

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

Jaqueline Maria Ramos da Silva

**EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DO CITRONELOL E  $\beta$ -  
CARIOFILENO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Química Orgânica.  
Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria da Graça Nascimento.

Florianópolis  
2012

Catologação na fonte elaborada pela biblioteca da  
Universidade Federal de Santa Catarina

A ficha catalográfica é confeccionada pela Biblioteca Central.

Tamanho: 7cm x 12 cm

Fonte: Times New Roman 9,5

Maiores informações em:

<http://www.bu.ufsc.br/design/Catalogacao.html>

Jaqueline Maria Ramos da Silva

**EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DO CITRONELOL E  $\beta$ -  
CARIOFILENO**

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

Florianópolis, 17 de fevereiro de 2012.

---

Prof. Dr. Almir Spinelli  
Coordenador do Programa

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Antônio Carlos Joussef  
(UFSC)

---

Prof. Dr. Ricardo José Nunes  
(UFSC)

---

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro  
Machado(UFSC)

*“Você pode continuar excedendo às expectativas, mas para os olhos de alguns, você estará sempre abaixo do esperado. Quem conhece os outros é inteligente. Quem conhece a si mesmo é iluminado. Quem vence os outros é forte. Quem vence a si mesmo é invencível.”*

*Autor desconhecido.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais José e Dalnei e as minhas irmãs Aline e Karine pela compreensão, carinho, amor e dedicação.

Ao Thiago, meu namorado, pelo amor, carinho e apoio.

À professora Maria da Graça Nascimento por sua orientação, amizade, dedicação, puxões de orelha e conversas aleatórias.

À UFSC e ao Departamento de Química da UFSC pelo suporte institucional, e em especial à Graça e ao Jadir da Secretaria de Pós-Graduação por serem sempre prestativos e atenciosos.

Ao CNPq, CAPES e INCT-Catálise pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

À Central de Análises do Departamento de Química da UFSC pelos serviços prestados. Em especial ao Gilson Rodrigo de Miranda pela disponibilidade.

A Novozymes Latin American e Amano Pharmaceutical CO pela doação das diversas lipases.

À professora Sandra Patricia Zanotto do Laboratório de Bioorgânica da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) pela doação dos micélios e à Patricia O. Carvalho (USF-Bragança Paulista-SP) pela doação dos microorganismos de solo da região Brandão Bueno (MG).

Ao professor Miguel Soriano Balparda Caro pela ajuda e discussões sobre os espectros.

Aos colegas de laboratório César, Damiani, Fabiola, Giovanni, Julietty, Mayara e Vanessa pelos chás, bolos, pães, risadas, ensinamentos, em especial ao César e a Vanessa pelo companherismo e presença nos momentos certos.

À equipe da Escola de Dança Cenarium pelos momentos felizes, por todo o aprendizado, não apenas pelos passos de dança, mas por todo o subjetivo que a dança nos proporciona.

Aos meus amigos Fran, Pati, Miss, Didi, Mateus, Aline, Claudio, Bárbara, Anna, e Karin pela amizade, momentos felizes e ensinamentos.

Enfim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se concretizasse.

## RESUMO

Neste trabalho, é relatada a epoxidação químio-enzimática dos terpenos citronelol e  $\beta$ -cariofileno. Algumas condições experimentais foram avaliadas, tais como o uso de diferentes lipases e de micélios, agentes oxidantes ( $H_2O_2$  ou UPH), tempo de reação, tipo de doador acila, temperatura (15-45°C) e a influência do meio orgânico, incluindo líquidos iônicos (LIs). Na epoxidação do citronelol obteve-se óxido de citronelol **43** e/ou o éster epóxido citronelol **47**. Dependendo das condições reacionais, o produto **43** foi obtido com conversões >99%. A CAL-B foi o catalisador mais eficiente. As maiores conversões em epóxido **43** foram obtidas a 20 e 25°C, sendo de 80% e 77%, usando UPH como agente oxidante e ácido octanóico como doador de acila. O meio orgânico foi um dos parâmetros mais importantes nesta reação. Usando clorofórmio ou diclorometano, o produto **43** foi obtido com conversão >99% após 24h. Com o uso de misturas de solventes orgânicos e LIs, os resultados foram dependentes tanto do solvente quanto do contra íon utilizado no LI. Estes parâmetros foram também avaliados quando o  $\beta$ -cariofileno foi utilizado como substrado. Este composto formou dois produtos, o mono-epóxido **44** e o di-epóxido **45**. Foi avaliado o uso lipases de diversas procedências, e a CAL-B novamente foi o catalisador mais eficiente (conv. >99%). Ao utilizar as lipases comerciais (PS-C Amano I, F-AP15, PS-C Amano SD, PS Amano, AY Amano 30, PS Amano IM, M Amano 10, AK Amano 20, PS-C Amano II, A Amano 12, Lipozyme RM IM, Lipozyme IM), as conversões ao produto **44** foram de 16-27%, com as lipases nativas LAN e LRO as conversões foram de 20-23% e com os micélios UEA\_06 e UEA\_53 foram 16 e 21% em 24 h. O melhor agente oxidante foi  $H_2O_2$ , pois em relação a UPH foram necessários tempos e quantidades menores para a obtenção de **44** ou **45** como produtos únicos e com boas conversões (60 - >99%). Com 2,0 mmol de  $H_2O_2$  a CAL-B pode ser reutilizada até 5 vezes com perdas mínimas na conversão ao produto **44** (93-90%). Os solventes orgânicos foram também seletivos. Ao usar *n*-hexano, observou-se a formação preferencial de **44** com conv. >99% em 8 e 24 h. Quando acetato de etila e tolueno foram utilizados, as conversões foram >99% em **45**, em 8 e 24h. Vale salientar que o método químio-enzimático utiliza de condições brandas e além disso apresenta seletividade, pois dependendo as condições reacionais apenas um produto foi obtido em alta conversão.

**Palavras-chave:** Epoxidação. Enzimas. Terpenos.

## ABSTRACT

In this work, the chemoenzymatic epoxidation of terpenes citronellol and  $\beta$ -caryophyllene is reported. Some experimental conditions, such as the use of different lipases and mycelia, oxidizing agents ( $H_2O_2$  or UHP), reaction time, acyl donor type, temperature (15-45°C) and the influence of the organic medium, including the use of ionic liquids (ILs) were evaluated. In the epoxidation of citronellol two products were obtained; namely citronellol oxide **43** and/or citronellol epoxide ester **47**. Depending on the reaction conditions, the product **43** was obtained in conv. >99%. CAL-B was the most efficient catalyst. The highest conversions were achieved for the epoxide **43** at 20 and 25 °C, with conv. of 80% and 77%. The organic medium was one of the most important parameters in this reaction. Using chloroform or dichloromethane, product **43** was obtained in conversions >99% after 24 h. Using mixtures of organic solvents and ILs, the results were dependent on both the organic solvent and the counter ion type in IL. These parameters were also evaluated when  $\beta$ -caryophyllene was used as the substrate. Using this substrate two products, the mono-epoxide **44** and the di-epoxide **45**, were formed. The use of several lipases from different sources was also evaluated, and CAL-B was the most efficient catalyst (conv. >99% in **44**). By the use of commercial lipases (Amano PS-C I, F-AP15, Amano PS-C SD, Amano PS, Amano AY 30, Amano PS IM, M Amano 10, 20 Amano AK, Amano PS-C II, A Amano 12, Lipozyme RM IM, Lipozyme IM), the conversions in product **44** were of 16-27%; by using the native lipases LAN and LRO the conversions were 20-23% and using the mycelia UEA\_06 and UEA\_53, the conversions were 16 and 21%, in 24 h. The best oxidizing agent was  $H_2O_2$  as compared to UHP, considering that the reaction occurred in a shorter time and only a small amount of the reagent was necessary to obtain **44** or **45** as unique products in high conv. (60 ->99%). Using 2.0 mmol of  $H_2O_2$ , CAL-B could be reused up to 5 times with minimal loss in the conversion degrees to **44** (93-90%). The organic solvents were also selective. By using *n*-hexane, the preferential formation of **44** was observed with conv. >99% after 8 and 24 h reaction. When ethyl acetate and toluene were used, the conversions were of >99% on **45** after 8 and 24h. It is worth of mentioning that the chemoenzymatic methodology used mild conditions and presented selectivity, as depending on the reaction conditions only one product could be obtained in good conversion degrees.

**Keywords:** Epoxidation. Enzymes. Terpenes.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figure 1 - Representação esquemática das estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias de uma proteína (adaptada da referência 2). <sup>2</sup> .....                    | 16 |
| Figura 2 - Representação esquemática do mecanismo de ação enzimática. <sup>10</sup> .....   | 17 |
| Figura 3 - Acilação da <i>D</i> -ribono-1,4-lactona <i>via</i> química <sup>17</sup> e quimio-enzimática. <sup>18</sup> .....   | 19 |
| Figura 4 - Aminoação <i>via</i> catálise assimétrica da cetona 5 à sitagliptina (6) obtida industrialmente pela Merck. <sup>19</sup> .....  | 20 |
| Figura 5 - Resolução enantiosseletiva do ( <i>R,S</i> ) octan-2-ol com acetato de vinila. <sup>20</sup> .....   | 21 |
| Figura 6 - Resolução de ( <i>R,S</i> )-feniletilamina mediada por lipases nativas. <sup>21</sup> .....  | 21 |
| Figura 7 - Hidrólise de um triacilglicerol catalisada por lipases. <sup>13</sup> .....  | 21 |
| Figura 8- Mecanismo proposto para a hidrólise enzimática de um éster. <sup>27-29</sup> .....  | 23 |
| Figura 9 - Esterificação do ácido 4-metoxi-cinâmico com glicerol catalisada pela CAL-B. <sup>31</sup> .....   | 24 |
| Figura 10 - Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de <i>C. antarctica</i> obtida no <i>Protein Data Bank</i> (PDB) e a tríade catalítica. <sup>34</sup> ..... | 25 |
| Figura 11 - Lipase de <i>C. antarctica</i> (Novozym 435) imobilizada em resina de polimetilcrilato. <sup>36</sup> .....   | 25 |
| Figura 12 - <i>O/N</i> -acilação do ácido mirístico utilizando CAL-B. <sup>38</sup> .....   | 26 |
| Figura 13 - Síntese de epóxidos e pirazóis a partir de chalconas usados nos testes de citotoxicidade. <sup>44</sup> .....   | 27 |
| Figura 14 - Ataque nucleofílico ao oxigênio do perácido. ....   | 29 |
| Figura 15 - Formação do ácido peróxi-trifluoracético. ....  | 29 |
| Figura 16 - Reação do ciclo-hexeno com ácido <i>meta</i> -cloroperoxibenzóico 26 para formação do epóxi-ciclo-hexeno. ....  | 29 |
| Figura 17 - Epoxidação do eteno <i>via</i> haloidrina para a formação do óxido de etileno. <sup>42</sup> .....  | 30 |
| Figura 18 - Ataque do nucleófilo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ao complexo acil enzima, (adaptado da referência 10). ....  | 30 |
| Figura 19 - Epoxidação quimio-enzimática (+)-3-careno. <sup>50</sup> .....  | 31 |
| Figura 20- Epoxidação quimio-enzimática do ácido oléico. <sup>57</sup> .....  | 31 |
| Figura 21 - Epoxidação quimio-enzimática do $\alpha$ -pineno. <sup>58</sup> .....   | 32 |
| Figura 22 - Cátions e ânions comumente usados nos LIs. <sup>61</sup> .....  | 32 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 23 - Oxidação de álcoois primários em LI.TEMPO = 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidina. <sup>64</sup> .....  | 33 |
| Figura 24 – $\alpha$ - Amiloxidação de aldeídos em LIs. <sup>65</sup> .....   | 34 |
| Figura 25 - Oxidação químio-enzimática de Baeyer-Villiger da ciclohexanona 32 em LIs. <sup>60</sup> .....   | 35 |
| Figura 26 - Oxidação catalítica do (R)-(+)-limoneno (33) e geraniol (34). <sup>67</sup> .....   | 35 |
| Figura 27 - Exemplos de terpenos e terpenóides pertencentes a diferentes classes de compostos orgânicos. <sup>68</sup> .....  | 36 |
| Figura 28 - Retrossíntese do análogo ao constituinte da planta jamaicana ( <i>Croton linearis</i> ). <sup>73</sup> .....  | 37 |
| Figura 29 - Síntese de um biopolímero utilizando epóxi-citronelol como monômero. <sup>74</sup> .....  | 38 |
| Figura 30 - Preparação do éster epóxido citronelol (octanoato de 3,7-dimetil-6,7-epóxi-octila) (47). .....  | 44 |
| Figura 31 - Epoxidação químio-enzimática do citronelol. ....  | 45 |
| Figura 32- Epoxidação químio-enzimática do $\beta$ -cariofileno. ....   | 46 |
| Figura 33 - Espectros de RMN de <sup>1</sup> H mostrando a influência do tempo na epoxidação químio-enzimática do citronelol. Condições de reação: citronelol (2,0 mmol), ácido octanóico (2,0 mmol), UPH (5,0 mmol), CAL-B (20 mg), acetonitrila (10 mL), t.a., a 150 rpm. R <sub>1</sub> = C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O, R <sub>2</sub> =C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> , R <sub>3</sub> =CH <sub>3</sub> , R <sub>4</sub> =C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> O. .... | 51 |
| Figura 34 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H de uma alíquota da reação de epoxidação químio-enzimática do citronelol. Condições de reação: citronelol (2,0 mmol), ácido octanóico (2,0 mmol), UPH (5,0 mmol), CAL-B (200 U), acetonitrila (10 mL), temp. ~25 °C, a 150 rpm em 24h. Conv: 70% em 43 e 30% 47. ....   | 52 |
| Figura 35- Influência da quantidade de UPH na epoxidação químio-enzimática de citronelol para a formação do epóxido (■) e éster-epóxido (●). Condições de reação, como na Figura 33, exceto para UPH (0,1-10,0 mmol), 24 h. ....  | 53 |
| Figura 36- Influência da cadeia alquílica do doador de acila na epoxidação químio-enzimática do citronelol para a formação de 43 e éster epóxido correspondente . Condições de reação: como descrito na Figura 33, mas variando o doador acila (2,0 mmol de cada) em 24h. ...   | 54 |
| Figura 37 - Influência da quantidade de ácido octanoico na epoxidação químio-enzimática do citronelol, epóxido (■) e éster-epóxido (●). Condições de reação, como descrito na Figura 33, variando a quantidade de ácido octanóico (0,1-2,0 mmol), em 24 h. ....   | 55 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 38 - Influência da temperatura na formação dos produtos 43 e 47 . Condições de reação, como na Figura 33, mas variando a temperatura, 24 h.....  | 57 |
| Figura 39- Cromatograma do reagente e produtos isolados da epoxidação quimio-enzimática do $\beta$ -cariofileno ( $t_R$ 37 = 6,5, $t_R$ 44 = 8,5, $t_R$ 45 = 11,0 min). (Condições de análise: descritas no item 3.2, p. 28).   | 62 |
| Figura 40- Influência do tempo na epoxidação quimio-enzimática do $\beta$ -cariofileno. Condições de reação: $\beta$ -cariofileno (2,5 mmol), UPH (5,0 mmol), ác. octanóico (1,0 mmol), CAL-B (50 mg), diclorometano (10 mL), t.a., mono-epóxido (■) e di-epóxido (■). .....                            | 65 |
| Figura 41 – Influência do tempo na epoxidação quimio-enzimática do $\beta$ -cariofileno. Condições de reação: $\beta$ -cariofileno (2,5 mmol), H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (5,0 mmol), ác. octanóico (1,0 mmol), CAL-B (50 mg), diclorometano (10 mL), t.a., mono-epóxido (■) e di-epóxido (■). ..... | 66 |
| Figura 42 - Influência da quantidade de UPH na epoxidação quimio-enzimática de $\beta$ -cariofileno para a formação do mono-(■) e di-epóxido (■). Condições de reação: como na Figura 40 exceto para UPH (1,0-15,0 mmol), 24 h. ....  | 67 |
| Figura 43 - Influência da quantidade de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na epoxidação quimio-enzimática do $\beta$ -cariofileno para a formação do mono-(■) e di-epóxido(■). Condições de reação: como na Figura 41 exceto para H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1,0-15,0 mmol), 24 h. ....                 | 67 |
| Figura 44 - Influência da cadeia alquílica do doador acila na epoxidação quimio-enzimática do $\beta$ -cariofileno na formação do mono-epóxido (■) e di-epóxido (■). Condições de reação: como na Figura 41, mas variando o doador de acila (1,0 mmol de cada) em 2 h. ....                             | 70 |
| Figura 45 -Influência da temperatura na epoxidação quimio-enzimática do $\beta$ -cariofileno. mono-epóxido (■) e di-epóxido (■). Condições de reação: como na Figura 41, mas variando a temperatura (15-45°C) em 2 h. ....  | 71 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 – Classificação das enzimas segundo a UIBBM. <sup>9</sup> .....  | 18 |
| Tabela 2 - Exemplos de epóxidos quirais utilizados como intermediários na obtenção de fármacos. <sup>45</sup> .....                                   | 27 |
| Tabela 3 - Avaliação do uso de diferentes lipases na epoxidação quimio-enzimática do citronelol <sup>a</sup> . .....                                  | 49 |
| Tabela 4 - Efeito do solvente orgânico na epoxidação quimio-enzimática do citronelol <sup>a</sup> .....   | 59 |
| Tabela 5 - Influência dos LIs na epoxidação quimio-enzimática do citronelol <sup>a</sup> .....  | 61 |
| Tabela 6 – Avaliação de diferentes lipases na epoxidação quimio-enzimática do $\beta$ -cariofileno <sup>a</sup> .....                                 | 63 |
| Tabela 7 - Conversão (%) do $\beta$ -cariofileno em mono-epóxido 44. <sup>a</sup> .....   | 64 |
| Tabela 8 - Porcentagens de conversão aos produtos 44 e 45 na reutilização da CAL-B com diferentes quantidades e agentes oxidantes. <sup>a</sup> ..... | 68 |
| Tabela 9- Efeito do solvente orgânico na epoxidação quimio-enzimática do $\beta$ -cariofileno <sup>a</sup> .....                                      | 72 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AK – lipase de *Pseudomonas fluorescens*  
Asp – ácido aspártico  
AY – lipase de *Candida rugosa*  
CAL-B – lipase de *Candida antarctica* B  
CCD – cromatografia de camada delgada  
CDCl<sub>3</sub> – clorofórmio deuterado  
CG – cromatografia gasosa  
DMF – N,N'-dimetilformamida  
DMSO – dimetilsulfóxido  
ee – excesso enantiomérico  
FAP 15 – lipase de *Rhizopus oryzae*  
Glu – ácido glutâmico  
His – histidina  
Ka – constante de acidez  
KDa – quilodaltons  
LAN – lipase de *Aspergillus niger*  
log *P* – logaritmo do coeficiente de partição  
LRO – lipase de *Rhizopus oryzae*  
*m*-CPBA – ácido *meta*-cloroperbenzóico  
MTBE – éter *t*-butil-metílico  
PS-C – lipase de *Burkholderia cepacia*  
RMN – ressonância magnética nuclear  
RNA – ácido ribonucléico  
rpm – rotações por minuto  
Ser – serina  
*t*<sub>R</sub> – tempo de retenção  
THF – tetrahidrofurano  
TMS – tetrametilsilano  
UEA – micélios de fungos da região amazônica  
UIBBM – União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular  
UPH – Uréia Peróxido Hidrogênio

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>SUMÁRIO.....</b>   | <b>27</b> |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>15</b> |
| 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....   | 15        |
| 1.2 ENZIMAS.....  | 15        |
| 1.3 LIPASES.....  | 21        |
| 1.4 EPÓXIDOS.....   | 26        |
| 1.5 LÍQUIDOS IÔNICOS.....   | 32        |
| 1.6 TERPENOS.....   | 35        |
| 1.7 OBJETIVOS.....  | 38        |
| <b>1.7.1 Objetivo Geral.....</b>  | <b>38</b> |
| <b>1.7.2 Objetivos Específicos.....</b>   | <b>38</b> |
| <b>2 PARTE EXPERIMENTAL.....</b>  | <b>40</b> |
| 2.1 MATERIAIS.....  | 40        |
| 2.2 EQUIPAMENTOS.....   | 41        |
| 2.3 PREPARAÇÃO DOS PADRÕES.....   | 42        |
| <b>2.3.1 Preparação dos epóxidos do citronelol e do <math>\beta</math>-cariofileno <i>via</i><br/>não enzimática.....</b> | <b>42</b> |
| <b>2.3.2. Preparação do éster epóxido do citronelol (47).....</b>   | <b>43</b> |
| 2.4 EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DOS TERPENOS.....  | 45        |
| <b>2.4.1 Citronelol.....</b>  | <b>45</b> |
| <b>2.4.2 <math>\beta</math>-cariofileno.....</b>  | <b>46</b> |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>  | <b>48</b> |
| 3.1 EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DO CITRONELOL.....   | 48        |
| <b>3.1.1 Avaliação do uso de diferentes lípases.....</b>  | <b>48</b> |
| <b>3.1.2 Influência do tempo de reação.....</b>   | <b>50</b> |
| <b>3.1.3 Influência da quantidade e do tipo do agente oxidante.....</b>   | <b>52</b> |
| <b>3.1.4 Influência da quantidade e tipo de doador de acila.....</b>  | <b>54</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3.1.5 Influência da Temperatura.....</b>   | <b>57</b> |
| <b>3.1.6. Efeitos do solvente orgânico.....</b>   | <b>58</b> |
| <b>3.2 EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DO <math>\beta</math>-CARIOFILENO</b>               | <b>62</b> |
| <b>3.2.1. Avaliação do uso de diferentes lipases e micélios.....</b>                    | <b>63</b> |
| <b>3.2.2. Influência do tempo de reação.....</b>  | <b>65</b> |
| <b>3.2.3. Influência da quantidade, tipo de oxidante e a reutilização da CAL-B.....</b> | <b>66</b> |
| <b>3.2.4. Influência do doador de acila.....</b>  | <b>69</b> |
| <b>3.2.5. Influência da temperatura.....</b>  | <b>70</b> |
| <b>3.2.6. Efeito do meio orgânico.....</b>  | <b>71</b> |
| <b>4 CONCLUSÕES.....</b>  | <b>74</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>76</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>  | <b>82</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Em todas as células vivas ocorrem ininterruptamente muitas reações, e as moléculas agem reorganizando os átomos, transferindo elétrons e transformando energia para a manutenção dos organismos vivos. A maioria das reações de interesse biológico na verdade deveria ser muito lenta ou nem ocorrer devido a sua complexidade. Entretanto, essas reações são muito rápidas, o que leva à conclusão que existem moléculas que aumentam em milhões de vezes as velocidades das reações em que participam. Esses catalisadores naturais são chamados de enzimas. Enzimas são, em geral, proteínas que agem de modo muito específico sobre um determinado substrato e são raros os exemplos que produzem subprodutos que não são utilizados nos organismos vivos.<sup>1,2</sup>

Elas atuam, em geral sob condições suaves de temperatura (20-40°C), podendo catalisar reações em regiões pouco reativas da molécula e não se restringem apenas aos substratos naturais. Esta, entre outras vantagens, tem chamado a atenção de pesquisadores, os quais têm buscado constantemente a otimização de processos sintéticos e analíticos, procurando sempre a máxima eficiência de um determinado processo e conseqüentemente diminuição dos custos e poluição.<sup>4</sup>

Após a introdução da tecnologia de recombinação do DNA, o conceito de biocatálise mudou significativamente. Grandes avanços no sequenciamento do genoma, bioinformática e síntese genética facilitaram o acesso a uma enorme biodiversidade de enzimas no qual não era possível prever há 10 anos.<sup>3</sup>

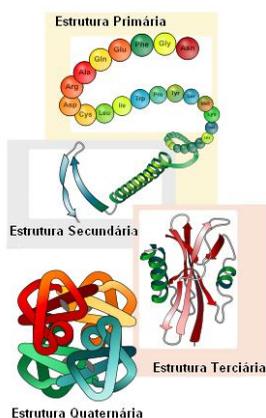
As reações catalisadas por biocatalisadores representam grande importância dentro da indústria. Estes realizam várias reações com maior eficiência comparadas aos catalisadores convencionais, e têm sido utilizados na produção de alimentos, produtos químicos, farmacêuticos e detergentes industriais.<sup>5,6,7</sup> A versatilidade destes biocatalisadores tem sido também explorada em síntese orgânica. Dando continuidade aos estudos de biocatálise, neste trabalho, lipases e micélios serão utilizados em reações de epoxidação de compostos que contêm ligações duplas carbono-carbono.

