

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

Jaqueline Maria Ramos da Silva

**EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DO  $\beta$ -CARIOFILENO  
COM LIPASES IMOBILIZADAS EM BIOPOLÍMEROS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de doutor em química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria da Graça Nascimento

Florianópolis  
2016





*“A ciência sem a religião é manca, a  
religião sem a ciência é cega.”  
Albert Einstein*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ser infinitamente justo e bom e permitir que eu pudesse voltar à carne, e pessoas ter pessoas queridas ao meu lado pra cumprir as provas dessa trajetória.

Aos meus pais José e Dalnei por terem me aceitado como filha e juntamente com as minhas irmãs Aline e Karine planejado formar uma família para um maior aprendizado e crescimento.

À professora Maria da Graça Nascimento por sua orientação.

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.

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

Às professoras Dras 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 micro-organismos de solo da região Brandão Bueno (MG).

À Dr<sup>a</sup>. Daniela Mezalira (DQ UFSC) pela análise termogravimétrica da bucha vegetal.

À Dr<sup>a</sup>. Gizelle Almerindo (DQ-UFSC) pela determinação da área superficial da bucha vegetal.

Ao laboratório LCME, em especial ao Américo, pela realização das Micrografias Eletrônicas de Varredura.

Aos colegas de laboratório César, Damiani, Fabiola, Giovanni, Julietty, Mayara, Vanessa, Dai, Paulo, Manuella, Fernanda Niebish, Fernanda Reis, Douglas, Juana, Leandro, Iasminy, Igor, Pamela pelos mates, risadas, ensinamentos, em especial ao César, à Vanessa, e à Manuella pelo companherismo.

Aos professores Dra Regina Aparecida Correia Gonçalves, Dr Leandro Piovan, Dr. Ricardo José Nunes, Dr Josiel Domingos, Dr Antônio Calos Joussef por terem aceitado ser membros desta banca.

À psicóloga Juliana Rego Silva, pelo auxílio fundamental nas minhas indecições.

À fisioterapeuta Julianna e em seu nome, todos os profissionais da saúde que foram responsáveis pela minha recuperação das duas cirurgias do quadril.

Às minhas amigas Fran, Tainá, Anna e Fernanda pelos conselhos e ouvidos disponíveis para ouvir minhas reclamações.

Aos meus amigos Mateus e Aline Ouros, mostraram que a amizade não tem distância.

Ao Cidney e à Araceli por me introduzirem na doutrina espírita, não só os ensinamentos, parceria, comprometimento, mas também por mostrarem qual o verdadeiro sentido da palavra caridade.

Aos membros da Caravana Espírita Novos Samaritanos que continuamente me ensinam a amar, servir e despertar.

“Aos esfarrapados do mundo e aos que neles se descobrem e, assim descobrindo-se, com eles sofrem, mas, sobretudo, com eles lutam.” (Paulo Freire).

