, G.; SPORTOLETTI, G.; **Arch. Biochem. Biophys.**, 159,7-10, 1973.
- 69 BUCKLAND, B. C.; DUNNIL, P.; LILLY, M. D.; **Biotech. Bioeng.**, 17(6), 815-826, 1975.
- 70 KOBAYASHI, T.; NAGAO, T.; WATANABE, Y.; SHIMADA Y.; **Enzyme Microb. Technol.**, 40, 1300–1304, 2007.
- 71 VAN RANTWIJK, F.; LAU, M. R.; SHELDON, R. A.; **Trends Biotechnol.**, 21 (3), 131-138, 2003.
- 72 VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A.; **Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)**, 107, 2757-2785, 2007
- 73 DUPONT, J.; SOUZA, R. F.; SUAREZ, P. A. Z.; **Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)**, 102, 3667-3692, 2002.
- 74 ECKSTEIN, M.; VILLELA, M.; LIESE, A.; KRAGL, U.; **Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)**, 9, 1084-1085, 2004.
- 75 PILISSÃO, C.; NASCIMENTO, M. G.; **Tetrahedron: Asymmetry**, 17, 428–433, 2006.
- 76 CHIAPPE, C.; LEANDRI, E.; LUCCHESI, S.; PIERACCINI, D.; HAMMOCK, B. D.; MORISSEAU, C. ; **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 27, 243–248, 2004.
- 77 KATSOURA, M.H.; POLYDERA, A.C.; KATAPODIS, P.; KOLISIS, F.N.; STAMATIS, H.; **Process Biochem.**, 42 (9), 1326–1334, 2007.
- 78 YANG, Z.; PAN, W.; **Enzyme Microb. Technol.**, 37, 19–28, 2005.
- 79 BAUER, K.; GARBE, D.; **Common Fragrance and Flavor Material: Preparation, Properties and Uses**. Florida, VCH Publishers, pg: 02, 03, 36, 1985.
- 80 KAUL, P. N., RAO, B. R. R., SINGH, K., BHATTACHARYA, A. K., MALLAVARAPU, G. R., RAMESH, S.; **J. Essent. Oil Res.**, 17 (1), 7-9, 2005 .

-
- 81 LORENZO, D., PAZ, D., DAVIES, P., VILLAMIL, J., VILA, R., CANIGUERAL, S., DELLACASSA, E., **Phytochem. Anal.**, 16 (1), 39-44, 2005
- 82 RAO, B. R. R.; BHATTACHARYA, A. K.; MALLAVARAPU, G. R.; RAMESH, S.; **Flavour Fragrance J.**, 19 (4), 344-350, 2004.
- 83 AQIL, M.; AHAD, A.; SULTANA, Y.; ALI, A.; **Drug Discovery Today**, 12 (23/24), 1061-1067, 2007.
- 84 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.
- 85 DEUBEL, D. V.; FRENKING, G.; GISDAKIS, P.; HERRMANN, W. A.; RÖSCH, N.; SUNDERMEYER, J.; **Acc. Chem. Res.**, 37, 645-652, 2004.
- 86 SCHIRMANN, J.P.; DELAVARENNE, S.Y., **Hydrogen Peroxide in Organic Chemistry**, (S.E.T.E. Lyon), 1979.
- 87 VEGA-PEREZ, J. M.; VEJA, M.; BLANCO, E.; IGLESIAS-GUERRA, F.; **Tetrahedron – Asymmetry**, 18(15), 1850-1867, 2007.
- 88 BURKE, C. P.; SHI, Y.; **J. Org. Chem.**, 72 (11), 4093-4097, 2007.
- 89 KLAAS, M. R.; WARWEL, S., **J. Mol. Cat. A: Chem.**, 117, 311-319, 1997.
- 90 GODTFREDSSEN, S. E.; FRYKMAN, H.; BJÖRKLING, F.; **Tetrahedron**, 48 (22), 4587-4592, 1992.
- 91 WATANABE, Y.; LASCHAT, S.; BUDDE, M.; AFFOLTER, O.; SHIMADA, Y.; URLACHER, V. B.; **Tetrahedron**, 63 (38), 9413-9422, 2007.
- 92 STEFANO SERRA, S.; FUGANTI, C.; **Tetrahedron: Asymmetry**, 17, 1573–1580, 2006.
- 93 WOITISKI, C. B.; KOZLOV, Y. N.; MANDELLI, D.; NIZOVA, G. V.; SCHUCHARDT, U.; SHUL'PIN, G. B.; **J. Mol. Cat. A: Chem.**, 222 (1-2), 103-119, 2004.
- 94 ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; JONGH, D. C.; JOHNSON, C. R.; LEBEL, N. A.; **Química Orgânica**, 2^a.ed. Ed: LTC, Rio de Janeiro, 1976.
- 95 HAINES, A. H.; **Methods for the Oxidation of Organic Compounds: Alkanes, Alkenes, Alkynes, and Arenes**. Ed.: Academic Press, Londres, 1985.