## 1.2 ENZIMAS

As enzimas são proteínas, com exceção de um pequeno grupo de moléculas de ácido ribonucléico (RNA). São constituídas por uma

série de compostos orgânicos simples,  $\alpha$ -aminoácidos, que se unem por ligações peptídicas. A sequência exata de aminoácidos de cadeia protéica é denominada estrutura primária. O arranjo espacial dessa sequência é chamado de estrutura secundária e o tridimensional é conhecido como estrutura terciária.<sup>2</sup>

Algumas proteínas contêm duas ou mais unidades de cadeias polipeptídicas, ou subunidades, que podem ser idênticas ou diferentes. O arranjo espacial destas subunidades protéicas em três complexos tridimensionais constitui a estrutura quaternária.<sup>2</sup> A **Figura 1** mostra a representação esquemática dessas estruturas.



**Figure 1** - Representação esquemática das estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias de uma proteína (adaptada da referência 2).<sup>2</sup>

As enzimas são as biomoléculas mais notáveis e especializadas dos sistemas vivos e apresentam como característica principal uma eficiência catalítica extraordinária, sendo então chamadas de catalisadores naturais. Vale salientar que as enzimas se diferenciam de outros tipos de catalisadores devido ao alto grau de especificidade com relação aos seus substratos. Elas aceleram reações químicas específicas em meio aquoso sob condições suaves de temperatura e pH.<sup>2,8,9</sup>

A maior parte do poder catalítico das enzimas é devido à capacidade de aproximar os substratos em orientações favoráveis que promovam a formação dos estados de transição. Essa aproximação ocorre no sítio ativo, uma região que constitui somente uma pequena porção do volume total da enzima e que está usualmente próximo ou na superfície, estando assim acessível às moléculas de substratos. Em geral,

o sítio ativo contém aminoácidos cujas cadeias laterais formam uma superfície tridimensional complementar ao substrato.<sup>10</sup>

A capacidade de aproximar os substratos em uma determinada orientação favorece a diminuição da energia de ativação, que é necessária para converter o substrato em produto. Em geral, as velocidades de reações se tornam mais rápidas na ordem de  $10^6$  até  $10^{23}$  vezes quando comparadas com as não catalisadas.<sup>8,9</sup> Como há um número muito grande de reações, deduz-se que existam muitos mecanismos enzimáticos. De forma geral, o mecanismo simplificado da ação desses biocatalisadores pode ser representado como mostrado na **Figura 2**.<sup>10</sup>

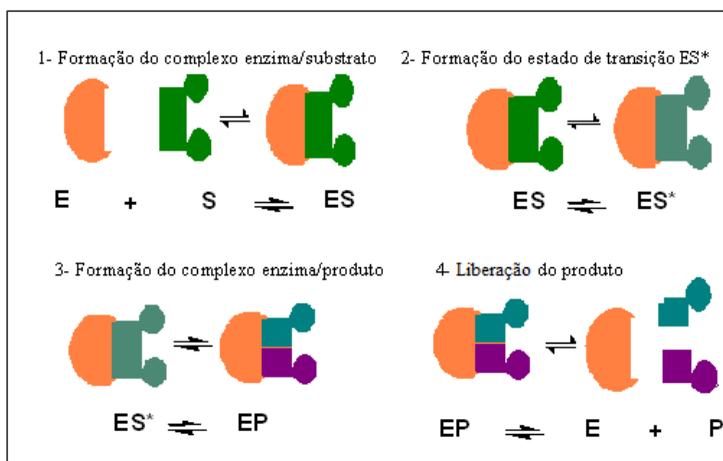


Figura 2 - Representação esquemática do mecanismo de ação enzimática.<sup>10</sup>

Devido a especificidade, a maioria delas é nomeada pelo seu substrato ou pela reação que catalisa seguido da palavra **ase**. Segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM), as enzimas são classificadas em seis grandes grupos, de acordo com o tipo de reação envolvida, como mostrado na **Tabela 1**.<sup>8,9</sup>

Tabela 1 – Classificação das enzimas segundo a UIBBM.<sup>9</sup>

| Classe          | Reação   | Exemplos de enzimas                        |
|-----------------|--|--|
| 1-Oxirredutases | Oxidação-redução   | Lactato desidrogenase                      |
| 2- Transferases | Transfêrencia de grupos (ex. aldeídos, cetonas, metilas) | Homocisteina metiltransferase              |
| 3-Hidrolases    | Hidrólise/formação de esterese, amidas, lactonas etc.    | Quimotripsina, papaína, lipases, esterases |
| 4-Liases        | Adição ou remoção de grupos pequenos em C=C, C=N, C=O    | Fumarase                                   |
| 5-Isomerases    | Isomerização   | Mandelato racemase                         |
| 6-Ligases       | Ligação de dois substratos                               | Asparagina sintetase                       |

Além de serem específicas, as enzimas são catalisadores de alta eficiência, atuam sob condições suaves de temperatura e pressão, catalisam reações em regiões pouco reativas da molécula e apresentam três tipos de seletividade:

- quimiosseletividade – podem atuar em somente um tipo de grupo funcional mesmo na presença de outros grupos reativos;<sup>10</sup>
- regio e diasterosseletividade – podem distinguir entre grupos funcionais situados em diferentes regiões do mesmo substrato;<sup>10</sup>
- enantiosseletividade – são catalisadores quirais e sua especificidade pode ser explorada para sínteses seletivas e assimétricas.<sup>10</sup>

Todas essas características, adicionadas às necessidades globais de tecnologias mais limpas, gestão de produtos menos tóxicos e dos subprodutos gerados nos processos, as enzimas têm chamado atenção da indústria. Os produtos obtidos *via* catálise enzimática apresentam maior valor agregado contribuindo significativamente para uma melhor qualidade de vida.<sup>11-13</sup>

Por exemplo, as oxidações seletivas de um dos vários grupos hidroxilados em álcoois e açúcares, apresentam interesse industrial desde os anos 30 do século passado. As oxidações químicas clássicas costumam usar estequiometria com oxidantes em excesso, e a remoção seletiva destes reagentes restantes é decisivo para a qualidade do produto. Portanto, métodos enzimáticos tornaram-se práticas usuais nesta produção.<sup>14</sup>

O uso de biocatalisadores em transformações químicas tem como objetivo segurança, eficiência econômica, economia de energia e procedimentos que não prejudicam o meio ambiente.

A sua utilização faz com que surja uma química biotecnológica de interface com oportunidade para a melhoria e inovação em alguns problemas existentes como o uso atual de grupos de proteção para superação da não seletividade e reatividades incompatíveis na síntese de biomiméticos.<sup>15</sup>

A partir de materiais de partida simples com um número mínimo de etapas, evitando proteção-desproteção e com a orientação para formação apenas do produto de interesse, a biocatálise vem contribuindo para as soluções destes desafios.<sup>16</sup>

Por exemplo, na acilação da *D*-ribono-1,4-lactona **1** pelo método apresentado por Sá e col.<sup>17</sup> são necessárias 3 etapas envolvendo proteção e desproteção das hidroxilas e com o método enzimático a reação ocorre em uma única etapa apresentando alta regioseletividade.<sup>18</sup> (Figura 3).

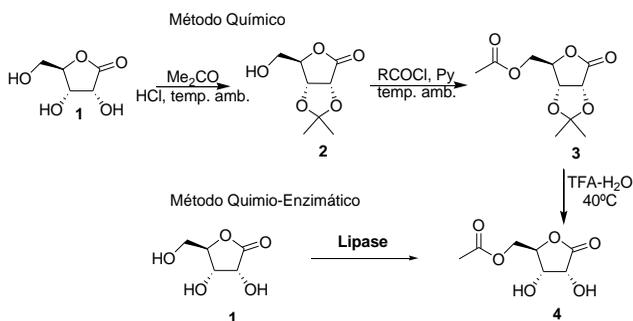


Figura 3 - Acilação da *D*-ribono-1,4-lactona *via* química<sup>17</sup> e químio-enzimática.<sup>18</sup>

Com o desenvolvimento de metodologias mais limpas e de baixo custo, as enzimas tornaram-se indispensáveis para a produção de muitos compostos. A exploração da biodiversidade na busca de novos

catalisadores por técnicas de seleção de microrganismos, de plantas ou de células animais representa um método tradicional de descoberta de novas enzimas para o desenvolvimento da biocatálise em escala industrial.<sup>3</sup> Mais recentemente, destaca-se a técnica da engenharia enzimática para obtenção de biocatalisadores mais resistentes.<sup>10,14</sup>

Por exemplo, no trabalho de Savile e col. uma variedade de técnicas de engenharia de enzimas foi aplicada para a obtenção de transaminase com atividade e propriedades necessárias para a aminação assimétrica da cetona prositagliptina **5** à sitagliptina **6**. Esse, resultou em um processo biocatalítico eficiente de trans-aminação para a obtenção em larga escala do composto antidiabético **6** fabricado pela Merck. A transaminase substituiu um catalisador de ródio.<sup>19</sup> (**Figura 4**)

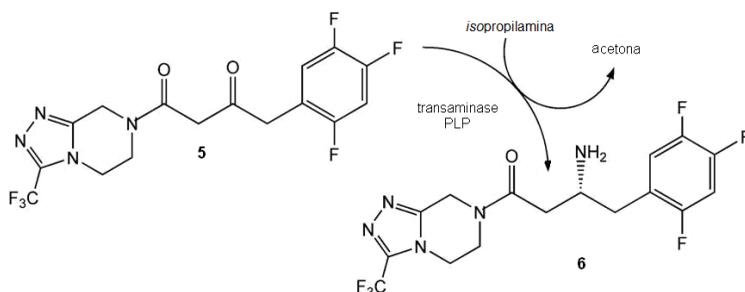


Figura 4 - Aminoação *via* catálise assimétrica da cetona **5** à sitagliptina (**6**) obtida industrialmente pela Merck.<sup>19</sup>

Micro-organismos isolados em território brasileiro têm demonstrado excelente potencial como biocatalisadores frente a diferentes substratos orgânicos de interesse.<sup>20,21</sup>

Zanotto e col. avaliaram 212 fungos isolados de plantas da região Amazônica para aplicação em biocatálise como fornecedores de lipases. Cerca de 90% dos fungos apresentaram atividade hidrolítica frente à hidrólise da tributirina e nove desses fungos apresentaram bons desempenhos de enantiosseletividade na resolução do (*R,S*) octan-2-ol.<sup>20</sup>

O fungo isolado UEA\_115 foi o biocatalisador mais versátil, apresentando bom desempenho nas reações de esterificação dos ácidos oleico e linoleico com *n*-pentanol e *n*-dodecanol (conversão >90%) e boa capacidade para a resolução do (*R,S*) octan-2-ol ( $ee_s$  29%;  $ee_p$  99%;  $c$  22%;  $E > 200$ ). Com esse estudo foi possível demonstrar o grande potencial dos fungos amazônicos como fontes de lipases para a biocatálise.<sup>20</sup> (**Figura 5**).

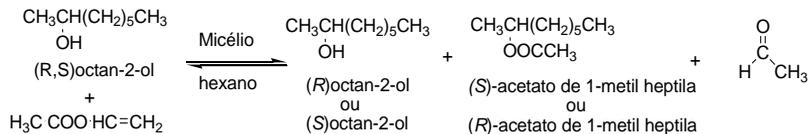


Figura 5 - Resolução enantiosseletiva do (R,S) octan-2-ol com acetato de vinila.<sup>20</sup>

Pilissão e col. avaliaram o desempenho de duas lipases nativas oriundas de micro-organismos de solo da região de Bueno Brandão-MG (lipases de *Aspergillus niger* e de *Rhizopus oligosporus*) na resolução da (R,S)-feniletilamina **7** com diversos agentes acilantes tais como os acetatos de etila, de *iso*-propenila e de vinila. Com a lipase de *A. niger*, a amida (**R**)-**11** foi obtida com  $ee_p$  de 6 até >99% em *n*-heptano ou *n*-hexano.<sup>21</sup> (Figura 6).

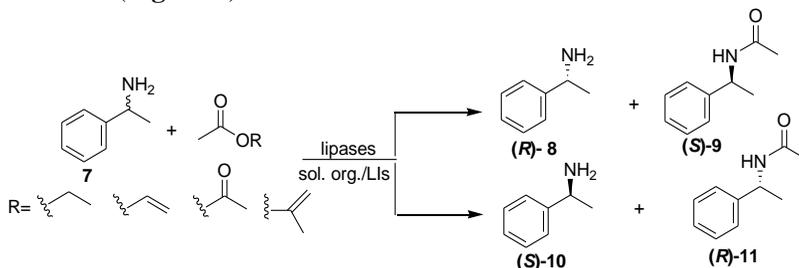


Figura 6 - Resolução de (R,S)-feniletilamina mediada por lipases nativas.<sup>21</sup>

### 1.3 LIPASES

Como as enzimas são nomeadas pelas reações que catalisam, as lipases (E.C.3.1.1.3) nos organismos vivos são responsáveis pela hidrólise de ésteres, principalmente os triacilgliceróis em ácidos graxos livres, di e monoacilglicerol e glicerol. A Figura 7 mostra a hidrólise total de um triacilglicerol.<sup>22,23</sup>

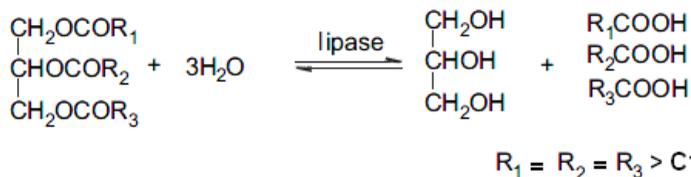


Figura 7 - Hidrólise de um triacilglicerol catalisada por lipases.<sup>13</sup>

As lipases são enzimas da família das hidrolases presentes em diversos organismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias. Elas podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de micro-organismos tais como os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum* sp, *Achromobacter* sp e *Staphylococcus* sp. Desses micro-organismos, as lipases de *Aspergillus* sp, *Mucor* sp, *Rhizopus* e de *Candida* sp estão comercialmente disponíveis. Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases de micro-organismos são preferíveis às de fonte animal e vegetal devido ao alto custo de isolamento.<sup>23-25</sup>

Salienta-se também a descoberta recente de micro-organismos em condições extremas de temperatura e pH, os chamados “extremófilos”.<sup>23</sup>

O mecanismo comum de hidrólise de ésteres, realizado pelas lipases consiste nas seguintes etapas, e está representado na **Figura 8**.

1. ligação ao substrato éster;
2. formação do primeiro intermediário tetraédrico por ataque nucleofílico da serina com o oxiânion estabilizado por 2 ou 3 ligações de hidrogênio;
3. quebra da ligação éster e saída da porção alcoólica;
4. hidrólise do intermediário acil-enzima;
5. formação do segundo intermediário tetraédrico;
6. formação do produto e regeneração do sítio ativo.

A terceira etapa na qual ocorre a formação do intermediário acil-enzima é determinante para a catálise. Nessa etapa, ocorre o ataque do nucleófilo, se esse for um álcool, amina, tiol ou peróxido; outros produtos podem ser formados tais como ésteres, amidas, tiofenóis e peroxi-ácidos.<sup>10,26-28</sup>

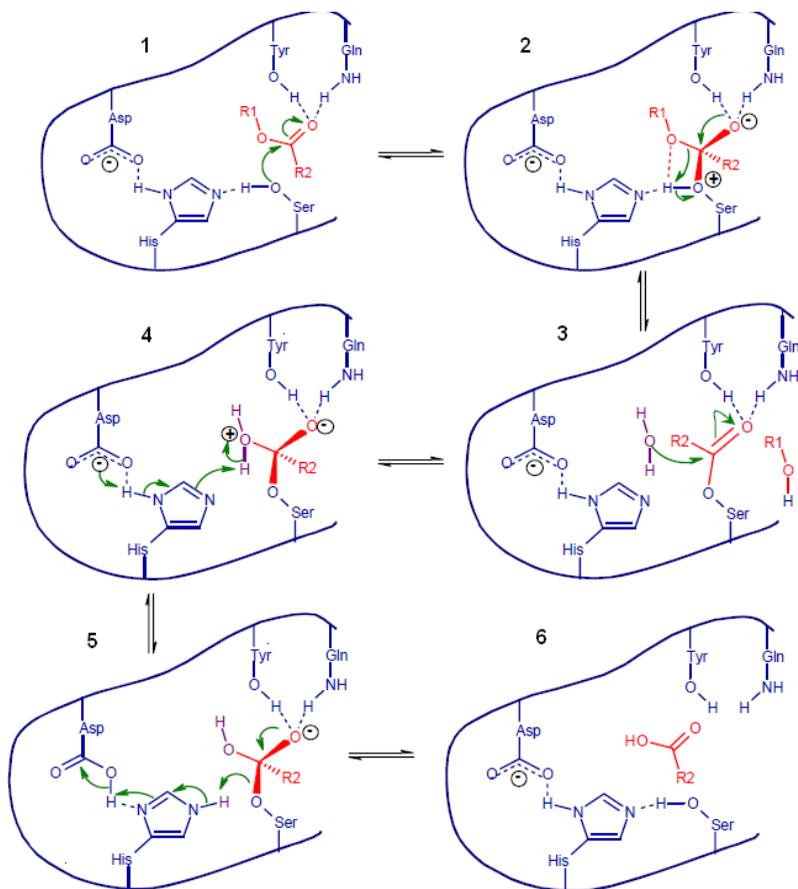


Figura 8- Mecanismo proposto para a hidrólise enzimática de um éster.<sup>27-29</sup>

As lipases podem ser utilizadas na forma livre ou imobilizadas em suportes, e não necessitam a utilização de cofatores uma vez que pertencem à classe das serina hidrolases.<sup>10,29,30</sup> Possuem alta estabilidade e aceitam uma ampla variedade de substratos.

Além disso, agem na interface água/lípido não necessitando de substratos solúveis em água, fornecendo assim um meio de interface, o que assegura eficiência na realização de transformações em solventes orgânicos, distinguindo-as das outras hidrolases. Em solventes orgânicos, catalisam a transferência de grupos acilas de compostos doadores para vários compostos aceitadores.<sup>27-30</sup>

As lipases realizam diversas reações, tais como esterificação, transesterificação, aminólise e tiotransesterificação em solvente orgânico anidro, sistema bifásico e em solução micelar com alta especificidade.<sup>13,18-21,29</sup>

Patil e col. utilizaram a lipase de *C. antarctica* (CAL-B) na esterificação do ácido 4-metoxi-cinâmico (**12**) com glicerol (**13**) para a produção do éster 4-metoxi-cinamato de glicerola (**14**), o qual pode ser usado na fabricação de filtros protetores da radiação ultra-violeta.<sup>31</sup>

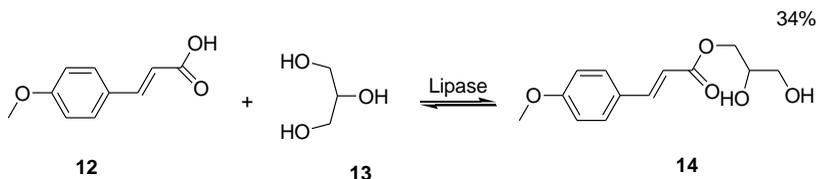


Figura 9 - Esterificação do ácido 4-metoxi-cinâmico com glicerol catalisada pela CAL-B.<sup>31</sup>

Xie e col. imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* em microesferas de quitosana magnetizadas na reação de transesterificação do óleo de soja com metanol para obter ésteres metílicos de ácidos graxos, atingindo 87% de conversão nas condições otimizadas (35 °C, 30 h).<sup>32</sup>

A lipase de *C. antarctica* (CAL-B) tem se destacado por sua versatilidade nesses processos biocatalíticos. A forma comercial imobilizada da CAL-B é também chamada Novozym 435, e é a lipase mais utilizada em reações químicas devido à alta atividade, estabilidade e possibilidade de reutilização.<sup>18,33</sup>

A CAL-B pertence à família das  $\alpha/\beta$  hidrolases com uma tríade catalítica conservada, consistindo dos resíduos de serina 105, histidina 224, aspartato 187 e/ou ácido glutâmico.<sup>28</sup> A **Figura 10** mostra uma representação esquemática da estrutura tridimensional da CAL-B.<sup>34</sup>

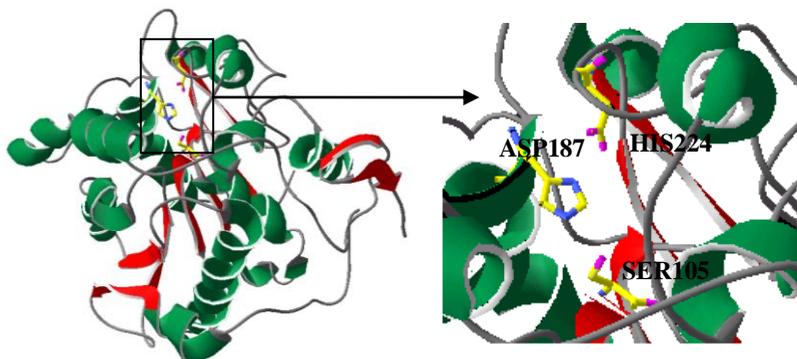


Figura 10 - Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *C. antarctica* obtida no *Protein Data Bank* (PDB) e a tríade catalítica.<sup>34</sup>

O gene de *C. antarctica* codificado pela lipase B é clonado em um hospedeiro de *Aspergillus oryzae*.<sup>35</sup> A lipase é adsorvida em uma resina chamada Lewatit VP OC1600, que consiste de polimetilacrilato reticulado com divinilbenzeno (**Figura 11**).<sup>36</sup>

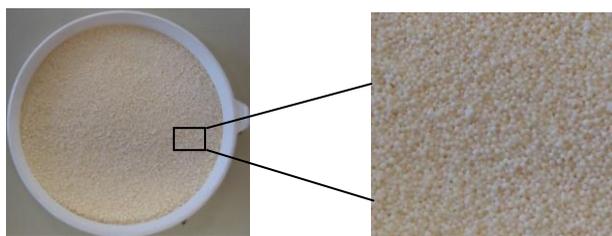


Figura 11 - Lipase de *C. antarctica* (Novozym 435) immobilizada em resina de polimetilacrilato.<sup>36</sup>

Após imobilização, esta enzima torna-se robusta mostrando estabilidade em diferentes temperaturas e tolerância em solventes polares e não polares sem perder a capacidade hidrolítica e sintética.<sup>18,29,37</sup>

Joubioux e col. utilizaram a CAL-B na O/N-acilação do ácido mirístico (**15**) com álcoois e aminas monofuncionais e avaliaram a quimiosseletividade nessa reação. A CAL-B foi quimiosseletiva e catalisou preferencialmente a N-acilação em relação à O-acilação.<sup>38</sup> (**Figura 12**)

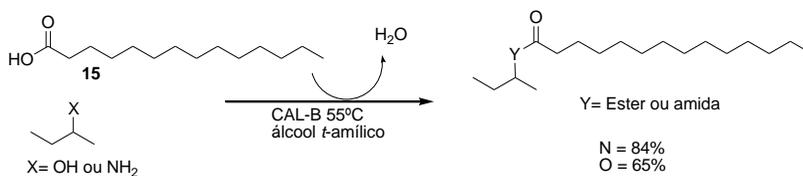
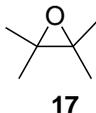


Figura 12 - *O/N*-acilação do ácido mirístico utilizando CAL-B.<sup>38</sup>

A CAL-B é também resistente ao peróxido de hidrogênio, o qual é essencial para a peridrólise de ácidos carboxílicos na formação de epóxidos.<sup>39</sup>

#### 1.4 EPÓXIDOS

Os epóxidos (**17**) são éteres cíclicos formados por três átomos (C-O-C), também conhecidos como anéis oxiranos. Devido à alta tensão do anel, são compostos instáveis e reativos.