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

## RESUMO

Neste trabalho, foi relatada a epoxidação quimio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno usando lipases imobilizadas em diferentes suportes e meios reacionais. Primeiramente, lipases de diversas procedências foram imobilizadas em gel de ágar, e a seguir foram avaliados várias condições experimentais tais como o uso de solventes orgânicos incluindo líquidos iônicos (LIs) derivados do 1-butil-3-metil-imidazólio, tempo, temperatura, velocidade de agitação, re-utilização e adição de aditivos ao gel de ágar. O mono-epóxido derivado do  $\beta$ -cariofileno foi obtido como produto único. O melhor resultado foi obtido usando a lipase de *Rhizopus oryzae* (F-AP15) imobilizada, formando o mono-epóxido com 96% de conversão em 8 h a 35 °C. Posteriormente, a lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) foi imobilizada em três suportes diferentes sendo eles o filme de amido de milho (FA), gel de ágar (GA) e bucha vegetal (BV) e utilizados na mesma reação. Foram avaliados sete solventes orgânicos com valores diferentes de Log *P*. Subsequentemente, dois solventes (*n*-hexano e acetonitrila) foram escolhidos para serem utilizados em misturas com os LIs para investigar a influência do meio reacional. O mono epóxido foi obtido com conversão de 87% com a LBC imobilizada em gel de ágar utilizando a mistura acetonitrila/[BMIM][PF<sub>6</sub>] (9:1 v/v). Os resultados obtidos na reação de epoxidação com LBC imobilizada nos três suportes foram comparados com os obtidos na obtenção do acetato de *n*-octila e do octanoato de *n*-pentila. Dependendo do suporte e meio reacional, os ésteres foram obtidos com conversões > 99%. Micélios da região amazônica também foram utilizados como biocatalisadores na epoxidação do  $\beta$ -cariofileno. Algumas condições experimentais tais como o uso de diferentes micélios, temperatura (20-40 °C), tempo (1-9 dias), solvente orgânico, agente oxidante (5-25 mmol) e ácido octanóico (1-3 mmol) foram avaliados para obter as melhores condições reacionais. Na maioria dos estudos foi obtido o mono-epóxido como produto, mas dependendo das condições reacionais o mono-epóxido foi formado na ausência do biocatalisador. Portanto, dependendo das condições, os micélios não atuaram efetivamente como catalisadores nessa reação. Finalizando, os dados obtidos mostraram a influência do suporte e do meio reacional nas diferentes reações estudadas. Em geral, foi observado o efeito positivo do uso de LIs como co-solvente. O uso de LIs em reações biocatalisadas, tem sido amplamente descrito e assim amplia o uso de solventes mais polares nestas e em outras reações orgânicas.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -cariofileno, gel de ágar, bucha vegetal, filme de amido de milho, lipases, imobilização, epoxidação.

## ABSTRACT






In this work, the chemo-enzymatic epoxidation of  $\beta$ -caryophyllene using lipases immobilized in different supports and reactional media was reported. Firstly, lipases from different sources were immobilized in agar gel, and then various experimental conditions such as the use of organic solvents and ionic liquids (ILs) derived from 1-butyl-3-methylimidazolium, time, temperature, rate speed, reuse and the addition of additives in the agar gel were evaluated. The mono-epoxide derived from  $\beta$ -caryophyllene was obtained as a sole product. The best result was achieved using the immobilized lipase from *Rhizopus oryzae* (F-AP15) forming the mono-epoxide with degree of conversion of 96% in 8 h at 35 °C. Then, the lipase from *Burkholderia cepacia* (BCL) was immobilized in three different supports, being corn starch film (SF), agar gel (AG) and loofa sponge (LS) and used in the same reaction. The influence of seven organic solvents with different Log *P* values was screened. Then, two organic solvents (n-hexane and acetonitrile) were selected to be used in mixture with the ILs to investigate the influence of reactional media. The mono-epoxide was obtained in a degree of conversion of 87% using BCL immobilized in agar gel using the mixture of acetonitrile/[BMIM][PF<sub>6</sub>] (9:1 v/v). The results obtained in the epoxidation reaction with BCL immobilized in the different supports, were compared with those reported to obtain *n*-octyl acetate and *n*-pentyl acetate. Depending on the support and reactional media, both esters, were obtained in degrees of conversion >99%. Mycelia from the Amazon region were also used in the epoxidation of  $\beta$ -caryophyllene. Some experimental conditions, such as the use of different mycelia, temperature (20-40 °C), time (1-9 days), organic solvent, oxidizing agent (5-25mmol) and octanoic (1-3 mmol) acid amount were evaluated in order to obtain the best reaction conditions. In general, the product mono-epoxide was obtained, but depending on the reaction conditions the mono epoxide was also formed in the absence of the biocatalyst. Thus, depending on the reaction conditions the mycelia did not act as catalyst in this reaction. To finalize, the obtained data herein showed the influence of support and reactional media in the studied reactions. In general, a positive effect of using the ILs as co-solvent was also observed. The use of ILs in biocatalyzed reactions has been reported in literature, and thus increase the possibility of using polar solvents in these and other organic reactions.