-
- 96 SAKAKIBARA, T.; NARUMI, S.; MATSUO, I.; OKADA, S.; NAKAMURA, T.; **Carbohydr. Res.**, 342 (16), 2339–2353, 2007.
- 97 JULIÁ, S.; MASANA, J.; VEGA, J. C.; **Angew. Chem.**, 19, 929-931, 1980.
- 98 (a) JULIÁ, S.; GUIXER, J.; MASANA, J.; ROCAS, J.; COLONNA, S.; ANNUZIATA, R.; MOLINARI, H.; **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1**, 1317-1324, 1982. (b) COLONNA, S.; MOLINARI, H.; BANFI, S.; JULIA', S.; MASANA, J.; ALVAREZ, A.; **Tetrahedron**, 39, 1635-1641, 1983.
- 99 PORTER, M. J.; SKIDMORE, J.; **Chem. Commun.**, 14, 1215–1225, 2000.
- 100 ADGER, B. M.; BARKLEY, J. V.; BERGERON, S.; CAPPI, M. W.; FLOWERDEW, B. E.; JACKSON, M. P.; MCCAGUE, R.; NUGENT, T. C.; ROBERTS, S. M.; **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1**, 3501, 1997.
- 101 XIA, Q. H.; GE, H. Q.; YE, C. P.; LIU, Z. M.; SU, K. X.; **Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)**, 105, 1603-1662, 2005.
- 102 KATSUKI, T.; SHARPLESS, K. B.; **J. Am. Chem. Soc.**, 102 (18), 5976-5978, 1980.
- 103 MAKITA, N.; HOSHINO, Y.; YAMAMOTO, H.; **Angew. Chem.**, 42 (8), 941-943, 2003.
- 104 LANE, B. S.; BURGESS, K.; **Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)**, 103, 2457-2473, 2003.
- 105 COSTA, A. A.; GHESTI, G. F.; MACEDO, J. L.; BRAGA, V. S.; SANTOS, M. M.; DIAS, J. A.; DIAS, S. C. L.; **J. Mol. Cat. A: Chem.** 282, 149–157, 2008.
- 106 ZHAO, S.; ZHAO, J.; ZHAO, D.; **Carbohydr. Res.**, 342, 254–258, 2007
- 107 BJÖRKLING, F.; GODTFREDSSEN, S. E.; KIRK, O.; **Trends Biotechnol.**, 9, 360-363, 1991.
- 108 URLACHER, V. B.; SCHMID, R. D.; **Curr. Opin. Chem. Biol.**, 10, 156–161, 2006.
- 109 PINHEIRO, L.; MARSALIO, A. J.; **J. Mol. Cat. B: Enzym.**, 44, 78–86, 2007
- 110 MCCLAY, K.; FOX, B. G.; STEFFAN, R. J.; **App. Environ. Microbiol.**, 66 (5), 1877–1882, 2000.
- 111 KLAAS, M. R.; WARWEL, S.; **J. Mol. Cat. B: Enzym.**, 1, 29-35, 1995.
- 112 SARMA, K.; BHATI, N.; BORTHAKUR, N.; GOSWAMI, A.; **Tetrahedron**, 63, 8735–8741, 2007

-
- 113 ENNIS, M. D.; OLD, D. W.; **Tetrahedron Lett.**, 33 (42), 6283-6286, 1992.
- 114 CHEN, C. C., TSAI, S.W., **Enzyme Microb. Technol.**, 36 (1), 127-132, 2005.
- 115 BHATIA, S., LONG, W. S., KAMARUDDIN, A. H.; **Chem. Eng. Sci.**, 59 (22-23), 5061-5068, 2004.
- 116 BEVINAKATTI, H. S.; BANERJI, A. A.; A.; **J. Org. Chem.**, 57 (22), 6003-6005, 1992.
- 117 OTTOLINA, G.; CARREA, G.; RIVA, S.; **J. Org. Chem.**, 55 (8), 2366-2369, 1990.
- 118 SULLY, B. D.; WILLIAMS, P. L.; **Analyst**, 87, 653 – 657, 1962, .
- 119 NEGISHI, E.; LUO, F.; **J. Org. Chem.**, 48, 1562-1564, 1983.
- 120 PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R. D.; **Chem. and Phys. of Lipids**, 93, 67-80, 1998.
- 121 LAU, R.M.; VAN RANTWIJK, F.; SEDDON, K.R.; SHELDON, R.A.; **Org. Lett.**, 26 (2), 4189-4191, 2000.
- 122 BITENCOURT, T. B.; **Formação de Epóxidos e Oxaziridinas via Químio-Enzimática**, Dissertação (Mestrado em Química) - Curso de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
- 123 CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P.; **Organic Chemistry**, Oxford University Press, 1^a Ed., 2001.
- 124 LI, Y. H.; SUN, Z. H.; ZHENG, P.; **Cromatographia**, 60, 709–713, 2004.
- 125 VILLA DE P., A. L.; TABORDA A., F.; CORREA, C. M.; **J. Mol. Cat. A.: Chem.**, 185, 269-277, 2002.
- 126 PINKERNELL, U.; KARST. U.; CAMMANN, K.; **Anal. Chem.** 66, 2599-2602, 1994.
- 127 MOREIRA, M. A., NASCIMENTO, M. G.; **Catal. Commun.**, 8, 2043-2047, 2007.
- 128 OLIVEIRA, C.; ROSA, M.F.; AIRES–BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S.; **Enzyme Microb. Technol.** 26 (5-6), 446-450, 2000.
- 129 LOZANO, P.; PÉREZ-MARÍN, A.B.; DE DIEGO, T.; GÓMEZ, D.; PAOLUCCI-JEANJEAN, D.; BELLEVILLE, M.P.; RIOS, G.M.; IBORRA, J.L.; **J. Membr. Sci.**, 201 (1-2), 55-64, 2002.
- 130 ARROYO, M.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; SINISTERRA, J.V.; **Enzyme Microb. Technol.**, 24 (1-2), 3-12, 1999.

131 ZAKS, A.; KLIBANOV, A.M.; **J. Biol. Chem.**, 263 (17), 8017-8021, 1988.

132 D.H. ZHANG, S. BAY, Y. SUN, **Food Chem.**, 102 (4), 1012-1019, 2007.

132 HILKER, I.; BOTHE, D.; PRUK J.; WARNECKE, H. -J.; **Chem. Eng. Sci.**, 56, 427-432, 2001.

ANEXOS