Essa tensão vem do ângulo de 60° formado entre as ligações no anel composto por C-O-C, a qual facilita a abertura do anel, fazendo com que a molécula deseje restaurar o ângulo tetraédrico (109°), que é ideal em todos os átomos de hibridização  $sp^3$ .<sup>40</sup>

Como citado, devido à tensão do anel e polaridade, os epóxidos são suscetíveis a reações com um grande número de nucleófilos, eletrófilos, ácidos, bases, agentes redutores e oxidantes.<sup>41</sup>

A função epóxido, atualmente, vem sendo estudada cada vez mais com interesse. Em síntese de produtos naturais, tanto na forma de racematos quanto na opticamente ativa, os intermediários contendo o grupo epóxido mostram-se extremamente úteis devido à variedade de derivados que podem ser obtidos.<sup>42</sup>

Os epóxidos são uma matéria-prima importante em muitos processos industriais, encontrando aplicações em adesivos, polímeros, revestimentos e tintas, sendo que alguns desses compostos ainda exibem atividade biológica.<sup>43,44</sup>

Lee e col. testaram 22 epóxidos, e seus correspondentes derivados de pirazóis estruturalmente relacionados com chalconas, na

citotoxicidade *in vitro* com linhagens de células de câncer (melanoma e leucemia). Na maioria dos casos os pirazóis foram mais ativos que os epóxidos.<sup>44</sup> (Figura 13)

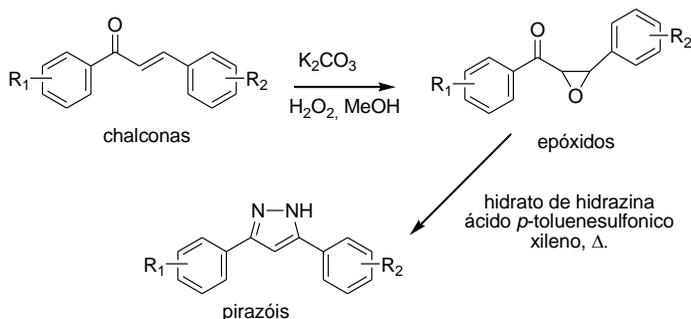


Figura 13 - Síntese de epóxidos e pirazóis a partir de chalconas usados nos testes de citotoxicidade.<sup>44</sup>

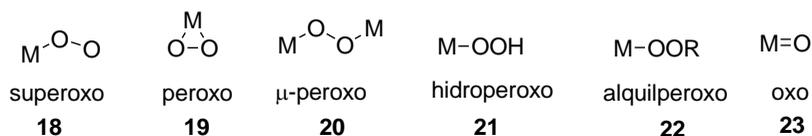
Recentemente, Hwang e col. apresentaram alguns métodos químicos e biológicos, utilizando de micro-organismos para a obtenção de epóxidos quirais com altos excessos enantioméricos (>99%). Alguns desses compostos podem ser usados como intermediários na obtenção de fármacos quirais.<sup>45</sup> (Tabela 2)

Tabela 2 - Exemplos de epóxidos quirais utilizados como intermediários na obtenção de fármacos.<sup>45</sup>

| Epóxido Quiral | Produto Final | Aplicação   |
|----------------|---------------|---|
|                |               | Inibidor da HIV protease<br><b>Indinavir</b> <sup>TM</sup>                      |
|                |               | Bloqueador dos canais de cálcio<br><b>Diltiazem</b> <sup>TM</sup>               |
|                |               | Bloqueador $\beta$ -adrenérgico ( <b>R</b> )-<br><b>Nifedipol</b> <sup>TM</sup> |

Em geral, os epóxidos são preparados através da inserção de oxigênio em uma ligação dupla de carbono. Essa reação não é simples, e muitas vezes para que o oxigênio seja inserido são necessárias substâncias químicas e reagentes oxidantes específicos para ocorrer a epoxidação.

Nesse sentido, muitos metais são utilizados como catalisadores. A importância para utilização desses elementos são os vários tipos de complexos metálicos peroxo e oxo que podem ser formados (**18-23**).



Entre os metais utilizados na catálise da epoxidação de olefinas, citam-se Ti, Zr, Hf, V, Nb, Ta, Cr, Mo, W, Mn, Tc, Re, Fe, Ru, Os, Co, Rh, Ir, Ni, Pd, Pt, Cu, Au e Ag.<sup>46</sup> De especial importância catalítica são titânio (IV), vanádio (V), molibdênio (VI) e tungstênio (VI). Esses metais são ácidos de Lewis em seu mais alto estado de oxidação ( $d^0$ ) e, por isso possuem um baixo potencial de redox e são lábeis à substituição de ligantes.<sup>46</sup>

Quando são usados metais tais como Fe, Co, Cr, Mn e Ru, complexados com ligantes tipo anéis porfirínicos, o centro metálico pode possuir diversos estados redox e podem mimetizar o sistema enzimático citocromo P-450, quando o oxidante é um complexo *porfirina-oxo-ferro*.<sup>47</sup>

Outra forma de obtenção de epóxidos e através da formação de peróxi-ácidos.<sup>42,48</sup>

Os perácidos ou peróxi-ácidos são preparados a partir do anidrido ou do ácido correspondente com peróxido de hidrogênio. Nessa reação, adiciona-se um átomo de oxigênio extra entre o grupo carboxila e o hidrogênio ácido transformando-o em semi-ésteres de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).<sup>42</sup> Estes são um pouco menos ácidos que os ácidos carboxílicos porque a base conjugada não está mais estabilizada por deslocalização com o grupo carbonila, mas são eletrofílicos no oxigênio, pois um ataque nucleofílico desloca o carboxilato, que é um bom grupo de saída. (**Figura 14**).

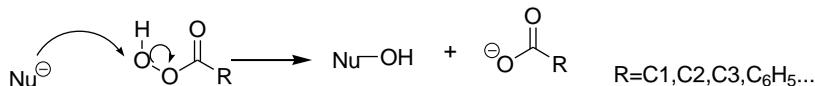


Figura 14 - Ataque nucleofílico ao oxigênio do perácido.

Um dos oxidantes peróxi-ácidos mais reativos é o ácido peróxi-trifluoroacético (**25**), e a Figura 15 mostra a reação para a sua formação a partir do anidrido trifluoroacético **24**.

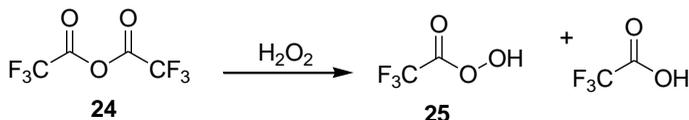


Figura 15 - Formação do ácido peróxi-trifluoroacético.

Entretanto, o perácido mais comumente usado é o ácido *meta*-cloro *per*-benzóico conhecido como *m*-CPBA **26**, que reage com olefinas para formação de epóxidos. (**Figura 16**).

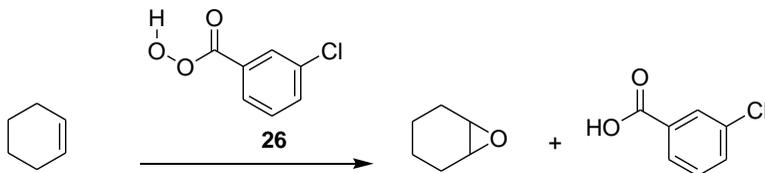


Figura 16 - Reação do ciclo-hexeno com ácido *meta*-cloroperoxibenzóico **26** para formação do epóxi-ciclo-hexeno.

A natureza tóxica desses reagentes e o potencial para hidrolisar o epóxido dificulta seu uso em grande escala. Muitos dos epóxidos produzidos industrialmente, incluindo o óxido de etileno (**27**), são sintetizados usando o método da cloridrina ou *via* perácidos.<sup>42</sup> (**Figura 17**)

Juntamente com as questões de segurança, a geração de grandes quantidades de sub-produtos clorados e de resíduos ácidos, esses métodos tornam-se desvantajosos.

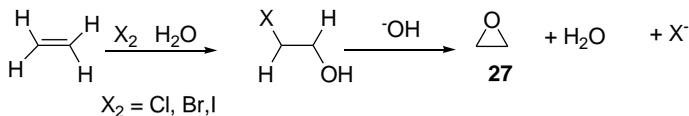


Figura 17 - Epoxidação do eteno *via* halodrina para a formação do óxido de etileno.<sup>42</sup>

No início de 1990, Björkling e col. descreveram o uso de lipases na peridrólise dos ácidos carboxílicos na presença de peróxido de hidrogênio.<sup>39</sup> O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) reage com o complexo acil-enzima, formado pelos ácidos graxos e pelo grupo hidroxila da serina no sítio ativo, para produzir o ácido percarboxílico correspondente, como apresentado na **Figura 18**.<sup>10</sup>

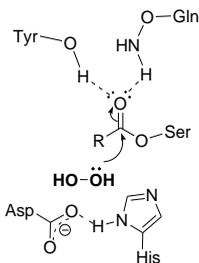


Figura 18 - Ataque do nucleófilo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao complexo acil enzima, (adaptado da referência 10).

Além do uso de peróxido de hidrogênio aquoso, um complexo com uréia, chamado uréia peróxido de hidrogênio (UPH), tem produzido bons resultados. A UPH é uma forma seca de peróxido de hidrogênio que tem o potencial de liberação de peróxido de hidrogênio de maneira controlada, e evita a presença de água na reação, minimizando reações indesejáveis dos produtos oxidados.<sup>49</sup>

Recentemente tem sido relatado o uso de enzimas imobilizadas, principalmente a lipase de *C. antarctica* B na epoxidação quimio-enzimática de olefinas.<sup>50-54</sup> Essa lipase tem tido destaque devido à sua excelente eficiência na catálise da peridrólise do ácido octanóico, mostrando boa estabilidade e a possibilidade de reutilização.<sup>50,55</sup>

O uso de lipases na epoxidação quimio-enzimática de ligações duplas tem sido amplamente utilizada. A simplicidade do processo e eficiência da reação em temperatura e pressão normais permitem que a

oxidação de ligações duplas de compostos, tal como o 3-(+)-careno (**28**), ocorram *in situ*. Nessa reação, não há necessidade de isolar o perácido, e além disso a reutilização do biocatalisador tem mostrado vantagens significativas para todo o processo.<sup>50</sup> (**Figura 19**)

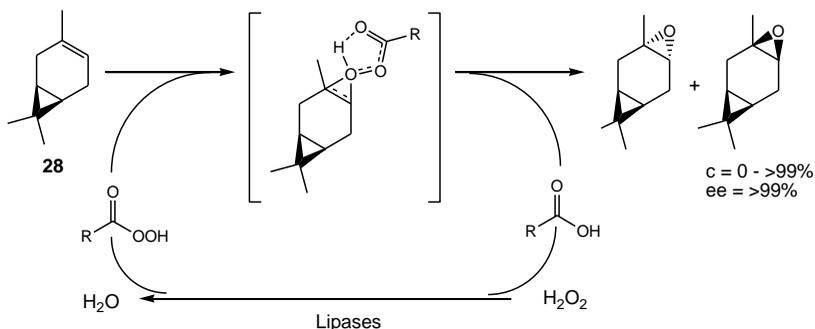


Figura 19 - Epoxidação quimio-enzimática (+)-3-careno.<sup>50</sup>

Klass e Warwel reutilizaram com sucesso a CAL-B por 15 vezes, sem perda significativa de atividade na auto-epoxidação de ácido oléico (**29**) por adição de peróxido de hidrogênio 60%.<sup>56</sup> Mais tarde, a CAL-B não imobilizada foi também usada na auto-epoxidação de **29** com peróxido de hidrogênio 30%, e a lipase livre perdeu cerca de 50% de sua atividade após o reuso.<sup>57</sup> (**Figura 20**)

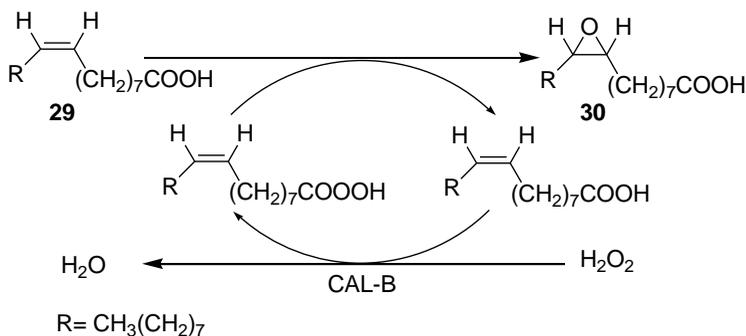


Figura 20- Epoxidação quimio-enzimática do ácido oléico.<sup>57</sup>

Skouridou e col. também usaram esta lipase para catalisar a formação do ácido peroxi-octanóico, a partir do correspondente ácido carboxílico e peróxido de hidrogênio em tolueno. O ácido peroxi-

octanóico formado foi usado *in situ* para a oxidação do  $\alpha$ -pineno (**31**) ao correspondente epóxido variando a quantidade de peróxido de hidrogênio ao longo de cinco ciclos de reação. Após os cinco ciclos, a atividade da lipase diminuiu em 60-90%, dependendo da quantidade de peróxido de hidrogênio utilizado.<sup>58</sup> (**Figura 21**)

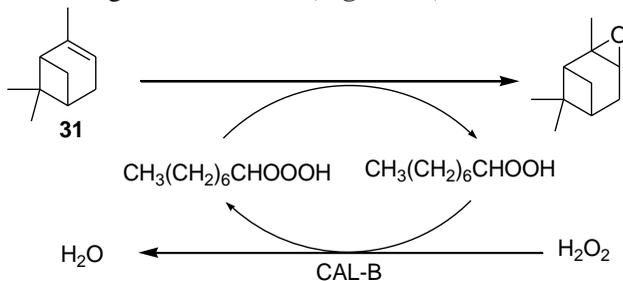


Figura 21 - Epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno.<sup>58</sup>

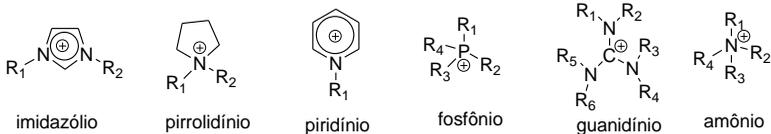
Esta lipase também foi utilizada para epoxidação quimio-enzimática dos ésteres metílicos derivados do óleo de girassol em sistema bifásico de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$  com 30% (v/v) de  $\text{H}_2\text{O}_2(\text{aq})$ . Em alguns experimentos a conversão em epóxidos foi superior a 99%.<sup>59</sup>

Recentemente, várias reações de epoxidação na presença de líquidos iônicos também tem sido descritas na literatura.<sup>54,60</sup>

## 1.5 LÍQUIDOS IÔNICOS

Os líquidos iônicos (LIs) são compostos inteiramente formados de íons, sendo a maioria líquidos à temperatura ambiente ou muito abaixo desta. São formados por um cátion, geralmente orgânico e um ânion. A **Figura 22** mostra as estruturas de alguns LIs comumente usados em biocatálise.

### Cátions



### Ânions

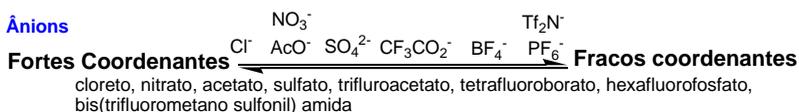


Figura 22 - Cátions e ânions comumente usados nos LIs.<sup>61</sup>

Os LIs são amplamente utilizados como uma alternativa na substituição de solventes orgânicos tóxicos, perigosos, inflamáveis e altamente voláteis. Suas propriedades físico-químicas são atrativas, incluindo a pressão de vapor desprezível, múltiplas interações, solvatação de compostos orgânicos e inorgânicos, propriedades químicas e térmicas de excelente estabilidade, e alta condutividade iônica e eletroquímica.<sup>61</sup>

Além disso, as propriedades físico-químicas tais como a viscosidade, hidrofobicidade, densidade e solubilidade podem ser modificadas, simplesmente selecionando diferentes combinações de cátions e ânions, bem como substituintes ligados para obter LIs para demandas específicas.<sup>62</sup>

Todas essas combinações interessantes de propriedades deram início a várias aplicações incluindo a extração, síntese orgânica, catálise, síntese inorgânica, síntese de nanomateriais e reações enzimáticas.<sup>61,62</sup>

Li e col. sintetizaram nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) com cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio em fase sólida, em uma única etapa e em temperatura ambiente. Esse método em uma única etapa diminuiu os custos da reação para a síntese de metalóxidos, os quais possuem potencial para a foto-catálise.<sup>63</sup>

Chrobok e col. oxidaram álcoois primários (benzílico, *p*-nitro benzílico, *p*-metoxi benzílico) aos seus respectivos aldeídos utilizando um filme de LI disperso sobre um catalisador de cobre. Foram obtidos altos rendimentos (92-95%), e os catalisadores foram usados em até 7 ciclos sem perda significativa de atividade.<sup>64</sup> (**Figura 23**)

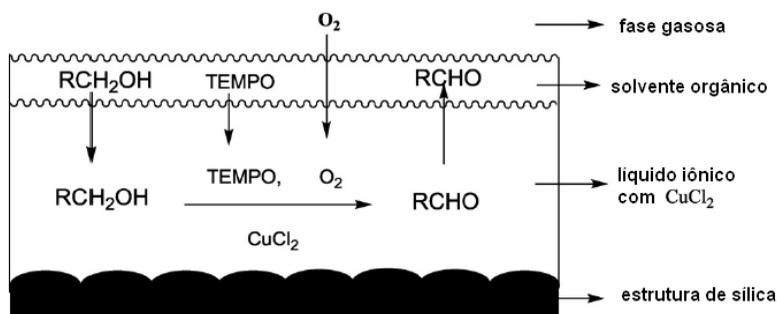


Figura 23 - Oxidação de álcoois primários em LI. TEMPO = 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidina.<sup>64</sup>

É bem documentado que lipases são as melhores escolhas para reações enzimáticas realizadas em LIs. Um vasto número de reações catalisadas por lipases foi feito nesse meio, puro ou em misturas com outros solventes orgânicos. Alguns exemplos incluem a esterificação, transesterificação, alcoólise, aminólise, hidrólise, polimerizações e epoxidações.<sup>54,60,62</sup>

Ding e col. estudaram a  $\alpha$ -aminação assimétrica de aldeídos com azodicarboxilatos catalisada por derivados da prolina no LI tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIm][BF<sub>4</sub>]. As reações apresentaram rendimentos altos (89-96%) e enantiosseletividade excelente (ee 92-98%). Além disso, o sistema pode ser facilmente reciclado e reutilizado por pelo menos quatro vezes sem diminuição significativa dos rendimentos e da enantiosseletividade.<sup>65</sup> (**Figura 24**)

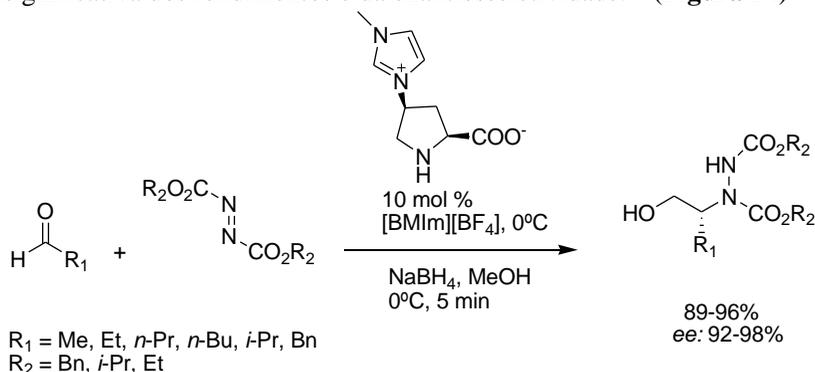


Figura 24 –  $\alpha$ -Aminoxidação de aldeídos em LIs.<sup>65</sup>

Os LIs, e em particular seus ânions, formam fortes ligações de hidrogênio que auxiliam na interação enzima-substrato.<sup>62</sup>

Silva e col. avaliaram o uso de LIs hidrofóbicos e hidrofílicos na epoxidação enzimática do oleato de metila. Os melhores resultados na formação do epóxido do oleato de metila foram obtidos quando utilizou-se os líquidos iônicos hidrofóbicos tais como [BMIm][NTf<sub>2</sub>] e [BMIm][PF<sub>6</sub>].<sup>54</sup>

Em outro trabalho, foi discutida a influência benéfica da coordenação das ligações de hidrogênio em LIs na epoxidação e oxidação Bayer-Villegger de olefinas e cetonas cíclicas. Novos LIs foram testados e os diferentes LIs apresentaram resultados diferenciados devido à estabilidade apresentada pela mudança dos ânions. A **Figura**

25, mostra um exemplo da oxidação de Bayer-Villiger na presença dos LIs [BMIm][PF<sub>6</sub>], [BMIm][BF<sub>4</sub>] e [BMIm][NO<sub>3</sub>], entre outros.<sup>60</sup>

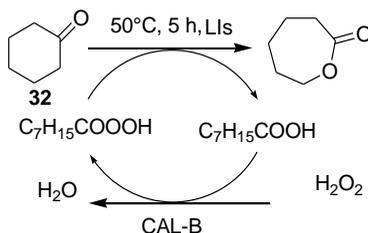


Figura 25 - Oxidação quimio-enzimática de Baeyer-Villiger da ciclo-hexanona 32 em LIs.<sup>60</sup>

Resultados apresentados por Saladino e col. mostraram que as reações realizadas em LIs foram mais seletivas e eficientes que as feitas em solventes orgânicos. Eles utilizaram catálise heterogênea em LIs na epoxidação de uma classe especial de alcenos, os terpenos tais como (*S*)-(+)-3-careno (**28**), (*R*)-(+)-limoneno(**33**), e geraniol (**34**).<sup>66</sup> (Figura 26)

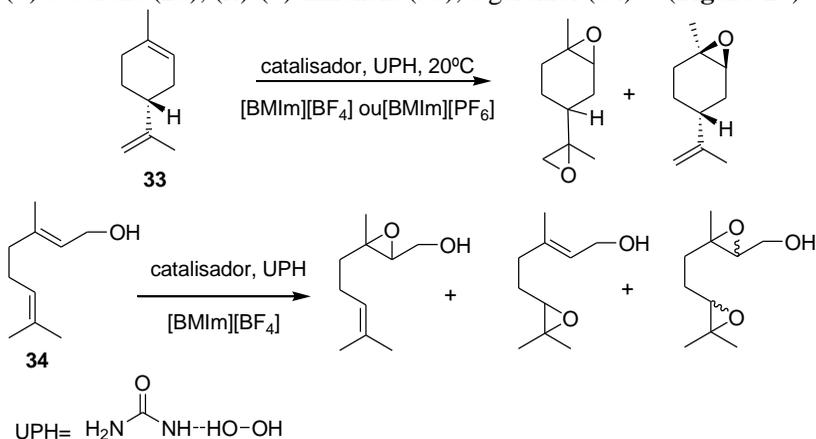
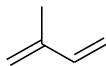


Figura 26 - Oxidação catalítica do (*R*)-(+)-limoneno (**33**) e geraniol (**34**).<sup>67</sup>

## 1.6 TERPENOS

Quimicamente, os terpenos são compostos derivados do isopreno (2-metil-1,3-butadieno)(**35**).<sup>67,68</sup>



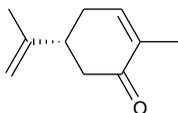
35

A maioria deles contém 10, 15, 20 ou 30 átomos de carbono. O número de átomos de carbono classifica os terpenos em:

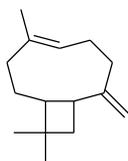
- Monoterpenos:  $C_{10}H_{16}$
- Sesquiterpenos:  $C_{15}H_{24}$
- Diterpenos:  $C_{20}H_{32}$
- Triterpenos:  $C_{30}H_{48}$
- Tetraterpenos:  $C_{40}H_{64}$
- Politerpenos:  $(C_5H_8)_n$

Além da estrutura isoprênica, os terpenos podem conter outros átomos (por exemplo, o oxigênio) e diversos grupos funcionais, tais como álcoois (**34**) (**38**), cetonas (**36**) e aldeídos (**39**), sendo então chamados de terpenóides. A **Figura 27** mostra exemplos de alguns terpenos.<sup>68</sup>

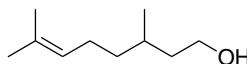
cetona

carvona **36**

hidrocarboneto

 $\beta$ -cariofileno **37**

álcool

citronelol **38**

aldeído

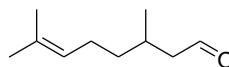
citronelal **39**

Figura 27 - Exemplos de terpenos e terpenóides pertencentes a diferentes classes de compostos orgânicos.<sup>68</sup>

Os óleos destilados das plantas, que muitas vezes contêm produtos de perfumaria ou materiais aromatizantes, são chamados de óleos essenciais e estes também contêm terpenos nos seus princípios ativos.<sup>68</sup>

Os terpenos foram originalmente nomeados a partir da terebintina, que é o óleo volátil de pinheiros usados em pintura a óleo, cujo principal componente é  $\alpha$ -pineno (**31**). O termo foi inicialmente usado para todos os compostos voláteis oleosos, insolúveis em água e geralmente com cheiros de resina das plantas. Hoje são a base de muitos perfumes, detergentes, aromas, agroquímicos e substâncias terapêuticas.<sup>68</sup>

Dentre os terpenos, destacam-se o  $\beta$ -cariofileno (**37**) e o citrionelol (**38**).

O citrionelol, 3,7-dimetiloct-6-en-1-ol, também conhecido como *di*-hidrogeraniol, e é um monoterpene acíclico natural. Ele é um dos constituintes de óleos essenciais de plantas, tais como o (+)-citrionelol presente no óleo de citrionela<sup>70</sup> e o (-)-citrionelol em óleos de rosa e gerânio (*Pelargonium* sp.).<sup>70</sup>

O  $\beta$ -cariofileno é um sesquiterpene presente em produtos naturais por exemplo no óleo de cravo, canela, folhas de copaíba e bálsamo, os quais têm sido usados como remédios naturais e fragrâncias. O odor do  $\beta$ -cariofileno é descrito como amadeirado e apimentado.<sup>71</sup> Este composto tem sido usado como fragrância química desde o ano de 1930.

O  $\beta$ -cariofileno é também um substrato interessante devido à presença em sua estrutura, de duas ligações duplas distintas, sendo que uma delas faz parte do anel de 9 membros e é ativada pela metila e a outra é exocíclica. Essas diferenças estruturais nas ligações duplas fazem com que elas apresentem reatividades diferenciadas com relação a diversos reagentes, incluindo agentes oxidantes.

A oxidação de terpenos tem uma aplicação industrial importante considerando que os correspondentes epóxidos são usados em matérias-primas para a síntese de fragrâncias, aromatizantes, inseticidas e materiais comercialmente importantes.<sup>72</sup>

Por exemplo, o epóxido da carvona (**41**) é um precursor para a síntese de um diterpene (**40**) análogo ao constituinte da planta jamaicana *Croton linearis* e que tem alto potencial inseticida. (**Figura 28**)<sup>73</sup>

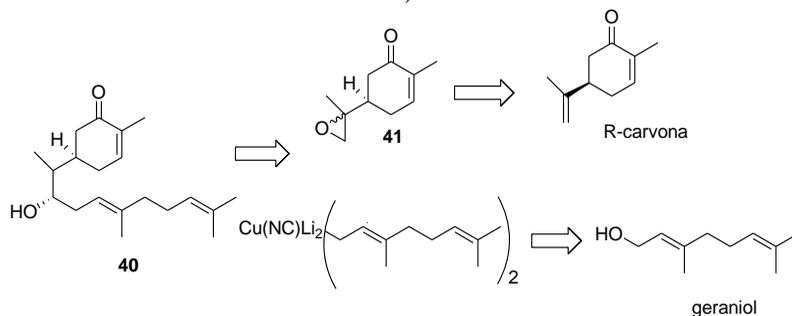


Figura 28 - Retrossíntese do análogo ao constituinte da planta jamaicana (*Croton linearis*).<sup>73</sup>

O epóxi-citronelol (**42**) é utilizado na obtenção de um biopolímero com estrutura esférica e altamente ramificada. E essas características atraem muita atenção do ponto de vista da nanotecnologia porque as suas unidades terminais numerosas podem ser convertidas em vários grupos funcionais formando nanomateriais enovelados.<sup>74</sup> (**Figura 29**)

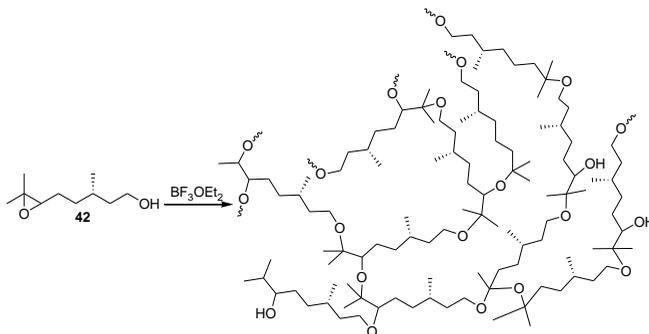


Figura 29 - Síntese de um biopolímero utilizando epóxi-citronelol como monômero.<sup>74</sup>

Portanto, considerando a importância e o uso dos epóxidos, neste trabalho será dada ênfase à obtenção de derivados do citronelol e  $\beta$ -cariofileno, *via* síntese quimio-enzimática utilizando diversas lipases e agentes oxidantes na presença de solventes orgânicos puros e/ou em misturas com LIs derivados de 1-butil-3-metil-imidazólio.

## 1.7 OBJETIVOS

### 1.7.1 Objetivo Geral

Utilizar lipases e micélio como biocatalisadores em reações de peridrólise de ácidos carboxílicos para a formação de seus respectivos perácidos, e a utilização destes na oxidação *in situ* do citronelol e  $\beta$ -cariofileno.

### 1.7.2 Objetivos Específicos

- Preparar e caracterizar os epóxidos derivados do citronelol e do  $\beta$ -cariofileno por métodos não enzimático (p. ex. por oxidação com *m*-CPBA) e comparar com os obtidos pelo método enzimático.

- Isolar, purificar e caracterizar os epóxidos obtidos, através de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ ) e cromatografia gasosa (CG).
- Monitorar as reações através de RMN de  $^1\text{H}$  para o citrionelol e CG para o  $\beta$ -cariofileno.
- Preparar epóxidos derivados do citrionelol e  $\beta$ -cariofileno pelo método quimio-enzimático utilizando lipases comerciais (ex. PS-C Amano I, PS Amano SD, F-AP15, CALB), nativas (LAN, LRO) e micélios oriundos da região amazônica ( exs. UEA\_01, UEA\_06, UEA\_07).
- Verificar a pureza dos produtos por cromatografia de camada delgada.
- Analisar o efeito do tempo e temperatura, nas reações de epoxidação quimio-enzimática observando a formação dos produtos derivados do citrionelol e do  $\beta$ -cariofileno.
- Averiguar a influência do doador peróxido uréia peróxido hidrogênio (UPH) ou peróxido de hidrogênio aquoso ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 30%) e de doadores de acila (ácidos hexanóico, octanóico, decanóico, 2-bromopentanóico e 2-etil-hexanóico, entre outros).
- Avaliar o efeito do solvente orgânico (exs. acetonitrila, *n*-hexano, diclorometano etc.) nessas reações, incluindo os LIs derivados do 1-butil-3-metilimidazólio [BMIm][X] onde X=  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{PF}_6^-$ ,  $\text{SCN}^-$  ou  $\text{Cl}^-$ .
- Comparar os resultados obtidos com os dados reportados na literatura para sistemas similares.

## 2 PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 MATERIAIS

Os reagentes utilizados neste trabalho foram:

- **Acros Organics:** citronelol (95%);
- **Carlo Herba:** acetona (99,5%);
- **Chemis:** éter etílico (98%);
- **F. Maia:** tetrahidrofurano (99%);
- **Fluka:** Líquidos iônicos: (LIs) tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIm][BF<sub>4</sub>] (97%), cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIm][Cl] (99%), hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIm][PF<sub>6</sub>] (96%), tiocianato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIm][SCN] (97%), e os ácidos decanóico (C10) (98%) e tetradecanóico (C14) (98%);
- **Grupo Química:** acetato de etila (99,8%), N,N-dimetilformamida (99%), dimetilsulfóxido (99%);
- **Sigma-Aldrich:**  $\beta$ -cariofileno (80%), ácidos hexanóico (C6) (99,5%), 2-bromo pentanóico (99%), 2-bromo hexanóico (97%), 2-bromo hexadecanóico (97%) e 2-etil hexanóico (99%), uréia peróxido de hidrogênio UPH (determinada percentagem de 30% em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), tetrametil silano (TMS), clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>);
- **Synth:** diclorometano (99,5%), metanol (99,5%), *n*-hexano (98,5%);
- **Tedia:** éter *t*-butil metílico (MTBE) (99,9%);
- **Vetec:** acetonitrila (99,5%), clorofórmio (99,8%), etanol (99,5%); *t*-butanol (99%) ácidos octanóico (C8) (99,5%), dodecanóico (C12) (98%) e hexadecanóico (C16) (98%), peróxido de hidrogênio aquoso (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% percentual dado como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>% em massa de água), sílica gel 60 (0,04-0,063 mm) (230-400 mesh) para cromatografia em coluna, sílica gel 60G para cromatografia em camada fina (700-800 mesh);
- **Novozymes:** lipases de *Candida antarctica* B (CAL-B, Novozym 435, 10.000 PLU/g<sup>1</sup> imobilizada em resina de poliacrilato),

---

<sup>1</sup> PLU é uma unidade relacionada à síntese de ésteres, expressa em unidades de laurato de propila por grama, mas a reação utilizada para determinação de sua atividade é omitida na ficha técnica. ([www.novozym.com](http://www.novozym.com)).

*Rhizomucor miehei* (Lipozyme IM RM, 5-6 BAUN/g<sup>2</sup>) e *Mucor miehei* (Lipozyme IM, 5-6 BAUN/g);

- **Amano:** lipases de *Burkholderia cepacia* (PS-C Amano I, 1638 U/g<sup>3</sup>; PS Amano SD, 23.000 U/g; PS Amano - 30.000 U/g; PS Amano IM, 500 U/g; PS-C Amano II, 1.000 U/g); *Rhizopus oryzae* (F-AP15, 150 u/mg<sup>4</sup>); *Candida rugosa* (AY Amano 30, 30.000 u/g<sup>5</sup>); *Pseudomonas fluorescens* (AK, 25.000 U/g), *Aspergillus niger* (A Amano 12, 120.000u/g) e de *Mucor javanicus* (M Amano 10, 10.000 u/g).

Foram também usados micélios oriundos de fungos isolados de plantas amazônicas (micélios UEA\_01, UEA\_06, UEA\_07, UEA\_23, UEA\_27, UEA\_28, UEA\_41, UEA\_53 e UEA\_115). Estes foram caracterizados e gentilmente fornecidos pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Patricia Zanotto do Laboratório de Bioorgânica da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus-AM.<sup>20</sup>

As três lipases nativas de *A. niger* (LAN 18,2 U/mL<sup>6</sup>), *Rhizopus oligosporus*, (LRO 14,9 U/mL) e de *Mucor hiemalis* (lipase 32 26,4 U/mL), foram isoladas a partir de micro-organismos de solo da região Brandão Bueno (MG, Brasil) e doadas pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia O. Carvalho (USF-Bragança Paulista-SP).<sup>21</sup>

## 2.2 EQUIPAMENTOS

As reações foram realizadas em um agitador orbital (Certomat MO), acoplado a um banho termostaticado MQBTZ99-20 (Microquímica). Foram usadas também balanças analíticas (Sartorius basic/Marte A500/AND Ek-200i) e um rota- evaporador (Buchi 461 water bath).

Os reagentes e produtos foram caracterizados por técnicas espectrométricas (RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C). Os espectros foram obtidos em um

---

<sup>2</sup> BAUN/g é atividade baseada na acidólise de óleo de girassol rico em ácido oléico, empregando ácido decanóico. A velocidade da reação é determinada pela medida da quantidade de ácido decanóico incorporada às posições 1 e 3 dos triacilgliceróis do óleo de girassol.

<sup>3</sup> U/g é a quantidade necessária para liberar 1,0 μmol/min de acetato de 1-feniletila a partir da transesterificação do álcool 1-feniletílico com acetato de vinila a 25 °C.

<sup>4</sup> u/mg sólido é quantidade necessária para liberar 1,0 μmol/h de ácidos graxos de um triacilglicerol, a pH 7,2 e 37 °C.

<sup>5</sup> u/g é a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol/min de ácidos graxos do óleo de oliva, a pH 7,0 e 30°C.

<sup>6</sup> U/mL é a quantidade de lipase que produz 1,0 μmol/min de ácidos graxos na hidrólise do óleo de oliva, a pH 6,0 e 40 °C, em 1 h.

espectrômetro da Varian (400MHz e 100 MHz, respectivamente), utilizando como referência interna o tetrametilsilano (TMS,  $\delta = 0,00$  ppm). O solvente usado foi o  $\text{CDCl}_3$ .

As amostras das reações foram analisados por cromatografia gasosa (CG Agilent Tecnologia 7820 A) equipado com um detector de ionização de chama (FID). As análises foram realizadas em uma coluna polar (Shimadzu CPB-5-M25-025m), com um programa de temperatura da coluna 80-250 °C (10 °C/ min). O injetor e detector foram definidos como 280 °C e 290 °C, respectivamente. A taxa de fluxo de gás de hidrogênio foi 7mL/min, utilizando 1  $\mu\text{L}$  de amostra.

## 2.3 PREPARAÇÃO DOS PADRÕES

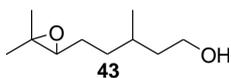
### 2.3.1 Preparação dos epóxidos do citrônolol e do $\beta$ -cariofileno via não enzimática

Os epóxidos derivados do citrônolol e  $\beta$ -cariofileno usados como padrões foram obtidos utilizando 1,5 mmol dos substratos (citrônolol ou  $\beta$ -cariofileno), 430,0 mg (2,5 mmol) de ácido *m*-cloroperbenzóico (*m*-CPBA), 150,0 mg (1,5 mmol) de  $\text{KHCO}_3$  e 20 mL de diclorometano.

O meio reacional foi mantido em refluxo por um período de 12 h. A formação do produto foi monitorada por CCD usando a mistura de *n*-hexano:acetato de etila (9:1 ou 7:3 v/v) como eluente. Ao final da reação, a mistura foi resfriada e o *m*-CPBA foi extraído com solução aquosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (3 x 20 mL). A fase orgânica foi evaporada e os produtos foram obtidos como óleos. Estes compostos foram usados como padrões nas análises de RMN de  $^1\text{H}$  e CG para comparação com os produtos obtidos nas reações pelo método enzimático.

Os dados espectrométricos do epóxido do citrônolol foram comparados com a literatura e estão descritos a seguir.<sup>75,76</sup>

#### 3,7-dimetil-6,7-epóxi-1-octanol (**43**)



$\text{C}_{10} \text{H}_{20} \text{O}_2$

172,26 g/mol

**Rend.** 85%

**RMN de  $^1\text{H}$ :**  $\delta$  (ppm) 3,70 (m, 2H), 2,70 (t, 7,2 Hz, 1H), 2,02 (s, 1H), 1,60-1,40 (m, 7 H), 1,30 (s, 3H) 1,27 (s, 3H), 0,98 (d, 6,4 Hz, 3H).

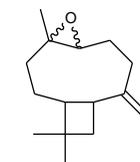
**RMN de  $^{13}\text{C}$ :**  $\delta$  (ppm) 64,5 ,60,2, 58,4, 41,0, 34,3, 29,7, 24,9, 22,5, 19,2.

**CG:** t.r.: 5,14 min.

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

Os epóxidos **44** e **45** derivados do  $\beta$ -cariofileno foram preparados, purificados e isolados, usando as condições descritas acima por Thiago B. Bitencourt.<sup>77</sup> Os dados espectrométricos também foram comparados com os da literatura.<sup>76,78</sup>

#### 4, 12, 12-trimetil-9-metileno-5-oxatriciclo[8.2.0.04,6] dodecano (**44**)



**44**  
C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O  
220,18 g/mol

**Rend.** 50%

**RMN de <sup>1</sup>H:**  $\delta$  (ppm) 4,97 (s, 1H), 4,85 (1H), 2,91(q, 10,4 Hz, 1H), 2,58 (d, 9,2 Hz, 1H), 2,36 (m, 1H) 2,15 (q, 4,4 Hz, 1H), 2,11 (m, 2H) 1,80-1,55(m, 5H), 1,34-1,29 (m, 5H) 0,95 (m, 6H)

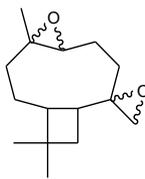
**RMN de <sup>13</sup>C:**  $\delta$  (ppm) 62,0, 59,0, 58,0, 56,0,

49,0, 47,0, 39,0, 35,0, 33,0, 31,0, 30,0, 27,0, 25,0, 22,0, 16,0.

**CG:** t.r.: 8,5 min.

**Rf.:** 0,44 hexano/acetato etila 7:3 (v/v)

#### 4,12,12-trimetil-espiro[5-oxatriciclo[8.2.0.04,6]dodecan-9-2'oxirano] (**45**)



**45**  
C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>  
236,18 g/mol

**Rend.** 38%

**RMN <sup>1</sup>H:**  $\delta$  (ppm) 3,08, (q, 4,8 Hz, 1H), 2,99 (d, 2,4 Hz, 1H), 2,89 (q, 4,8 Hz, 1H), 2,67 (t, 3,6 Hz, 2H), 2,57 (d, 5,2 Hz 1H), 2,34 (m, 1H), 2,22-2,06, (m, 5H), 2,01 (s, 1H), 1,81-1,41 (m, 5H), 1,29 (s, 3H), 0,94 (s, 3H).

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

**CG:** t.r.: 11,0 min.

**Rf.:** 0,57 hexano/acetato etila 7:3 (v/v)

### 2.3.2. Preparação do éster epóxido do citronelol (**47**)

Inicialmente, foi preparado e caracterizado o octanoato de citronefla (**46**). Em um erlenmeyer de 125 mL, foram adicionados 0,72 mL (4,0 mmol) de citronelol, 0,64 mL (4,0 mmol) de ácido octanóico, 50 mg de CAL-B e 10 mL de acetonitrila. A reação foi mantida sob agitação em um agitador orbital (150 rpm) a 25 °C por 24 h. A seguir, a enzima foi separada por filtração e o solvente foi evaporado no rota-evaporador.

O produto, octanoato de citroneíla (**46**), foi isolado e caracterizado por RMN de  $^1\text{H}$ . A pureza foi confirmada por CCD, usando como eluente *n*-hexano:acetato de etila 9:1 (v/v). **Rf.**: 0,77.

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 5,01 (t, 1H), 4,04 (t, 2H), 2,21 (t, 2H), 1,60-1,36 (m, 15H), 1,30-1,00 (m, 11H), 0,81 (s, 3H).

A seguir, em outro erlenmeyer de 125 mL, foram adicionados 0,63 mL (2,0 mmol) do octanoato de citroneíla, 0,32 mL (2,0 mmol) do ácido octanóico 470 mg (5,0 mmol) UPH, 20 mg de CAL-B e 10 mL de acetonitrila. A reação foi mantida sob agitação em um agitador orbital (150 rpm) a 25 °C por 24 h. A seguir, a enzima foi lavada e separada por filtração, e o solvente foi evaporado no rota-evaporador. Foi obtido um óleo de cor palha e este foi purificado em uma coluna de sílica pequena usando como eluente uma mistura de *n*-hexano:acetato de etila 90:10 v/v (**Figura 30**).

O produto foi então caracterizado por, RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e a pureza foi confirmada por CG e CCD (**Rf**=0,48). Os dados espectrométricos de RMN $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , estão discutidos a seguir.

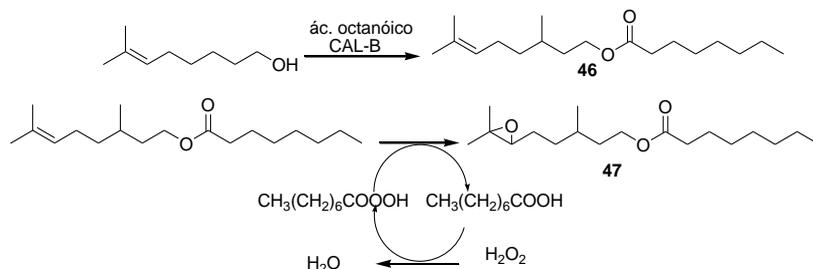
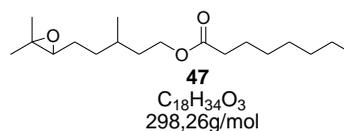


Figura 30 - Preparação do éster epóxido citroneíla (octanoato de 3,7-dimetil-6,7-epóxi-octila) (**47**).

#### Octanoato de 3,7-dimetil-6,7-epóxi –octila (**47**)



**Rend.:** 54%

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 4,11 (t, 7,2 Hz, 2H), 2,70 (t, 6,4 Hz, 1H), 2,29 (t, 7,2 Hz, 2H), 1,60-1,36 (m, 15H), 1,30-1,00 (m, 11H), 0,88 (s, 3H).

**RMN  $^{13}\text{C}$** :  $\delta$  (ppm) 174,0, 64,5, 62,5, 58,4, 35,3, 34,0, 33,4, 31,6, 29,7, 28,9, 26,3, 24,9, 22,5, 19,2, 14,0

**CG:** t.r: 13,95 min.

**Rf.:** 0,48 hexano/acetato etila 7:3 (v/v)

## 2.4 EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DOS TERPENOS

### 2.4.1 Citronelol

Em uma reação típica, em um erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 0,36 mL (2,0 mmol) de citronelol, 0,32 mL (2,0 mmol) de ácido octanóico, 470 mg (5,0 mmol) de UPH e 20 mg de CAL-B em 10 mL de acetonitrila. A reação foi mantida sob agitação constante em um agitador orbital (150 rpm) a 25 °C por 24 h. (**Figura 31**)

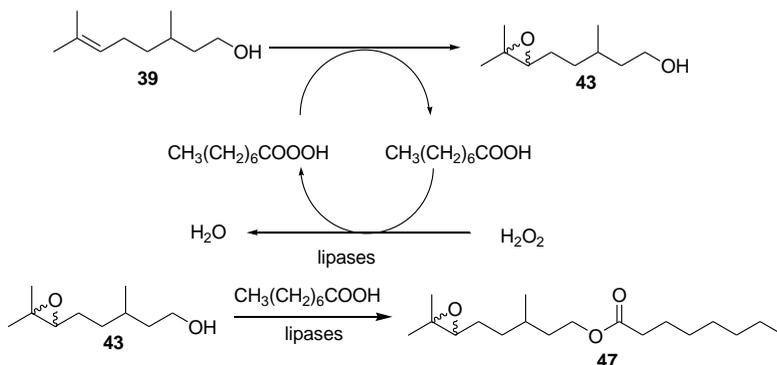


Figura 31 - Epoxidação químio-enzimática do citronelol.

Foram retiradas alíquotas em intervalos de tempo especificados, e a seguir a CAL-B e UPH foram filtradas. A UPH foi separada da lipase por lavagens sucessivas com água, e o biocatalisador foi lavado cinco vezes com o solvente orgânico utilizado na reação. A acetonitrila foi evaporada em um rota-evaporador sob pressão reduzida (2 Torr) a 50 °C obtendo-se um óleo incolor. A seguir foram determinadas as conversões aos produtos.

Em alguns estudos realizados, as conversões aos produtos obtidos na epoxidação do citronelol foram determinadas através da comparação da área relativa do tripleto centrado em 2,70 ppm, o que está relacionado com o hidrogênio do anel oxirano com a do tripleto em 5,06 ppm, que é característico do hidrogênio da ligação dupla do citronelol.

Em outros estudos, nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foi também observado um tripleto em aproximadamente 4,04 ppm que é atribuído aos hidrogênios metilênicos ligados ao grupo éster. Assim, as conversões foram determinadas através da comparação das áreas relativas dos hidrogênios metilênicos do **43** e do **47**.

Na tentativa de minimizar os erros nos valores de conversão, foram realizados testes para verificar o tempo de relaxamento de todos os hidrogênios. As análises foram obtidas em tempos diferentes (1-10 segundos), sendo que todos os hidrogênios apresentaram os mesmos tempos de relaxação, garantindo assim uma maior confiabilidade nos valores obtidos. Além disso, alguns estudos foram realizados em triplicata para maior confiabilidade dos dados.

Na ausência dos biocatalisadores ou agente oxidante (UPH ou  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%) e sob condições experimentais similares, não foi observado a formação dos produtos **43** e **47**.

Foram avaliados vários parâmetros para esta reação, incluindo a influência de diversos biocatalisadores (lipases), tempo, tipo de agente oxidante, doador de acila, temperatura e do meio orgânico incluindo os LIs. Os detalhes experimentais para cada um destes estudos serão apresentados e discutidos nos resultados e discussão.

Para a obtenção dos produtos puros, o óleo foi purificado usando uma coluna de sílica pequena e eluído com uma mistura de *n*-hexano: acetato de etila 90:10 v/v para separação dos produtos. O produtos **43** e **47** foram isolados e caracterizados por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ . Estes valores foram comparados com os padrões e com os dados da literatura.<sup>75,76</sup>

### 2.4.2 $\beta$ -cariofileno

Em uma reação típica de epoxidação quimio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno, foram utilizados 0,6 mL (2,5 mmol) do substrato, 50 mg de lipase ou 100 mg de micélios, 1,2 mL peróxido de hidrogênio aquoso 30%, 0,16 mL (1,0 mmol) do ácido octanóico em 10mL de diclorometano. A reação foi mantida sob agitação em um agitador (150 rpm) a 25 °C por 24 h (**Figura 32**).

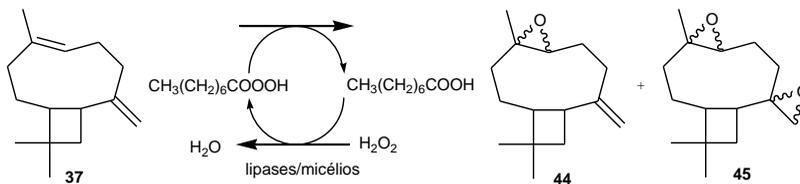


Figura 32- Epoxidação quimio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno.

As reações foram monitoradas por CCD e CG, onde se detectou a formação dos mono- e di-epóxidos. As porcentagens de conversão aos produtos foram determinadas através da razão das áreas dos picos dos reagentes e produtos obtidos por CG, de acordo com a **Equação 1**.

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

Foram realizados diversos estudos para esta reação, incluindo a influência de diversos biocatalisadores (lipases e micélios), tempo, quantidade e tipo de agente oxidante, reutilização da lipase, doador de acila, temperatura e do meio orgânico. Os detalhes experimentais para cada um destes estudos serão apresentados e discutidos nos resultados e discussão.

Foram realizados experimentos controle, ou seja na ausência dos biocatalisadores e do agente oxidante em condições similares às descritas para a reação típica. Para este substrato, também não foi detectada a formação de produtos.

Para a obtenção dos produtos puros, após o término da reação, a mistura reacional foi lavada com uma solução saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e purificada por coluna cromatográfica utilizando como eluente uma mistura de *n*-hexano:acetato de etila (7:3 v/v). Os produtos foram caracterizados por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e comparados com os dados obtidos na literatura.<sup>77,78</sup>

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

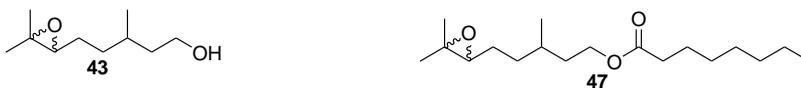
Nesse trabalho é relatado a epoxidação quimio-enzimática dos terpenos citrionelol e  $\beta$ -cariofileno, bem como a influência de algumas condições experimentais, tais como o uso de lipases de diferentes fontes, agentes oxidantes ( $H_2O_{2(aq)}$  ou UPH), tempo de reação, tipo de doador de acila, temperatura e meio orgânico na formação dos produtos.

Os produtos obtidos nas reações quimio-enzimáticas, foram quantificados por RMN de  $^1H$  e CG e os dados foram comparados com os padrões. Esses padrões foram sintetizados por métodos químicos (**43**, **44**, **45**) e enzimático (**47**), e caracterizados por técnicas espectrométricas de RMN de  $^1H$  e de  $^{13}C$  e por CG.

Inicialmente serão apresentados e discutidos os resultados obtidos na epoxidação do citrionelol.

#### 3.1 EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DO CITRIONELOL

A epoxidação quimio-enzimática do citrionelol pode formar dois produtos, o epóxido do citrionelol **43** e o éster epóxido do citrionelol **47** quando o doador de acila é o ácido octanóico (**Figura 31**, p. 32). Um dos principais objetivos deste trabalho é analisar quais parâmetros influenciam na formação dos produtos e quais são fundamentais para a obtenção de um único produto com alto grau de conversão. Nesse sentido, várias condições experimentais foram avaliadas e serão discutidas a seguir.



##### 3.1.1 Avaliação do uso de diferentes lipases

Numa primeira abordagem, 13 lipases comercialmente disponíveis e 3 nativas foram selecionadas para verificar a eficiência de cada uma delas na epoxidação quimio-enzimática de citrionelol. O ácido octanóico foi selecionado como o doador de acila e acetonitrila como solvente orgânico, baseado em trabalhos anteriores, nos quais essas condições foram utilizadas com sucesso na epoxidação quimio-enzimática de (+)-3-careno.<sup>50</sup>

A **Tabela 3** apresenta as porcentagens de conversão aos produtos obtidos na epoxidação do citrionelol.

Tabela 3 - Avaliação do uso de diferentes lipases na epoxidação quimio-enzimática do citrônolol<sup>a</sup>.

| Entrada | Lipase         | Atividade    | Conversão (%) <sup>b</sup> |    |
|---------|----------------|--------------|----------------------------|----|
|         |                |              | 43                         | 47 |
| 1       | CAL-B          | 10.000 PLU/g | 70                         | 30 |
| 2       | PS-C Amano I   | 1638 U/g     | 0                          | 3  |
| 3       | F-AP15         | 150 u/mg     | 0                          | 3  |
| 4       | PS-C Amano SD  | 23.000 U/g   | 2                          | 7  |
| 5       | PS Amano       | 30.000 U/g   | 4                          | 6  |
| 6       | AY Amano 30    | 30.000 u/g   | 0                          | 4  |
| 7       | PS Amano IM    | 500 U/g      | 0                          | 0  |
| 8       | M Amano 10     | 10.000 u/g   | 0                          | 0  |
| 9       | AK Amano 20    | 25.000 U/g   | 2                          | 2  |
| 10      | PS-C Amano II  | 1.000 U/g    | 5                          | 6  |
| 11      | A Amano 12     | 120000u/g    | 0                          | 0  |
| 12      | Lipozyme RM IM | 5-6 BAUN/g   | 5                          | 7  |
| 13      | Lipozyme IM    | 5-6 BAUN/g   | 0                          | 0  |
| 14      | Lipase 32      | 26,4 U/mL    | 0                          | 0  |
| 15      | LRO            | 14.9 U/mL    | 0                          | 0  |
| 16      | LAN            | 18.2 U/mL    | 8                          | 6  |

(a) citrônolol (2,0 mmol) ac. octanóico (2,0 mmol), UPH (5,0 mmol), lipase (20 mg), acetonitrila (10 mL), t.a. 150 rpm.

(b) determinada por RMN de <sup>1</sup>H.

Os produtos **43** e **47** não foram detectados ao usar as lipases M Amano 10, PS Amano IM, Lipozyme IM, Amano 12, lipase 32 e LRO. Com as lipases PS-C Amano I, F-AP15 e AY Amano 30, apenas o produto **47** foi detectado, com conversão menor que 5%. Utilizando as lipases PS Amano SD, PS Amano, AK Amano 20, PS-C Amano II,

LAN e RM Lipozyme IM ambos os produtos **43** e **47** foram formados, mas as conversões foram < 10%. As maiores conversões em **43** e **47** foram obtidas nas reações catalisadas pela CAL-B, sendo de 70% e 30%, respectivamente.

Foram realizados estudos complementares com as lipases FAP 15, Amano I, PS Amano, utilizando 200 U (atividade equivalente a 20 mg de CAL-B). O único resultado diferente dos apresentados na **Tabela 3** foi o obtido com a lipase Amano I, sendo que os produtos **43** e **47** foram obtidos com conversões de 26 e 3% respectivamente, após 24 h de reação.

Os resultados obtidos mostraram a importância de avaliar diferentes fontes de biocatalisadores para cada substrato, Considerando os resultados obtidos acima, a CAL-B foi selecionada para os estudos seguintes, visto que um dos objetivos é avaliar quais são as melhores condições para formação de apenas um único produto, ou seja **43** ou **47**. No próximo estudo foi avaliado a influência do tempo de reação.

### 3.1.2 Influência do tempo de reação

Neste estudo, as condições experimentais usadas foram as mesmas descritas no estudo anterior, sendo que a CAL-B foi o biocatalisador usado para a obtenção do peróxi-ácido (ácido peroxi-octanóico) *in situ*.

Foram retiradas alíquotas da reação da epoxidação do citronelol e analisadas depois de 2, 4, 6, 8 e 10 h. Os valores de conversão aos produtos **43** e **47** estão apresentados na **Figura 33**, bem como os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , na região de 2,40-5,30 ppm obtidos em diferentes tempos.

Em 2 h de reação o epóxido **43** foi obtido com conversão de 21%. A porcentagem de conversão do substrato ao produto foi aumentando com o tempo sendo que em 8 h a conversão em **43** foi de 85%.

Após 10 h, o pico em 5,50 ppm, que corresponde ao hidrogênio da ligação dupla do álcool, não foi mais observado. Nesse mesmo tempo, foi detectado um tripleto em aproximadamente 4,05 ppm, o qual é atribuído aos hidrogênios metilênicos correspondentes ao epóxido éster do citronelol **47**. Este composto pode ser formado a partir da reação do epóxido do citronelol **43** com ácido octanóico. Este último é regenerado a partir do ácido peroxi-octanóico na presença de lipase, como mostrado na **Figura 31**, p. 32.

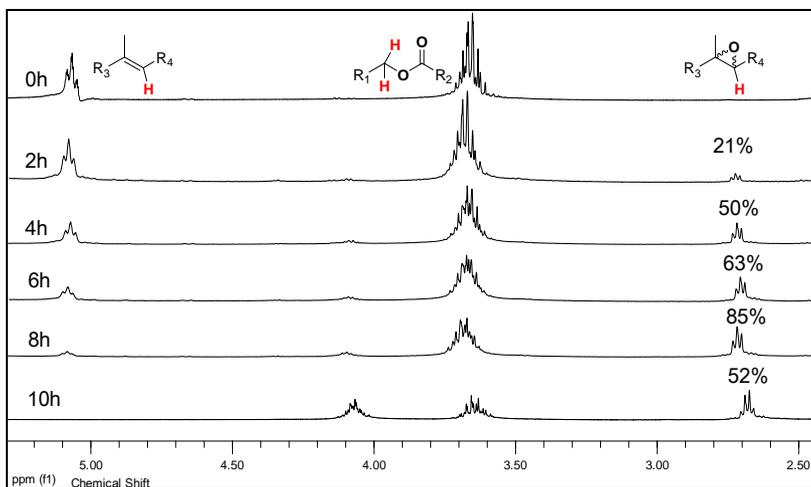


Figura 33 - Espectros de RMN de <sup>1</sup>H mostrando a influência do tempo na epoxidação quimio-enzimática do citronelol. Condições de reação: citronelol (2,0 mmol), ácido octanóico (2,0 mmol), UPH (5,0 mmol), CAL-B (20 mg), acetonitrila (10 mL), t.a., a 150 rpm. R<sub>1</sub> = C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>O, R<sub>2</sub>=C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>, R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>=C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>O.

Como mencionado anteriormente, após 24 h de reação os produtos **43** e **47** foram obtidos em graus de conversão de 70 e 30%, respectivamente (resultados apresentados na **Figura 34**). Estes dados mostram que dependendo do tempo de reação, ambos os produtos podem ser obtidos em conversões de moderadas a boas.

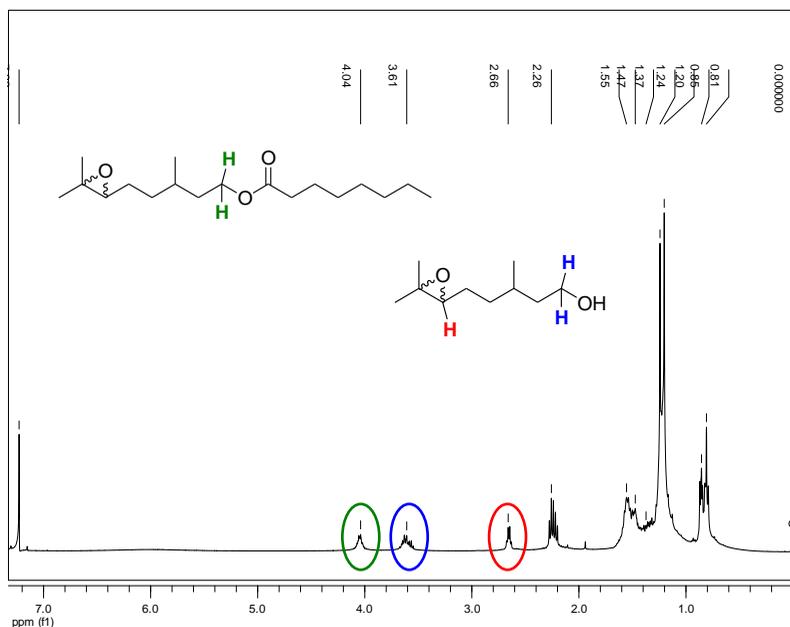


Figura 34 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de uma alíquota da reação de epoxidação quimio-enzimática do citronelol. Condições de reação: citronelol (2,0 mmol), ácido octanóico (2,0 mmol), UPH (5,0 mmol), CAL-B (200 U), acetonitrila (10 mL), temp.  $\sim 25^\circ\text{C}$ , a 150 rpm em 24h. Conv: 70% em 43 e 30% 47.

### 3.1.3 Influência da quantidade e do tipo do agente oxidante

Como descrito na literatura, o agente oxidante é importante na primeira etapa da reação quimio-enzimática, que é a formação de peróxi-ácido. Além do tipo, a quantidade de peróxido de hidrogênio presente no meio reacional também pode influenciar nesta reação.<sup>49,55-57</sup>

Inicialmente foi avaliada a influência da quantidade de UPH 0,1-10,0 mmol na epoxidação quimio-enzimática do citronelol. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 35**.

Observa-se na **Figura 35** que com o aumento da quantidade de UPH 0,5-5,0 mmol houve um aumento na conversão ao epóxido **43** (10-76%) e ao éster epóxido **47** (14-33%). Vale ressaltar que ao utilizar 0,5 mmol ou quantidade menor de UPH obteve-se também o octanoato de citroneila (**46**), além dos produtos **43** e **47**. Estes resultados são esperados, considerando que a UPH é necessária para formar o ácido peroxi-octanóico para ser utilizado na reação de epoxidação. Quando a

reação foi realizada na ausência de UPH, o octanoato de citronefla foi obtido como produto único. Os dados espectrométricos de RMN de  $^1\text{H}$  foram concordantes com o padrão **46**.

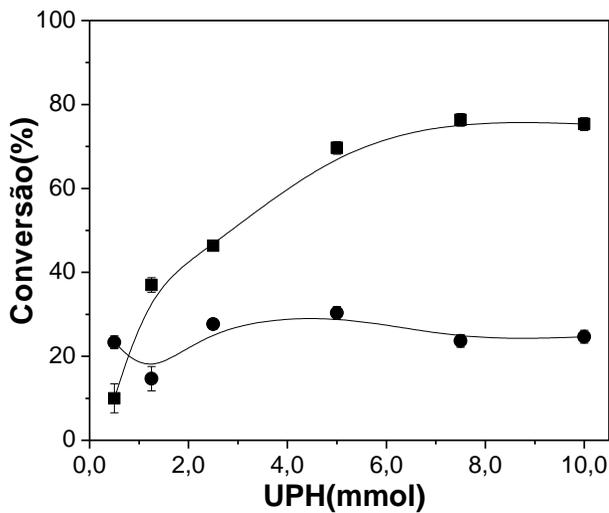


Figura 35- Influência da quantidade de UPH na epoxidação quimio-enzimática de citrionelol para a formação do epóxido (■) e éster-epóxido (●). Condições de reação, como na Figura 33, exceto para UPH (0,1-10,0 mmol), 24 h.

Acima de 5,0 mmol de UPH, não foram observadas alterações significativas na conversão para ambos os produtos.

Experimentos semelhantes foram realizados nas mesmas condições de reação, mas com 5,0 mmols de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (v/v) como agente oxidante. Os resultados foram semelhantes aos obtidos anteriormente com a UPH, e ambos os produtos **43** e **47** foram obtidos com conversões de 69% e 30%, respectivamente após 24 h.

Nesse sentido, como com ambos oxidantes UPH e  $\text{H}_2\text{O}_2$  os resultados foram semelhantes, optou-se por utilizar a UPH pois como citado anteriormente, com o uso deste reagente evita-se a necessidade de adicionar peróxido de hidrogênio aquoso lentamente à reação. Outras vantagens de se utilizar este reagente anidro incluem uma manipulação mais segura e a minimização de hidrólise indesejada dos produtos oxidados, devido a ausência de água.<sup>49</sup>

A seguir, foi avaliada a influência do comprimento da cadeia alquílica de diferentes ácidos carboxílicos lineares (C6-C16) na

formação dos correspondentes peroxi-ácidos e posterior epoxidação do citronelol.

### 3.1.4 Influência da quantidade e tipo de doador de acila

Está bem descrito na literatura que uma das primeiras etapas das reações catalisadas por lipases é a formação do intermediário “acil-enzima” (Etapa 2, **Figura 8**, p. 9). Faber explicou essa influência através do modelo de encaixe induzido para a ação da enzima e em termos da energia de ligação, que é liberada quando um substrato se liga ao sítio ativo.<sup>10</sup>

Assim, espera-se observar uma certa dependência do comprimento da cadeia dos ácidos graxos nesta reação. Utilizou-se UPH como agente oxidante e CAL-B como biocatalisador. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 36**.

Além dos ácidos carboxílicos de cadeia linear, foram também utilizados ácidos 2-bromo- e o 2-etil-hexanóico para verificar efeitos da força do ácido bem como o estereo, devido à presença de um grupo mais volumoso próximo à carboxila.

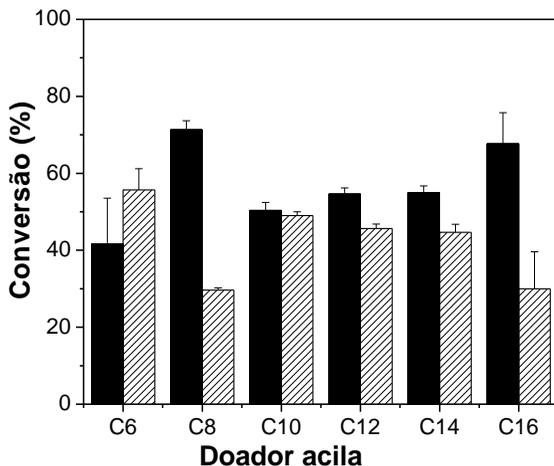


Figura 36- Influência da cadeia alquílica do doador de acila na epoxidação quimio-enzimática do citronelol para a formação de 43 ■ e éster epóxido correspondente ▨. Condições de reação: como descrito na Figura 33, mas variando o doador acila (2,0 mmol de cada) em 24h.

A **Figura 36** mostra que usando ácidos carboxílicos de cadeias lineares, o grau de conversão ao epóxido **43** aumentou de 41 para 71% com o aumento da cadeia alquílica do ácido carboxílico. O valor mais alto (71%) foi obtido quando o ácido octanóico foi o doador de acila.

Esses resultados podem estar relacionados aos efeitos estéreo em função do tamanho da cadeia alquílica, pois o ambiente natural de atuação das lipases é basicamente a hidrólise de triacilgliceróis com cadeias alquílicas grandes e alifáticas.<sup>10,28</sup>

Resultados semelhantes foram reportados na literatura para a epoxidação quimio-enzimática do 3(+)-careno e  $\alpha$ -pineno, e na obtenção de *N*-alquilaziridinas mediada pela CAL-B.<sup>50,58,79</sup>

Assim, a partir destes resultados, no próximo estudo foi avaliada a influência da quantidade do ácido octanóico (em mmol), e os dados são apresentados na **Figura 37**.

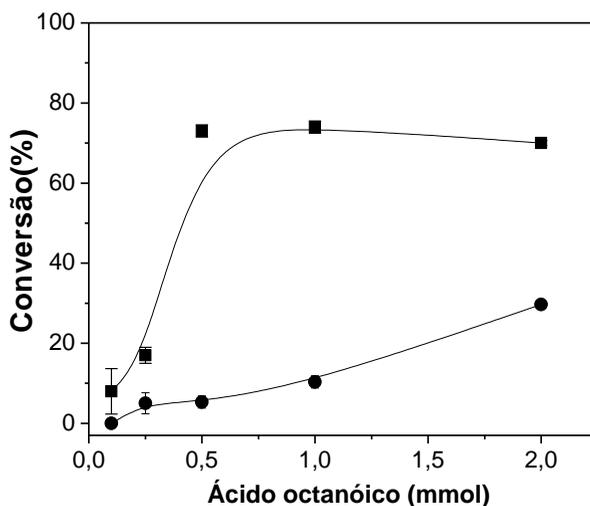


Figura 37 - Influência da quantidade de ácido octanóico na epoxidação quimio-enzimática do citronelol, epóxido (■) e éster-epóxido (●). Condições de reação, como descrito na Figura 33, variando a quantidade de ácido octanóico (0,1-2,0 mmol), em 24 h.

A **Figura 37** mostra que as conversões aos produtos **43** e **47** foram dependentes da quantidade de ácido octanóico utilizado. Observa-se um aumento nas conversões em **43** de 10 a 76% com o aumento a quantidade de ácido octanóico de 0,1 a 0,5 mmol. Com quantidades maiores de agente acilante as conversões permaneceram praticamente

constantes na faixa de 70-74%. Para o produto **47**, observou-se um aumento da conversão 14 a 33% com o aumento da quantidade de ácido octanóico utilizado (0,1 - 0,5 mmol).

Esses resultados destacam a importância de usar uma quantidade adequada de doador de acila para formar o correspondente peroxi-ácido, que é utilizado nesta reação de epoxidação. Resultados similares, ou seja, os que mostram a dependência da quantidade de doador de acila, foram relatados para a epoxidação do  $\alpha$ -pineno.<sup>58</sup>

No próximo estudo, foi avaliado o uso dos ácidos apresentando cadeia alquílica(alifática) com bromo como substituinte na posição 2 e 2-etil-hexanóico para formar os peroxi-ácidos correspondentes.

Quando os ácidos 2-bromopentanóico, 2-bromo-hexanóico e 2-bromo-hexadecanóico foram usados e independentemente do comprimento da cadeia alquílica, apenas o éster correspondente derivado do citrionelol foi formado com conversões modestas de 32, 34, e 20%, respectivamente. Os produtos **43** e/ou o éster-epóxido correspondente, não foram detectados indicando que não houve a formação do peroxi-ácido na presença destes reagentes.

Na reação com o ácido 2-etil-hexanóico, também não foi detectada a formação de **43**, do éster epóxido ou éster correspondentes.

Este resultado está de acordo com os apresentados por Hollmann e col.. Eles avaliaram a atividade da CAL-B nas reações de esterificação do ácido valérico com metilas nas posições  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - com octan-1-ol. A atividade da enzima apresentou grande dependência em função da posição das metilas. Quando foram utilizados os ácidos  $\alpha$ - e  $\beta$ -substituídos, as conversões aos produtos foram baixas, pois postula-se que os substituintes  $\alpha$ - e  $\beta$ - dificultam a a ligação adequada do substrato no sítio ativo.<sup>80</sup>

Outro fator importante discutido neste trabalho foi a relação da atividade da CAL-B com o pKa do ácido carboxílico, ou seja, quanto maior a acidez menor a atividade da lipase. Ácido com valores baixos de pKa (<4,8) podem protonar o glutamato ou aspartato no sítio ativo da CAL-B. Caso um desses resíduos seja protonado, não poderá atuar de forma adequada na tríade catalítica para ativar a Ser105 (via His224) para o ataque nucleofílico, portanto a atividade lipase fica diminuindo em ácidos fortes.

Esse efeito pode também ser observado na presença de ácidos carboxílicos 2-bromados. O efeito retirador de elétrons dos halogênios já está bem relatado na literatura.<sup>40,48</sup>

Assim, com o aumento da acidez dos ácidos ( por ex. ácido 2-bromo hexanóico pKa 2,90), foi observado apenas a formação do

correspondentes ésteres (ver Tabela de valores de pKa de alguns ácidos carboxílicos no **Anexo 6**, pg 110).

### 3.1.5 Influência da Temperatura

Outro fator importante que afeta a velocidade de uma reação catalisada por enzimas é a temperatura. A temperatura pode influenciar na atividade, seletividade e estabilidade do biocatalisador, bem como no equilíbrio da reação.<sup>81</sup>

Para avaliar esse efeito, ou seja a influência da temperatura na epoxidação quimio-enzimática de citronelol as reações estudadas foram realizadas em temperaturas na faixa de 15-40 °C, e os resultados são apresentados na **Figura 38**.

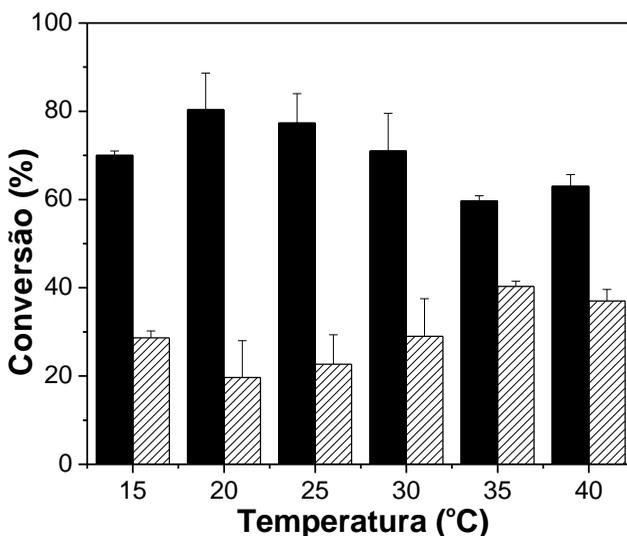


Figura 38 - Influência da temperatura na formação dos produtos **43** ■ e **47** ▨. Condições de reação, como na Figura 33, mas variando a temperatura, 24 h.

Neste intervalo de temperatura, ambos os produtos **43** e **47** foram detectados. As maiores conversões em epóxido **43** foram de 80% e 77%, a 20 e 25 °C, respectivamente. Na faixa de 30-40 °C, a conversão diminuiu para o produto **43** (71-63%) e aumentou para o **47** (23-37%). É provável que em temperaturas mais altas ocorra alguma decomposição

da UPH e, assim, a formação do correspondente peroxi-ácido também diminuiu, formando o produto **43** em menores conversões.

A maioria dos pesquisadores que avaliaram a epoxidação de alcenos, obtiveram os melhores resultados em temperatura ambiente ou entre 20-40 °C. Em temperaturas mais elevadas, a energia de desnaturação supera a energia de ativação para catálise enzimática, tornando o processo de desnaturação da enzima mais rápido. As porcentagens nas conversões foram também dependentes da posição da ligação dupla (interna ou terminal) do alceno.<sup>56-58</sup>

A partir destes resultados, optou-se por realizar as reações em temperatura ambiente (~25 °C) para avaliar o efeito do solvente orgânico na reação de epoxidação quimio-enzimática do citronelol.

### 3.1.6. Efeitos do solvente orgânico

No próximo estudo, foi avaliada a influência do meio orgânico na epoxidação do citronelol. Está bem estabelecido na literatura que a atividade da enzima é fortemente afetada pelo solvente orgânico.<sup>82-84</sup>

O log  $P$  é definido como o logaritmo do coeficiente de partição do solvente no sistema octanol/água, e é o parâmetro mais usado para classificar os solventes para as reações biocatalisadas. É geralmente considerado que os solventes com log  $P > 4,00$  (não polares) são os mais eficientes nas reações biocatalisadas. Os solventes com log  $P$  entre 2,00 e 4,00 são moderadamente eficazes e os polares com log  $P < 2,00$  muitas vezes não são adequados para estas reações.<sup>82</sup>

A **Tabela 4** mostra os dados das conversões aos produtos **43** e **47** obtidos em diferentes solventes orgânicos.

A **Tabela 4** mostra que os graus de conversão em epóxido **43** ou éster- epóxido **47** foram dependentes da polaridade do solvente orgânico e do tempo de reação.

Usando *n*-hexano ou clorofórmio, após 8 h de reação os produtos **43** e **47** foram formados com conversão de 19 - 45 e 19 - 38%, respectivamente (**Tabela 4**, entradas 1, 2). Usando 2-metil propan-2-ol, MTBE, éter etílico ou metanol nenhum produto foi detectado, independentemente do tempo de reação.

O acetato de etila pode ser utilizado como solvente e como doador acila. Nesse caso foram realizadas duas reações, uma utilizando acetato de etila como solvente e doador acila, e outra adicionando o doador acila (ácido octanóico). Em 8 h, na presença ou ausência do ác. octanóico, **43** foi formado como único produto, com conversões de 19, e 23% respectivamente (**Tabela 4**, entradas 7 e 8).

Tabela 4 - Efeito do solvente orgânico na epoxidação quimio-enzimática do citronelol<sup>a</sup>

| Entrada | Solvente (log <i>P</i> <sup>c</sup> )   | Conversão (%) <sup>b</sup> |    |     |    |
|---------|---|----------------------------|----|-----|----|
|         |   | 8h                         |    | 24h |    |
|         |   | 43                         | 47 | 43  | 47 |
| 1       | <i>n</i> -Hexano (3,50)                 | 19                         | 38 | 24  | 42 |
| 2       | Clorofórmio (2,00)                      | 45                         | 19 | >99 | 0  |
| 3       | 2-metil proan-2-ol<br>(1,45)            | 0                          | 0  | 0   | 0  |
| 4       | MTBE (1,43)                             | 0                          | 0  | 0   | 0  |
| 5       | Diclorometano<br>(0,93)                 | 68                         | 0  | >99 | 0  |
| 6       | Éter etílico (0,85)                     | 0                          | 0  | 0   | 0  |
| 7       | Acetato de etila<br>(0,68)              | 23                         | 0  | 50  | 49 |
| 8       | Acetato de etila <sup>d</sup><br>(0,68) | 19                         | 0  | 32  | 0  |
| 9       | Etanol (- 0,24)                         | 4                          | 0  | 23  | 13 |
| 10      | Acetonitrila (-0,33)                    | 85                         | 0  | >99 | 0  |

(a) Condições reacionais: **Figura 33** em 24 h.(b) Determinada por RMN de <sup>1</sup>H

(c) Referência 82

(d) Sem doador de acila

Com a utilização de diclorometano, acetonitrila e etanol, o epóxido **43** também foi formado como um produto único, com porcentagens de 68, 85 e 4%, respectivamente, em 8 h de reação. No entanto, após 24 h de reação, e utilizando acetonitrila ambos os produtos **43** e **47** foram obtidos, com conversões de 75 e 25%. Quando diclorometano ou clorofórmio foram utilizados o epóxido **43** foi obtido com conversão >99%, após 24 h mostrando a alta seletividade do processo (**Tabela 4**, entradas 5,10).

No entanto, esses dados mostram que não houve relação linear entre o grau de conversão e a polaridade do solvente (expresso em valores de  $\log P$ ). Outros trabalhos relatados na literatura mostram que o solvente pode afetar a formação dos produtos nas reações catalisadas por enzimas, mas sem ter correlação direta com o  $\log P$ .<sup>18,85,86</sup>

Recentemente, o uso de lipases, em líquidos iônicos (LIs) tem demonstrado muitas vantagens tais como altas taxas de conversão, enantiosseletividade elevada, melhor estabilidade da enzima, e capacidade de reciclagem. Os LIs em reações enzimáticas podem atuar como um reservatório para o substrato e produtos, e em muitos casos diminui a inibição do substrato e do produto pela água e/ou por outros solventes orgânicos. Além disso, eles podem formar ligações de hidrogênio fortes que estabilizam as interações enzima-substrato.<sup>52,53,54</sup>

Assim, para avaliar a influência dos LIs na epoxidação químio-enzimática do citronelol, foram escolhidos três solventes (*n*-hexano, éter *t*-butil metílico e clorofórmio) com polaridades diferentes e que apresentaram resultados diferenciados nos valores de conversão aos produtos **43** e **47**.

Esses solventes foram usados em uma mistura solvente:líquidos iônicos (LIs) (9:1 v/v) com LIs derivados do 1-butil-3-metil-imidazólio [BMIm] [X], onde X = BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, SCN<sup>-</sup> ou Cl<sup>-</sup>.

Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 5**.

Ao utilizar misturas de solventes orgânicos e LIs os dados obtidos foram bastante interessante, e na maioria dos casos foram também dependentes tanto do solvente orgânico quanto do ânion do líquido iônico.

Na presença dos LIs, o citronelol não foi totalmente consumido. Quando foram utilizadas as misturas de clorofórmio/[BMIm] [X], onde X = BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, SCN<sup>-</sup> ou Cl<sup>-</sup> (9:1 v/v), não houve conversão para os produtos de **43** ou **47** (resultados não mostrados na **Tabela 5**).

Ao usar o líquido iônico mais hidrofóbico [BMIm] [PF<sub>6</sub>], em mistura com *n*-hexano e clorofórmio, o epóxido **43** e o éster-epóxido **47** foram obtidos em conversões moderadas de 20 e 33% em 24 h (**Tabela 5**, entradas 3 e 4). Neste caso, foi observado um efeito negativo em comparação com o uso dos solventes orgânicos puros, onde o óxido de citronelol **43** foi seletivamente obtido com conversão >99% em clorofórmio.

Tabela 5 - Influência dos LIs na epoxidação quimio-enzimática do citrionelol<sup>a</sup>.

| Entrada | Solvente/LI <sup>c</sup>                  | Conversão (%) <sup>b</sup> |    |     |    |
|---------|---|----------------------------|----|-----|----|
|         |   | 8h                         |    | 24h |    |
|         |   | 43                         | 47 | 43  | 47 |
| 1       | <i>n</i> -Hexano/[BMIm][BF <sub>4</sub> ] | 5                          | 14 | 31  | 28 |
| 2       | <i>n</i> -Hexano/[BMIm][Cl]               | 6                          | 40 | 18  | 69 |
| 3       | <i>n</i> -Hexano/[BMIm][PF <sub>6</sub> ] | 19                         | 49 | 20  | 75 |
| 4       | Clorofórmio/[BMIm][PF <sub>6</sub> ]      | 0                          | 0  | 33  | 26 |
| 5       | MTBE/[BMIm][Cl]                           | 0                          | 0  | 38  | 53 |
| 6       | MTBE/[BMIm][PF <sub>6</sub> ]             | 31                         | 49 | 31  | 51 |

(a) Condições reacionais da **Figura 33** em 24h.

(b) Determinada por RMN de <sup>1</sup>H

(c) Solvente/LI (9:1 v/v).

Utilizando misturas de MTBE/[BMIm] [X], onde X = BF<sub>4</sub><sup>-</sup> ou SCN<sup>-</sup> (9:1 v/v), os produtos **43** ou **47** não foram formados, e esses resultados são semelhantes aos obtidos com o solvente orgânico puro (resultados não apresentados nas **Tabela 4 e 5**).

No entanto, com o uso do MTBE/[BMIm][X], onde X = Cl<sup>-</sup> ou PF<sub>6</sub><sup>-</sup> (9:1 v/v), e dependendo do tempo de reação, ambos os produtos foram formados em conversões moderadas (31-53%). Usando estas misturas, a presença de LIs teve um efeito positivo sobre a reação. Um fato interessante é que nestas condições a formação do produto **47** foi favorecida em relação ao **43** (**Tabela 5**, entradas 5,6).

Ao usar misturas com *n*-hexano/[BMIm] [X], onde X = BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, ou PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, os resultados foram em alguns casos melhores do que os obtidos no presença do solvente orgânico puro (ver **Tabela 4**, entrada 1). Quando a mistura de *n*-hexano/[BMIm][SCN] foi usada, não houve a formação dos produtos **43** ou **47**, mostrando uma forte influência negativa deste LI na epoxidação quimio-enzimática de citrionelol (resultados não mostrados na **Tabela 5**).

Usando a mistura de *n*-hexano/[BMIm][BF<sub>4</sub>], os produtos **43** e **47** foram detectados em quantidades moderadas, dependendo do tempo

de reação. Após 24 h, as conversões foram de 31 e 24%, respectivamente.

Melhores resultados foram obtidos quando misturas de *n*-hexano/[BMIm][Cl] e *n*-hexano/[BMIm][PF<sub>6</sub>] foram utilizadas, mostrando também a influência da natureza dos ânions nos LIs. O éster epóxi **47** foi formado em graus de conversão mais elevados (69 e 75%, respectivamente) do que o obtido usando o solvente orgânico puro (**Tabela 4**, entrada 1).

O [BMIm][PF<sub>6</sub>] é considerado um dos LIs mais apolares e, portanto, mais adequado para o uso em catálise enzimática.<sup>53,54</sup> Recentemente, a epoxidação de oleato de metila mediada por LIs foi descrita, e os melhores resultados foram também obtidos na presença de [BMIm][PF<sub>6</sub>] e/ou [BMIm][NTf<sub>2</sub>].<sup>46</sup>

Em resumo, os dados aqui relatados demonstram que o meio orgânico é um dos parâmetros experimentais mais importantes na epoxidação quimio-enzimática de citronelol. Esses dados estão publicados na revista *Process Biochem.*, 47, 517-522, **2012**.

### 3.2 EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DO $\beta$ -CARIOFILENO

O  $\beta$ -cariofileno é um substrato muito interessante devido a 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. Essas ligações duplas possuem reatividades diferentes, possibilitando assim a formação do mono-epóxido (**44**) e/ou di-epóxido (**45**).

A **Figura 39** mostra o cromatograma do  $\beta$ -cariofileno e dos produtos isolados na reação de epoxidação quimio-enzimática.

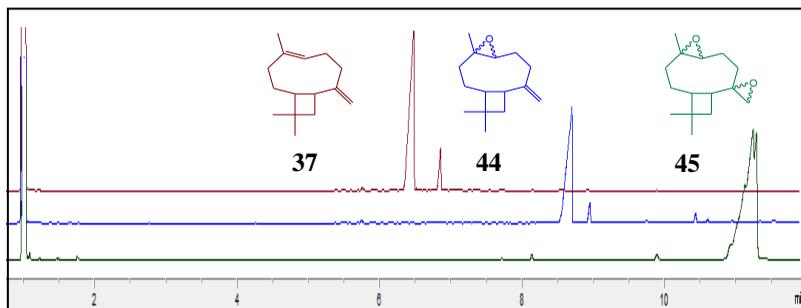


Figura 39- Cromatograma do reagente e produtos isolados da epoxidação quimio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno (  $t_R$  37 = 6,5,  $t_R$  44 = 8,5,  $t_R$  45 = 11,0 min). (Condições de análise: descritas no item 3.2, p. 28).

### 3.2.1. Avaliação do uso de diferentes lipases e micélios

Inicialmente, as mesmas lipases testadas na epoxidação quimio-enzimática do citrionelol foram usadas na obtenção de epóxidos derivados do  $\beta$ -cariofileno. Os resultados de conversão aos produtos **44** e **45** estão apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6 – Avaliação de diferentes lipases na epoxidação quimio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno<sup>a</sup>

| Entrada | Lipases           | Atividade       | Conversão (%) <sup>b</sup> |     |
|---------|-------------------|-----------------|----------------------------|-----|
|         |                   |                 | 44                         | 45  |
| 1       | CAL-B             | 10.000<br>PLU/g | 0                          | >99 |
| 2       | PS-C Amano I      | 1638 U/g        | 17                         | 0   |
| 3       | F-API15           | 150 u/mg        | 16                         | 0   |
| 4       | PS-C Amano<br>SD  | 23.000 U/g      | 16                         | 0   |
| 5       | PS Amano          | 30.000 U/g      | 16                         | 0   |
| 6       | AY Amano 30       | 30.000 u/g      | 23                         | 0   |
| 7       | PS Amano IM       | 500 U/g         | 17                         | 0   |
| 8       | M Amano 10        | 10.000 u/g      | 23                         | 0   |
| 9       | AK Amano 20       | 25.000 U/g      | 25                         | 0   |
| 10      | PS-C Amano II     | 1.000 U/g       | 25                         | 0   |
| 11      | A Amano 12        | 120.000u/g      | 27                         | 0   |
| 12      | Lipozyme RM<br>IM | 5-6 BAUN/g      | 24                         | 0   |
| 13      | Lipozyme IM       | 5-6 BAUN/g      | 26                         | 0   |
| 14      | LRO               | 14.9 U/mL       | 23                         | 0   |
| 15      | LAN               | 18.2 U/mL       | 20                         | 0   |
| 16      | Lipase 32         | 26,4 U/mL       | 0                          | 0   |

(a)  $\beta$ -cariofileno (2,5 mmol), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5,0 mmol, 30%), ác. octanóico (1,0 mmol), lipase (50 mg), diclorometano (10 mL), t.a., 150 rpm, 24 h.

(b) Determinada por CG.

Nestas reações obteve-se apenas o produto **44** ao utilizar a maioria das lipases. Utilizando 50 mg das lipases comerciais, os graus de conversão foram moderados, sendo de 16 a 27% (**Tabela 6**, entradas 2-13).

Resultados semelhantes foram obtidos com o uso das lipases não comerciais oriundas da região de Minas Gerais, LAN (20%) e LRO (23%). Embora os dados obtidos com estas lipases tenham sido moderados, estes foram similares aos obtidos com as enzimas comerciais. Outras condições reacionais podem ser avaliadas visando obter maiores conversões aos produtos **44** e/ou **45**.

Porém, ao usar a CAL-B, o di-epóxido **45** foi obtido como produto único e com conversão >99% em 24 h de reação.

A seguir, foram realizadas as reações de epoxidação do  $\beta$ -cariofileno utilizando micélios da região amazônica. A identificação dos fungos está apresentada no **Anexo 9**, pg 77 Neste estudo avaliou-se também a influência do tempo. Os resultados são apresentados na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Conversão (%) do  $\beta$ -cariofileno em mono-epóxido **44**.<sup>a</sup>

| Entrada | Micélio | Conversão (%) <sup>b</sup> |     |      |      |
|---------|---------|----------------------------|-----|------|------|
|         |         | 24h                        | 72h | 120h | 168h |
| 1       | UEA_01  | 14                         | 38  | 43   | 49   |
| 2       | UEA_06  | 16                         | 49  | 59   | 64   |
| 3       | UEA_07  | 13                         | 38  | 37   | 40   |
| 4       | UEA_23  | 8                          | 47  | 49   | 55   |
| 5       | UEA_27  | 2                          | 2   | 8    | 9    |
| 6       | UEA_28  | 11                         | 42  | 40   | 45   |
| 7       | UEA_41  | 10                         | 44  | 47   | 48   |
| 8       | UEA_53  | 21                         | 34  | 41   | 41   |
| 9       | UEA_115 | 15                         | 29  | 40   | 46   |

(a) Condições reacionais:  $\beta$ -cariofileno (2,5 mmol), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5,0 mmol), ac. octanóico (1,0 mmol), micélio (100 mg), diclorometano (10mL), 150 rpm, t. a. (~25°C).

(b) Determinada por CG.

Em todas as reações catalisadas por micélios, obteve-se o mono-epóxido **44** como produto único. Com 24 h de reação, os graus de conversão foram de 2-21%. Ao utilizar os micélios UEA\_06 UEA\_53, os resultados foram semelhantes aos obtidos com lipases comerciais, sendo de 16 e 21% e as conversões aumentaram com o tempo. Depois de 168 h, a maior conversão foi obtida utilizando os micélios UEA\_06

(64%), seguido por UEA\_23 (55%), UEA\_01 (49%) e UEA\_41 (48%). Assim como com as lipases nativas, os resultados obtidos com os micélios mostraram que esses biocatalisadores têm um grande potencial de uso em reações de epoxidação. Para obter maiores conversões aos produtos, outros parâmetros também precisam ser avaliados, tais como a temperatura e massa do micélio.

Considerando a eficiência da CAL-B, a seguir fez-se o estudo do tempo para verificar a formação do mono e/ou di-epóxido derivados do  $\beta$ -cariofileno.

### 3.2.2. Influência do tempo de reação

Foram realizados dois estudos com relação ao tempo de reação, um utilizando UPH e em outro com  $H_2O_{2(aq)}$  como agentes oxidantes. Os resultados obtidos são apresentados nas **Figuras 40 e 41**. As conversões foram determinadas por CG.

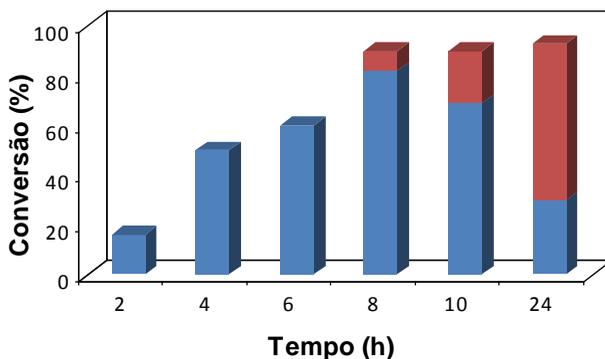


Figura 40– Influência do tempo na epoxidação quimio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno. Condições de reação:  $\beta$ -cariofileno (2,5 mmol), UPH (5,0 mmol), ác. octanóico (1,0 mmol), CAL-B (50 mg), diclorometano (10 mL), t.a., mono-epóxido (■) e di-epóxido (■).

Ao utilizar UPH como agente oxidante o mono-epóxido foi obtido como único produto até 6 h de reação. Após 8 h obtém-se o mono-epóxido com conversão de 82% e di-epóxido com 8%. Em 24 h, o di-epóxido foi formado com 63% e mono-epóxido com 27%.

A seguir, serão apresentados na **Figura 41** os resultados obtidos com  $H_2O_{2(aq)}$ .

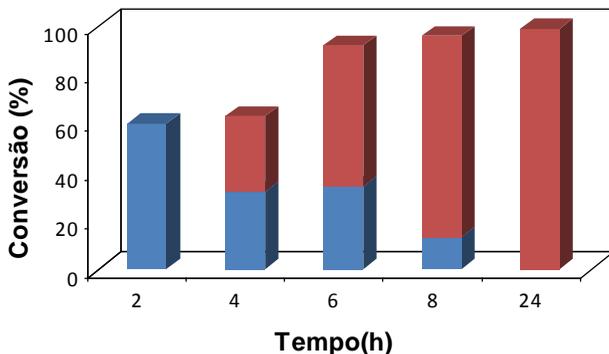


Figura 41 – Influência do tempo na epoxidação quimio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno. Condições de reação:  $\beta$ -cariofileno (2,5 mmol),  $H_2O_2$  (5,0 mmol), ác. octanóico (1,0 mmol), CAL-B (50 mg), diclorometano (10 mL), t.a., mono-epóxido (■) e di-epóxido (■).

Utilizando  $H_2O_2$  aquoso em 2 h de reação, obteve-se o mono-epóxido **44** com 60% de conversão. Após 4 h o mono-epóxido e o di-epóxido foram formados com a mesma conversão sendo 31% cada. Em 24 h, o di-epóxido é o produto majoritário, sendo formado com conversão >99%.

A formação dos produtos **44** e **45** foi dependente do tempo, e a partir destas informações é possível estabelecer o que é o mais adequado para a obtenção de apenas um deles em quantidade majoritária.

Outro fato que deve ser considerado nestes resultados é que o tipo de agente oxidante pode influenciar na formação dos produtos. Os dados mostraram que, em geral, a formação do mono-epóxido é favorecida na presença de UPH, pois este reagente libera de forma mais controlada o oxidante. Para completar esses resultados avaliou-se a influência da quantidade e do tipo de agente oxidante.

### 3.2.3. Influência da quantidade, tipo de oxidante e a reutilização da CAL-B

A **Figura 42** apresenta dados obtidos na epoxidação quimio-enzimática do cariofileno com UPH como agente oxidante.

Pode-se observar que com o aumento da quantidade de UPH, a porcentagem de conversão ao mono-epóxido aumentou até 3,0 mmol, obtendo-se o produto com 96% de conversão. A partir desta quantidade de UPH os dois produtos foram formados, e a partir de 5,0 mmol o di-epóxido foi obtido com a maior porcentagem de conversão (87-96%).

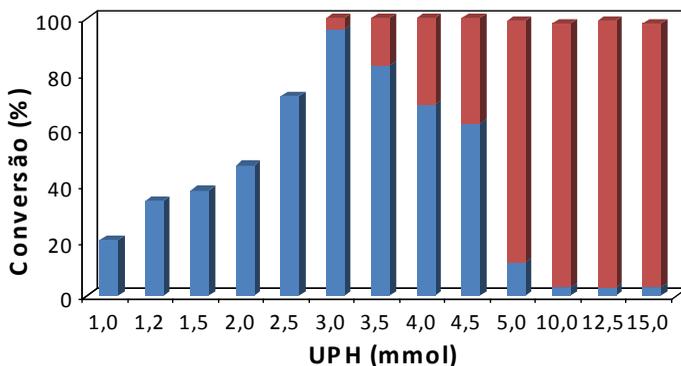


Figura 42 - Influência da quantidade de UPH na epoxidação quimio-enzimática de  $\beta$ -cariofileno para a formação do mono- $\blacksquare$  e di-epóxido  $\blacksquare$ . Condições de reação: como na Figura 40 exceto para UPH (1,0-15,0 mmol), 24 h.

A **Figura 43** mostra os resultados obtidos quando o peróxido de hidrogênio aquoso foi utilizado como agente oxidante

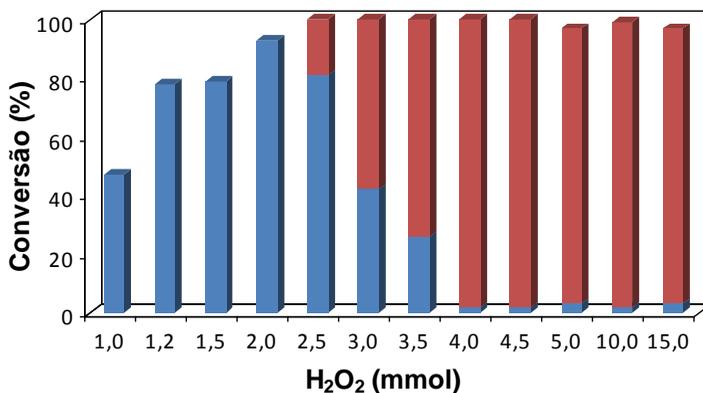


Figura 43 - Influência da quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na epoxidação quimio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno para a formação do mono- $\blacksquare$  e di-epóxido $\blacksquare$ . Condições de reação: como na Figura 41 exceto para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,0-15,0 mmol), 24 h.

Por ser um oxidante mais energético, com apenas 2,0 mmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% obteve-se o mono-epóxido com 93% de conversão. Com 2,5 mmol os 2 produtos foram formados com conversões de 81-26% (**44**) e 19-74% (**45**). A partir de 4,0 mmol, o di-epóxido foi obtido majoritariamente (94-98%).

Um outro parâmetro importante em reações catalisadas por enzimas é a avaliação da reutilização do biocatalisador, visando diminuir os custos de todo o processo.

A CAL-B tem apresentado resultados satisfatórios no que se refere à reutilização em reações de epoxidação.<sup>49,56</sup>

Assim, a seguir avaliou-se a reutilização da CAL-B na epoxidação químio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno na presença de UPH (3,0 mmol) ou  $H_2O_2$  (2,0 e 4,5 mmol). Estas quantidades de oxidantes foram selecionadas a partir dos experimentos anteriores. Com 3,0 mmol de UPH ou 2,0 mmol de  $H_2O_2$ , obteve-se predominantemente o mono-epóxido com 96 e 93% respectivamente, e com 4,5 mmol de  $H_2O_2$ , o di-epóxido foi obtido com 98% de conversão.

A **Tabela 8** mostra os valores de conversão ao mono e di-epóxido obtidos ao longo de 10 ciclos nas reações de reutilização da CAL-B com diferentes quantidades e tipo de agente oxidante.

Tabela 8 - Porcentagens de conversão aos produtos 44 e 45 na reutilização da CAL-B com diferentes quantidades e agentes oxidantes.<sup>a</sup>

| Usos | Conversão (%) <sup>b</sup> |                   |                   |                   |
|------|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|      | 44                         | 44                | 44                | 45                |
|      | 3,0 mmol UPH               | 2,0 mmol $H_2O_2$ | 4,5 mmol $H_2O_2$ | 4,5 mmol $H_2O_2$ |
| 1    | 96                         | 93                | --                | 98                |
| 2    | 94                         | 97                | --                | 96                |
| 3    | 94                         | 96                | 65                | 0                 |
| 4    | 34                         | 95                | 19                | 0                 |
| 5    | 32                         | 90                | 16                | 0                 |
| 6    | 34                         | 82                | 18                | 0                 |
| 7    | 32                         | 76                | 16                | 0                 |
| 8    | 17                         | 52                | 12                | 0                 |
| 9    | 19                         | 13                | 12                | 0                 |
| 10   | 19                         | 13                | 12                | 0                 |

(a) Condições reacionais: conforme a **Figura 40**, variando o agente oxidante. 2,0 e 4,5 mmol de  $H_2O_2$  e 3,0 mmol de UPH.

(b) Determinada por CG.

Quando as reações foram realizadas com 3,0 mmol de UPH obteve-se o mono-epóxido como produto único com 96% de conversão na primeira reação. As conversões mantiveram-se altas (96-94%) até a terceira utilização da CAL-B. No quarto uso a conversão diminuiu para 34% e manteve-se constante até a sétima utilização. Na oitava vez que a

CAL-B foi utilizada, as conversões diminuíram para 17% e não alteram significativamente até o décimo uso.

Com 2,0 mmol de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o mono-epóxido **44** foi obtido como produto único e com conversão de 93%. Este valor apresentou com pequenas variações (93-90%) até a quinta utilização. A partir do sexto reuso, as conversões diminuíram continuamente até a décima utilização, obtendo-se mono-epóxido **44** com conversão de apenas de 13%.

Nesse estudo, ao utilizar 4,5 mmols de  $\text{H}_2\text{O}_2$  obteve-se o di-epóxido como produto majoritário na primeira e na segunda reutilização. Na terceira utilização, não houve formação do di-epóxido, apenas do mono-epóxido com conversão de 65%, o qual continuou sendo produto majoritário do quarto ao décima reutilização reuso (65-12%).

Como apresentado na **Figura 43**, o peróxido de hidrogênio aquoso foi mais eficiente para este substrato, quando comparado com a mesma quantidade de UPH. Além disso, em baixas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%, a CAL-B pode ser utilizada até 5 vezes.

A seguir para avaliar a influência do doador de acila, temperatura e solvente orgânico, selecionou-se o  $\text{H}_2\text{O}_{2(\text{aq})}$ .

### 3.2.4. Influência do doador de acila

A influência da cadeia do doador acila foi também avaliada na epoxidação do  $\beta$ -cariofileno, considerando que a formação do peroxi-ácido é uma das etapas importantes nesta reação.<sup>10,39</sup>

Foram retiradas alíquotas das reações em 2 e 24 horas. A **Figura 44** mostra os valores de conversão aos produtos **44** e **45** usando doadores de acila com cadeias alquílicas lineares variando de 2 a 16 carbonos em 2 h.

Quando foram utilizados os ácidos acético (C2), hexanóico (C6), decanóico (C10), dodecanóico (C12) e tetradecanóico (C14), ambos os produtos foram formados com conversões de 40-70% para o mono-epóxido e de 0-51% para di-epóxido. Ao usar os ácidos butírico (C4), octanóico (C8) e hexadecanóico (C16) obteve-se apenas o mono-epóxido como produto com destaque para ácido hexadecanóico (C16), onde o mono-epóxido foi obtido com 92%.

Em 24 h, quando utilizou-se ácido acético como doador de acila, ambos os produtos foram obtidos com conversões de 80% ao mono-epóxido e 20% ao di-epóxido. Ao usar os outros doadores de acila de cadeias lineares as conversões foram de >99% para o di-epóxido.

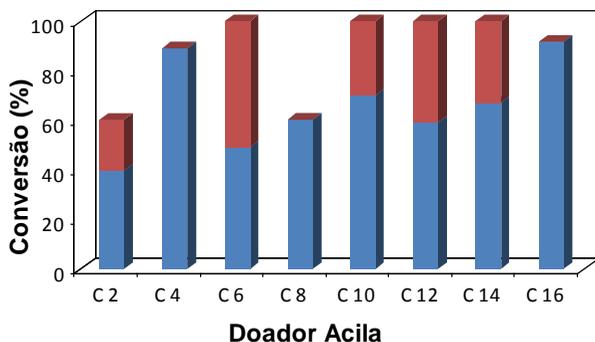


Figura 44 - Influência da cadeia alquílica do doador acila na epoxidação químio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno na formação do mono-epóxido (■) e di-epóxido (■). Condições de reação: como na Figura 41, mas variando o doador de acila (1,0 mmol de cada) em 2 h.

Foram também usados ácidos 2-bromoalquilas ( os mesmos utilizados na epoxidação químio-enzimática do citrônio) e 2-etilhexanóico. Ao utilizar os ácidos bromoalquilas e 2-etil-hexanóico obteve-se apenas o mono-epóxido com valores de conversão de 14-54%, em 24 h. O melhor resultado foi obtido ao usar o ácido 2-etil-hexanóico, sendo de 54% para o mono-epóxido.

Ao usar os ácidos butírico, octanóico, e hexadecanóico os resultados foram interessantes pois em 2 e 24 h obteve-se apenas o mono-epóxido como produto único. Os melhores resultados foram obtidos com o ácido hexadecanóico, entretanto esse composto apresentou certa dificuldade no momento da extração devido à baixa solubilidade na solução aquosa de  $\text{NaHCO}_3$  usada nas lavagens. O ácido octanóico foi um bom doador acila por apresentar maiores conversões que o ácido butírico e a sua utilização já tem sido reportada na literatura.<sup>50</sup>

### 3.2.5. Influência da temperatura

Outro parâmetro a ser avaliado e que é importante nas reações biocatalisadas, é a temperatura. Na epoxidação do  $\beta$ -cariofileno variou-se a temperatura de 15-45 °C, e os dados de conversão aos mono- e di-epóxido estão apresentados na **Figura 45**.

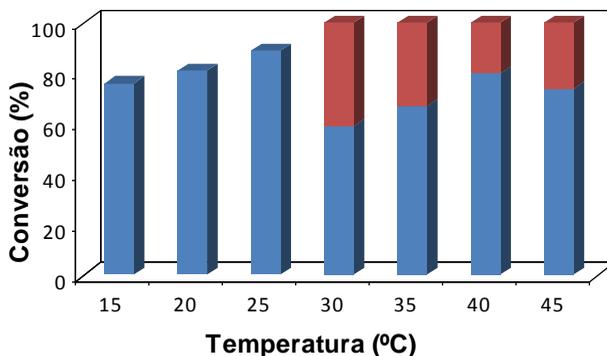


Figura 45 -Influência da temperatura na epoxidação quimio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno. mono-epóxido (■) e di-epóxido (■). Condições de reação: como na Figura 41, mas variando a temperatura (15-45°C) em 2 h.

Como pode ser observado na **Figura 45** ao variar a temperatura (15-45°C) o mono-epóxido foi o produto majoritário (59-81%). Nas temperaturas de 15 a 25 °C o mono-epóxido foi obtido como produto único e as conversões aumentaram de 76 a 89%. A partir de 25 °C, os dois produtos foram formados com conversões de 59-74% para **44** e 20-41% para **45**. Quando as reações foram feitas em 24 h as conversões foram >99% para di-epóxido.

Mesmo que a temperatura não tenha sido um parâmetro seletivo na formação de apenas um único produto, pode-se afirmar que bons resultados também foram obtidos em temperaturas maiores. Este fato, deve-se à alta estabilidade da CAL-B, que por encontrar-se imobilizada torna-se mais robusta dificultando a desnaturação.<sup>36</sup>

### 3.2.6. Efeito do meio orgânico

Conforme discutido na epoxidação do citrionelol, o meio orgânico é um parâmetro importante em reações biocatalisadas. Assim, este efeito foi também avaliado na epoxidação do  $\beta$ -cariofileno. Foram selecionados 16 solventes de diversas polaridades, e os resultados de conversão ao mono- e di-epóxidos, obtidos em 8 e 24 h, estão apresentados na **Tabela 9**.

Tabela 9- Efeito do solvente orgânico na epoxidação quimio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno<sup>a</sup>

| Entrada | Solvente(Log $P^c$ )       | Conversão(%) <sup>b</sup> |     |     |     |
|---------|----------------------------|---------------------------|-----|-----|-----|
|         |                            | 8h                        |     | 24h |     |
|         |                            | 44                        | 45  | 44  | 45  |
| 1       | <i>n</i> -Hexano (3,50)    | >99                       | 0   | >99 | 0   |
| 2       | Ciclo-hexano (3,20)        | >99                       | 0   | 76  | 24  |
| 3       | Tolueno (2,50)             | 0                         | >99 | 0   | >99 |
| 4       | Clorofórmio (2,00)         | 62                        | 38  | 0   | >99 |
| 5       | 2-metil propan-2-ol (1,45) | 59                        | 0   | 64  | 0   |
| 6       | MTBE (1,43)                | >99                       | 0   | 93  | 7   |
| 7       | Diclorometano (0,93)       | 19                        | 81  | 0   | >99 |
| 8       | Éter etílico (0,85)        | 99                        | 0   | 90  | 10  |
| 9       | Acetato de etila (0,68)    | 0                         | >99 | 0   | >99 |
| 10      | THF (0,49)                 | 82                        | 0   | >99 | 0   |
| 11      | Acetona (-0,23)            | >99                       | 0   | 92  | 8   |
| 12      | Etanol (- 0,24)            | 98                        | 0   | >99 | 0   |
| 13      | Acetonitrila (-0,33)       | >99                       | 0   | 29  | 71  |
| 14      | Metanol (-0,76)            | 0                         | 0   | 0   | 0   |
| 15      | DMF (-1,00)                | 7                         | 0   | 22  | 0   |
| 16      | DMSO (-1,30)               | 0                         | 0   | 0   | 0   |

(a) Condições reacionais da **Figura 41** mas variando o solvente

(b) Determinada por CG

(c) Referência 82

Quando clorofórmio e diclorometano foram utilizados, obtiveram-se ambos os produtos em 8 h com conversões de 19-62% para mono- e 38-81% para di-epóxido.

Utilizando *n*-hexano, ciclo-hexano, 2-metil propan-2-ol, MTBE, eter etílico, THF, acetona, etanol, acetonitrila e DMF, obteve-se o mono-epóxido com produto único. Ao usar 2-metil propan-2-ol, THF, etanol e DMF, as conversões foram de 59, 82, 98, e 7% respectivamente (**Tabela 9**, entradas 5, 10, 12 e 15). Ao usar outros solventes as conversões foram >99%. Em tolueno e acetato de etila, o di-epóxido foi obtido como produto único com conversões >99% (**Tabela 9**, entradas 3 e 9).

Em 24 horas de reação, ao utilizar tolueno, clorofórmio, diclorometano e acetato de etila, o di-epóxido foi obtido com conversão >99% (**Tabela 9**, entradas 3,4,7 e 9). Neste mesmo tempo reacional e ao usar *n*-hexano, THF, e etanol, apenas o mono-epóxido foi formado com conversões >99% (**Tabela 9**, entradas 1,10 e 12).

Quando a reação de epoxidação foi feita na presença de ciclo-hexano, MTBE, éter etílico, acetona e acetonitrila, ambos os produtos **44** e **45** foram obtidos, mas com formação predominantemente do mono-epóxido (**Tabela 9**, entradas 2,6,8 e 11). É interessante observar que ao usar acetonitrila, o produto principal formado foi o di-epóxido com 71% (**Tabela 9**, entrada 13).

Ao utilizar um solvente mais polar tal como DMF em 8 e 24h, as conversões ao **44** foram baixas sendo de 7 e 22% respectivamente (**Tabela 9**, entrada 15). Na presença de metanol e DMSO não foi detectada a formação dos produtos (**Tabela 9**, entradas 14 e 16).

Estes resultados são bastante interessantes, e mostram que a escolha do solvente e do tempo pode favorecer a formação seletiva de apenas um dos produtos. Pode-se observar também que para esse substrato houve correlação do  $\log P$  com as porcentagens de conversão aos produtos, sendo que quando utilizados solventes com  $\log P$  maiores as conversões também foram maiores (**Tabela 9**, entradas 1-4), e ao utilizar solventes com  $\log P$  menores as conversões foram baixas (**Tabela 9**, entradas 14,15,16). O acetato de etila apresenta  $\log P$  0,68 considerado baixo, entretanto ele pode ser utilizado como também como doador de acila, favorecendo a epoxidação.

Conforme discutido na epoxidação do citronelol, o meio orgânico é um parâmetro muito importante em reações biocatalisadas. Dependendo do meio, pode-se obter apenas um dos compostos com alta seletividade e conversão.

## 4 CONCLUSÕES

As reações de epoxidação químico-enzimática do citrionelol e  $\beta$ -cariofileno foram realizadas em condições brandas. A formação de 1 ou 2 produtos, para ambos substratos, foi dependente de alguns fatores experimentais tais como a fonte do biocatalisador (em geral lipases); tempo e temperatura da reação, agente oxidante, doador acila e o meio orgânico.

Em geral, na epoxidação do citrionelol observou-se a formação de dois compostos; o epóxido **43** e o éster-epóxido **47**.

Para a obtenção preferencial de **43**, deve-se considerar que:

- A CAL-B foi o biocatalisador mais eficiente (70%);
- O tempo de reação de 8 h e temperatura de 20 °C foram as condições mais adequados (85% e 80%);
- A UPH (5 mmol) foi o melhor agente oxidante (76%);
- O ácido octanóico foi o doador de acila mais eficiente (70%; 2 mmol);
- Os melhores solventes orgânicos foram clorofórmio, diclorometano e acetonitrila (>99%, 24h);
- O éster epóxido **47** foi obtido majoritariamente ao usar misturas de solvente orgânico com LIs. O melhor resultado foi obtido ao usar *n*-hexano/[BMIm][PF<sub>6</sub>] (75%, 24h).

Na reação de epoxidação do  $\beta$ -cariofileno, observou-se também a formação de dois produtos, o mono-epóxido **44** e o di-epóxido **45**.

Para a obtenção majoritária de **44**, deve-se considerar que:

- O micélio UEA\_06 foi o mais eficiente (64%, 168 h);
- Ao utilizar UPH, o tempo mais adequado foi de 8 h (82%);
- Ao utilizar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o tempo mais adequado foi de 2 h (60%);
- A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi o agente oxidante mais eficaz (93%, 2,0 mmol);
- A CAL-B pode ser reutilizada por 5 ciclos em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (93-90 %, 2,0 mmol);
- O melhor doador de acila foi o ácido hexanóico (92%, 2 h);
- A temperatura mais adequada foi de 25°C (89% 2 h);
- Os solventes orgânicos mais eficazes foram *n*-hexano, ciclo-hexano, MTBE, acetona e acetonitrila (>99%, 8 h).

Para a obtenção majoritária de **45** deve-se considerar que:

- A CAL-B foi biocatalisador mais eficiente (>99%);
- Ao utilizar UPH, o tempo mais adequado foi de 24 h ( 63%);
- Ao utilizar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o tempo mais adequado foi de 24 h (>99%); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi o agente oxidante mais eficaz (>99%, 4,0 mmol);
- Os ácidos carboxílicos de cadeias alquílicas lineares (C4-C16) foram bons doadores de acila(>99%, 24h), com exceção do ácido acético;
- Os solventes orgânicos mais adequados foram tolueno, clorofórmio, diclorometano e acetato de etila (>99%, 24h).

A partir destes resultados, verifica-se a grande importância da otimização das condições reacionais em sistemas biocatalíticos. As reações de epoxidação mostraram-se fortemente influenciadas por diversos fatores, com destaque para o agente oxidante, doador de acila e o meio orgânico. Salienta-se também a seletividade do processo, sendo que apenas um dos compostos pode ser obtido dependendo das condições experimentais, sendo portanto uma das vantagens da biocatálise.

## REFERÊNCIAS

1. Cabral J. M. S., Aires-Barros M. R., Gama, M., *Engenharia Enzimática* Lisboa-Porto-Coimbra, Lidel 1ª ed. **2003**.
2. Campbell M. K., Farrel S. O., *Bioquímica* Orlando: Thomson, Combo, 3ª ed. **2007**.
3. Strohmeier G. A., Pichler H., May O., Gruber-Khadjawi M., *Chem. Rev.* 111, 4141–4164, **2011**.
4. Van Armum S. D., *J. Chem. Educ.* 82, 11, 1689-1692, **2005**.
5. De Conti R. M., Porto A. L. M., Rodrigues J. A., Moran P. J. S., Manfio G. P., Marsaioli A. J., *J.Mol. Catal. B: Enzym.* 11, 233-236, **2001**
6. Piovan L., Kagohara E., Ricci L. C., Keppler A. F., Capelari M., Andrade L. H., Comasseto J. V., Porto A. L. M. *Tetrahedron: Asymmetry* 19, 2385-2389, **2008**.
7. Wohlgemuth R., *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 713-724, **2010**.
8. Nelson D. L.; Cox M. M.; *Lehninger: Principles of Biochemistry* USA, Saunders Publishing College, 3ª ed. **2000**.
9. Voet D., Voet J. G., *Biochemistry* - Jonh wiley & Sons Inc. 2ª ed., **1995**.
10. Faber K., *Biotransformations in Organic Chemistry* Berlin: Springer, 1-116, 3ª ed., **1997**.
11. Clark J. H., *Nat. Chem.* 1, 12-13, **2009**.
12. Li C. J., Trost B. M., *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* 105, 13197-13202, **2008**.
13. Wohlgemuth R., *New Biotechnol.* 25, 204-213, **2009**.
14. Fessner W. D., Anthonson T., *Modern Biocatalysis* Weinheim: Wiley-VCH; **2009**.
15. Young I. S., Baran P. S., *Nat. Chem.* 1, 193-205, **2009**.
16. Wender P.A., Miller B. L., *Nature* 460, 197-201, **2009**.
17. Sá M. M., Silveira, G. P., Castilho, M. S., Pavão, F., Oliva, G., *Arkivoc*, 8, 112, **2002**.
18. Sebrão D., Sá M. M., Nascimento M. G., *Process Biochem.* 46, 551–6. **2011**.

19. Savile C. K., Janey J. M., Mundorff E. C., Morre J. C., Tam S., Jarvis W. R., Colbeck JC, Krebber A., Fleitz F. J., *Brands J. Science*, 329, 305-309, **2010**.
20. Zanotto S. P., Romano I. P., Lisboa L. U S., Duvoisin Jr. S., Martins M. K., Lima F.A., Silva S.F., Albuquerque P.M., *J. Braz.Chem. Soc.* 20, 6, 1046-1059, **2009**.
21. Pilissão C., Carvalho O. P., Nascimento M. G, *J. Braz. Chem. Soc.* 21, 973-977, **2010**.
22. Cherif S., Fendri A., Miled N., Trabelsi H., Mejdoub H., Gargouri Y., *Biochimie* 89, 1012-1018, **2007**.
23. Haki G. D., Rakshit, S. K. *Bioresour. Technol.*, 89, 17-34, **2003**.
24. Sharma R., Chisti, Y., Banerjee, U. C. *Biotechnol. Adv.* 19, 627-662, **2001**.
25. Carvalho P. O., Calafatti, S. A., Marassi, M., Da Silva, D. M., Contesini, F. J., Bizaco, R. *Quím. Nova*, 28, 614-621, **2005**.
26. Cygler M., Grochulski P., Kazlauskas K. J., Scharag J. D., Bouthillien F., Rubin B., Sereqi A.N., Gupta A. K., *J. Am. Chem. Soc.* 116, 3180-3186, **1994**.
27. Wong C. H., Whitesides G., *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry* Pergamon 22-25, 12<sup>a</sup> ed., **2002**.
28. Wooley P., Petersen S.B., *Lipases, their Structure, Biochemistry and Application*, Univ. Cambridge, **1994**.
29. Ghanem A., *Tetrahedron* 63, 1721-1754, **2007**.
30. Netto C. G. C. M., Andrade L. H., Toma H. E., *Tetrahedron: Asymmetry* 20, 2299-2304, **2009**.
31. Patil D., Dev B, Nag A., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 73, 5-8, **2011**.
32. Xie W., Wang J., *Biomass Bioener.*, 36, 373-380, **2012**.
33. Zhao H., Song Z., *Biochem. Eng. J.* 49, 113-118, **2010**.
34. <http://www.rcsb.org/pdb> acessado em 7 de janeiro de 2012.
35. Hoegh I., Ptkar S., Halkier T., Hansen M. T., *Can. J. Bot.* 73, S869-S875, **1995**.

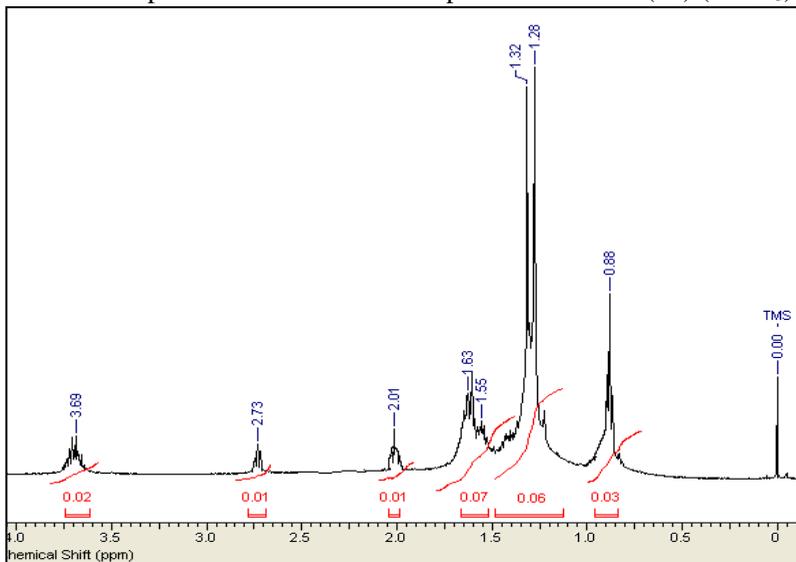
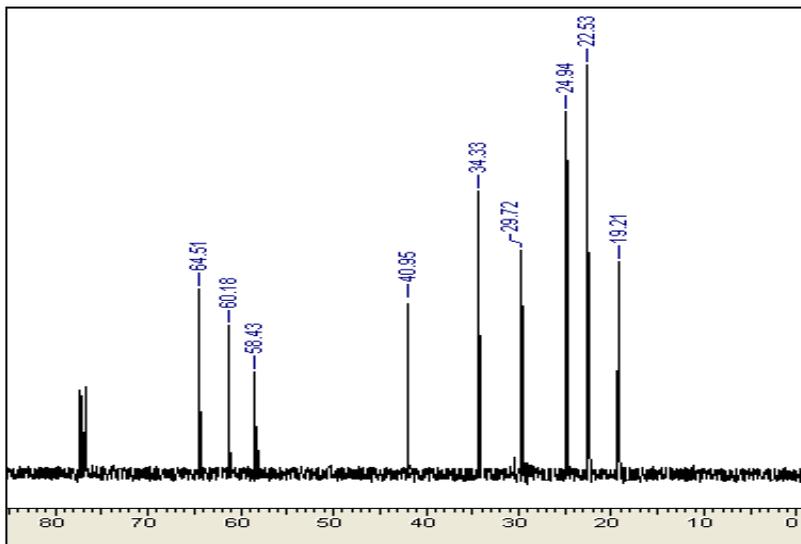
36. (a)Ganesan A., Moore B. D., Kelly S. M., Price N. C., Rolinski O. J., Birch D. J. S., Dunkin I. R., Halling P. J. *Chem. Phys. Chem Special Issue: Biophys.* 10, 1492-1499, **2009**. (b) <http://www.lewatit.com/ion/en/> acessado 23 de novembro de 2011.
37. Laszo J. A., Jackson M., Blanco R. M., *J.Mol. Catal. B: Enzym.* 69, 60-65, **2011**.
38. Joubioux I. L., Maugard T., Achour O., Bridiau N., Graber M., *J.Mol. Catal. B: Enzym.* 70, 108-113, **2011**.
39. Björkling F., Godtfredsen S., EKirk. O., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1301-1303, **1990**.
40. Clayden J., *Organic Chemistry* Oxford: Oxford University Press, **2001**.
41. Smith J. G., *Synthesis* 629, **1984**.
42. Pohlit A. M., Ferraz, H. M. C., *Quím. Nova* 18, 160-170, **1995**.
43. Witnauer L. P., Knight H. B., Palm W. E., Koos R. E., Ault W. C., Swern D., *Ind. Eng. Chem.* 47, 2304-2311, **1955**.
44. Lee Jr. M., LeBlanc R., Dickson J., Brown T., Stewart M., Pati H. N., VanDerveer D., Arman H., Harris J., Pennington W., Holt H. L., *Bioorg. Med. Chem.* 13, 6025-6034, **2005**.
45. Hwang S., Choi C. Y., Lee E. Y., *J. Ind. Engin. Chem.*, 16, 1-6, **2010**.
46. Jorgesen K. A., *Chem. Ver.*, 89, 431, **1989**.
47. Ostovic D., Bruice T.C., *Acc. Chem. Res.* 25, 314, **1992**.
48. McMurry, J. *Organic Chemistry*, Austrália: Books/Cole, 7ª ed., **2008**.
49. Ankudey E. G., Olivo H. F., Peeples T. L., *Green. Chem.* 8, 923-6, **2006**.
50. Moreira M. A., Nascimento M. G., *Catal. Commun.* 8, 2043-74, **2007**.
51. Tufvesson P., Adlercreutz D., Lundmark S., Manea M., Hatti-Kaul R., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 54, 1-6, **2008**.
52. Tziaila A. A., Kalogeris E., Enotiadis A., Taha A. A., Gournis D., Stamatis H., *Mater. Sci. Engin.: B* 165, 173-7, **2009**.
53. Tziaila A. A., Pavlidis I. V., Felicissimo M. P., Rudolf P., Gournis D., Stamatis H., *Biores. Technol.* 101, 1587-1594, **2010**.

54. Silva W. S. D., Lapis A. A. M., Suarez P. A. Z., Neto B. A. D., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 68, 98-103, **2011**.
55. Björkling F., Frykman H., Godtfredsen S.E., Kirk O., *Tetrahedron* 48, 4587-92, **1992**.
56. Warwel S., Klaas M. R., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 1, 29-35, **1995**.
57. Yadav G. D., Manjula Devi K., *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* 78, 347-51, **2001**.
58. Skouridou V., Stamatis H., Kolisis F. N., *Biocatal. Biotransform.* 21, 285-90, **2003**.
59. Schneider R.C.S., Lara L.R.S., Bitencourt T.B., Nascimento M.G., Nunes M.R.S., *J. Braz. Chem. Soc.* 20,1473-77, **2009**.
60. Kotlewska A. J., van Rantwijk F., Sheldon R.A., Arends I.W..C..E., *Green Chem.* 13, 2154–2160, **2011**.
61. van Rantwijk F, Sheldon R. A., *Chem. Rev.* 107, 2757-85, **2007**.
62. Moniruzzaman M., Nakashima K., Kamiya N., Goto M., *Biochem. Engin. J.* 48, 295-314, **2010**.
63. Li K., Luo H., Ying T., *Mat. Sci. Semicond. Process*, 14, 184-187, **2011**.
64. Chrobok A., Baj S., Pudło W., Jarzębski A., *Appl. Catal. A: General.*, 389,179-185, **2010**.
65. Ding X., Jiang H., Zhu C., Cheng Y., *Tetrahedron Lett.*, 51, 6105-6107, **2010**.
66. Saladino R., Bernini R., Neri V., Crestini C., *Appl. Catal. A: General* 360,171–176, **2009**.
67. (a)Solomons, T., W., G., *Química Orgânica*. 6ª ed. Rio de Janeiro-RJ LTC, **1996**. (b) Den Hollander J. L., Zomerdik M., Straathof A. J. J., van Der Wielen L. A. M., *Chem. Eng. Sci.* 57, 1591-1598, **2002**.
68. Templeton W. *An Introduction of Chemistry of Terpenoids and Steroids* London: Butterworths; 1ª ed, **1969**.
69. Oliveira M. M. M., Brugnera D. F., Cardoso M. G., Alves E., Piccoli R. H., *Food Control* 21, 549-53, **2010**.
70. Gomes P. B., Mata V. G., Rodrigues A. E., *J. Supercrit. Fluids* 41, 50-60, **2007**.

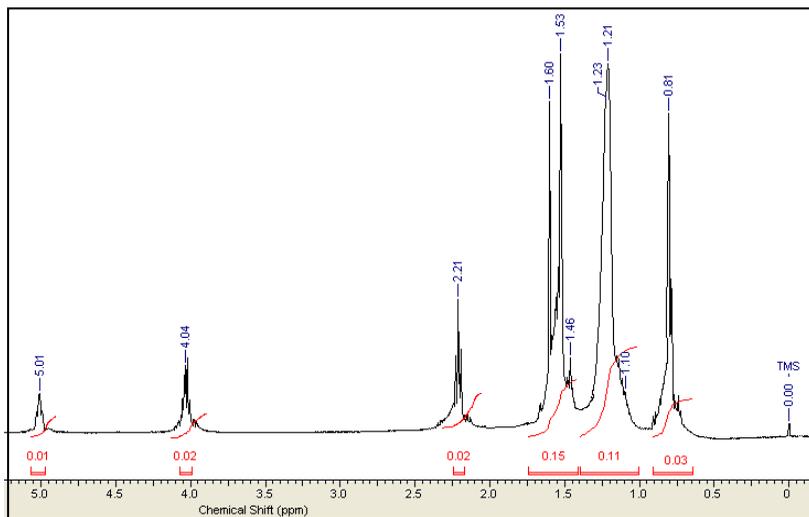
71. Verghese J., *Pafai J.* 16, 21–25, **1994**.
72. Bauer K, Garbe D, Surburg H. *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*. New York: Wiley-VCH: Weinheim; 3<sup>a</sup> ed., **1997**.
73. Smitt O., Höberg H., *Tetrahedron*, 58, 7691-7700, **2002**.
74. Satoh T., Kinugawa Y., Tamaki M., Kitajyo Y., Sakai R., Kakuchi T., *Macromol.*, 41, 5265-5271, **2008**.
75. Leveque P., Poelman H., Jacobs P., De Vos D., Sels B., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 11, 2964-75, **2009**.
76. Silverstein R. M., Bassler G. C., Morrill T. C., *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, New York: John Wiley & Sons; 5<sup>a</sup>ed. **1991**.
77. Bitencourt, T., B., *Utilização de Lipases na Formação Químio-enzimática de n-Alquinoxaziridinas e Epóxidos*. Tese (Doutorado) – UFSC-CFM, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, **2010**.
78. (a) Kon Y., Ono Y. M., Tomohiro S. K., *Synlett*, 7, 1095-1098, **2009**. (b) Awaad, A.S.; *Egypt. J. Biomed. Sci.*, 15, 42-58, **2004**. (c) AIST: Integrated Spectral Database System of Organic Compounds disponível em <http://www.aist.go.jp>. (d) Skoeld M.; *Food Chem. Toxic.* 44, 538-545, **2006**.
79. Bitencourt T. B., Nascimento M. G., *Green Chem.* 11, 209-14, **2009**.
80. Hollmann F., Grzebyk P., Heinrichs V., Doderer K., Thum O., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 57, 257–61, **2009**.
81. a- Li H-H., He Y-H., Guan Z., *Catal. Comm.* 12, 580-582, **2011**. b- Lou W.Y., Zhang Y.Y., Zong M.H., Wu H., *Enzyme Microb. Technol.* 35, 190-6 **2004**.
82. Laane C., Boeren S., Vos K., Veeger C., *Biotechnol. Bioeng.* 30, 81–7, **1987**.
83. Villeneuve P., *Biotechnol. Adv.* 25, 515-36, **2007**.
84. Priego J., Ortíz-Nava C., Carillo-Morales M., López-Munguía A., Escalante J., Castillo E., *Tetrahedron* 65, 536-9, **2009**.

85. Lee Y. S., Hong J. H., Jeon N. Y., Won K., Kim B., T., *Org. Process Res. Dev.*, 8, 948-51, **2004**.
86. Deng P., Zimmermann W., *Biotechnol. Bioeng.*, 74, 483-491, **2001**.
87. Moreira M., A., *Produção Enzimática de Peróxi-ácidos e sua utilização na epoxidação de terpenos*. Tese (Doutorado) – UFSC-CFM. Programa de Pós-Graduação em Química. Florianópolis, **2008**.

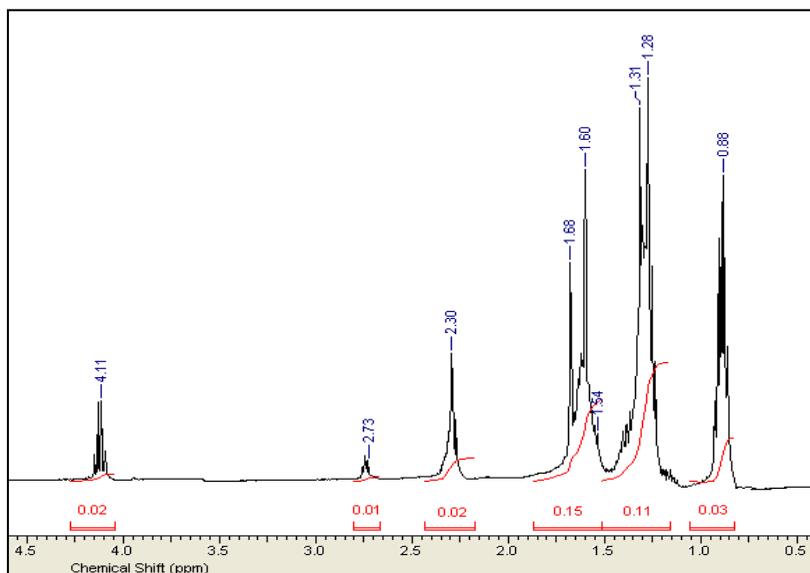
## ANEXOS

Anexo 1- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do epóxido citronelol (**43**) ( $\text{CDCl}_3$ )Anexo 2 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do epóxido citronelol (**43**) ( $\text{CDCl}_3$ )

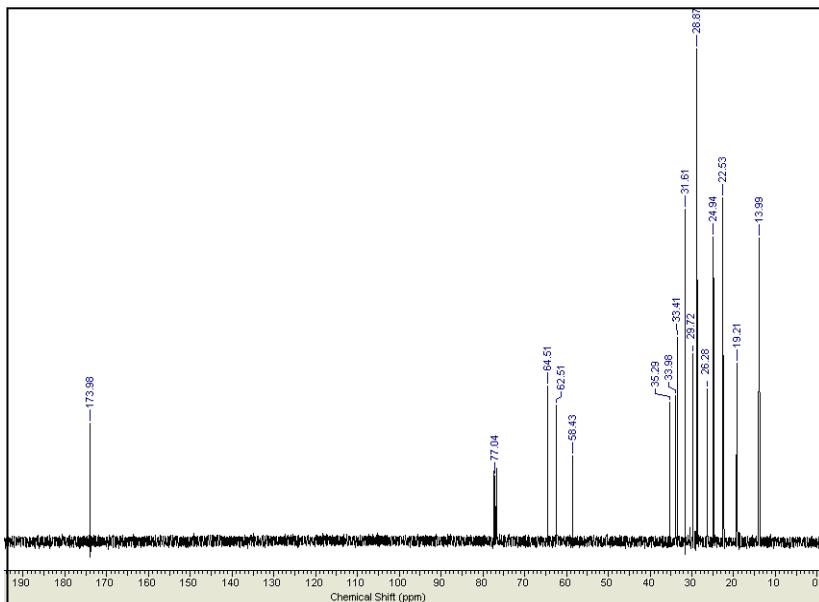
**Anexo 3** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do octanoato de citronela (46)  
( $\text{CDCl}_3$ )



**Anexo 4** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ester epóxido do citronelol (47)  
( $\text{CDCl}_3$ )



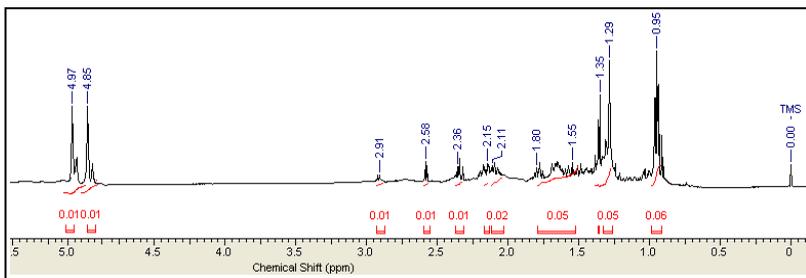
**Anexo 5** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  éster epóxido citronelol (**47**) ( $\text{CDCl}_3$ )



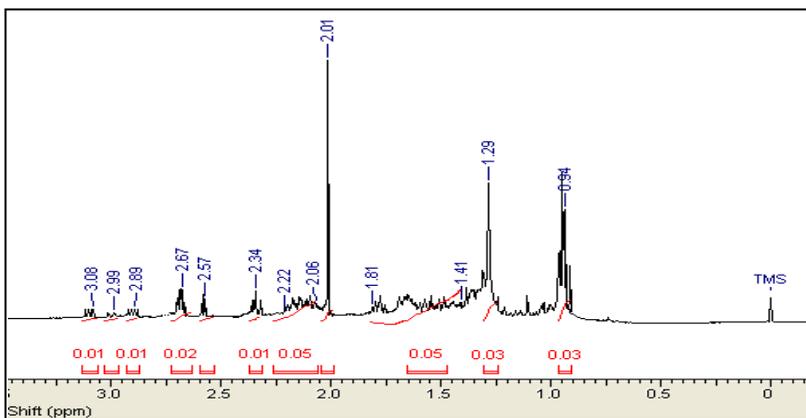
**Anexo 6-** Tabela de ácidos e os respectivos pKa utilizados por Hollmann e col. na avaliação da estabilidade da CAL-B na presença de ácidos fortes.<sup>80</sup>

| Ácido              | pKa  | Ácido              | pKa  |
|--------------------|------|--------------------|------|
| málico             | 3,41 | 2-metil butírico   | 4,82 |
| tartárico          | 3,03 | 2 oxo butírico     | 2,50 |
| lático             | 3,76 | 2-cloro butírico   | 2,80 |
| acético            | 4,75 | 2-bromo butírico   | 2,90 |
| propiónico         | 4,87 | 2-metil valérico   | 4,90 |
| butírico           | 4,82 | 3-metil valérico   | 4,90 |
| valérico           | 4,84 | 4-metil valérico   | 4,90 |
| 2-metil propiónico | 4,84 | hexanóico          | 4,90 |
| 2-cloro-propiónico | 2,90 | 2-metil hexanóico  | 4,90 |
| 2-bromo propiónico | 2,97 | 2-bromo hexanóico  | 2,90 |
| acrílico           | 4,26 | 2-hidroxihexanóico | 3,90 |

**Anexo 7** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do mono-epóxido do  $\beta$ -cariofileno (**44**) ( $\text{CDCl}_3$ )



**Anexo 8** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do di-epóxido do  $\beta$ -cariofileno (**45**) ( $\text{CDCl}_3$ )



**Anexo 9** – Código de identificação para fungos da região amazônica.<sup>20</sup>

| <b>Código</b> | <b>Tipo</b> | <b>Fonte</b>        | <b>Tecido</b> |
|---------------|-------------|---------------------|---------------|
| UEA_01        | PT          | <i>B. excelsa</i>   | semente       |
| UEA_06        | PT          | <i>T. cacao</i>     | fruta         |
| UEA_07        | PT          | <i>T. cacao</i>     | fruta         |
| UEA_23        | PT          | <i>T. cacao</i>     | fruta         |
| UEA_27        | PT          | <i>B. excelsa</i>   | semente       |
| UEA_28        | PT          | <i>A. aculeatum</i> | fruta         |
| UEA_41        | EP          | <i>P. aduncum</i>   | folha         |
| UEA_53        | EP          | <i>A. aculeatum</i> | fruta         |
| UEA_115       | WD          | madeira da Amazônia | ramo          |

PT = fitopatogênico

EP = endofítico

WD = degradador de madeira