**Key words:**  $\beta$ -caryophyllene, agar gel, loofa sponge, corn starch film, lipases, immobilization, epoxidation



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das estruturas primária, secundária, terciária e quaternária de uma proteína. ....	11
Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de ação enzimática. F (Substrato) G (Produtos) E (Enzima) E <sub>1</sub> (Sítio Ativo) .....	12
Figura 3. Imobilização da lipase LipC12 e a sua aplicação na síntese do oleato de etila. ....	17
Figura 4. Fotos de fungos de plantas da floresta Amazônica. ....	18
Figura 5. Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de <i>C. parapsilosis</i> . ....	20
Figura 6. Representação do sítio ativo da lipase de <i>Pseudozyma antarctica</i> , na reação com o substrato acrilato de metila. <sup>a</sup> .....	23
Figura 7. Exemplos de reações catalisadas por lipases. ....	24
Figura 8. Tipos mais comuns de imobilização de enzimas: (A) adsorção física, (B) aprisionamento e (C) ligação covalente/ <i>cross-linking</i> . ....	26
Figura 9. Estruturas da amilose (13) e amilopectina (14). ....	28
Figura 10. Estrutura dos monômeros do ágar. ....	30
Figura 11. Figura ilustrativa de enzimas imobilizadas em gel de ágar. ....	31
Figura 12. Das fontes até as moléculas de celulose. ....	33
Figura 13. Planta de <i>Luffa cylindrica</i> e o seu fruto. ....	34
Figura 14. Derivados do ( $\pm$ ) <i>cis</i> -epóxido bisamida utilizados no teste <i>in vitro</i> na inibição do fator FXIII-A. ....	35
Figura 15. Cátions e ânions comumente usados nos LIs. ....	41
Figura 16. Exemplos de terpenos e terpenóides pertencentes a diferentes classes de compostos orgânicos. ....	44
Figura 17. Epoxidação químio-enzimática do $\beta$ -cariofileno. ....	46
Figura 18. Etapas para o crescimento dos fungos. ....	52
Figura 19. Cromatograma do reagente e produtos isolados da epoxidação do $\beta$ -cariofileno ( $t_R$ 32 = 6,5, $t_R$ 41 = 8,5, $t_R$ 42 = 11,0 min). (Condições de análise: descritas no item 3.3.7, p. 53). ....	58
Figura 20. Efeito do uso da mistura de solventes orgânicos com líquidos iônicos na epoxidação químio-enzimática do $\beta$ -cariofileno. ....	63
Figura 21. Valores de conversão do $\beta$ -cariofileno ao mono-epóxido em função da mistura de solventes usando superfície triangular. ....	65
Figura 22. Influência do tempo na epoxidação químio-enzimática do $\beta$ -cariofileno. ....	66
Figura 23. Influência do tempo e da temperatura na epoxidação químio-enzimática do $\beta$ -cariofileno. ....	67
Figura 24. Conversão (%) do $\beta$ -cariofileno em epóxido 41 em diferentes agitadores e rotações. ....	69

Figura 25. Imagens de MEV das amostras de bucha vegetal com e sem a LBC imobilizada. Ampliações: (a) sem LBC, 100x, superfície, (b) com LBC, 100x, superfície; (c) com LBC, 500x, superfície. ....	75
Figura 26. Imagens de MEV das amostras de filme de amido de milho com e sem a LBC imobilizada. [ampliações: (a) sem LBC, 250x, superfície, (b) com LBC, 250x, superfície. ....	76
Figura 27. Análise termogravimétrica da bucha vegetal. ....	77
Figura 28. Influência de diferentes solventes na epoxidação quimio-enzimática da $\beta$ -cariofileno usando a LBC imobilizada em filme de amido ( ), gel de ágar ( ) e bucha vegetal ( ). ....	78
Figura 29. Influência da temperatura na epoxidação quimio-enzimática da $\beta$ -cariofileno usando LBC imobilizada em filme de amido de milho (  ) , gel de ágar (  ) e bucha vegetal (  ) , (  ) LBC (  ) Sem LBC .....	81
Figura 30. Micrografias da BV após a reação de esterificação (a) e epoxidação (b) [ampliações: 500x] .....	84
Figura 31. Figuras do MEV da BV após a reação em diclorometano (a,b) e éter etílico (c,d); Reação de esterificação (a,c); Reação de epoxidação (b,d) [ampliações: 500x] .....	86
Figura 32. Curvas de superfície de resposta da influência do tempo e da temperatura na epoxidação quimio-enzimática de $\beta$ -cariofileno usando o UEA_06 micélio (a), UEA_115 (b) e UEA_27 (c). ....	90
Figura 33. Superfície de resposta da influência de ácido octanóico e quantidade de peróxido de hidrogênio na epoxidação quimio-enzimática de $\beta$ -cariofileno usando o micélio UEA_06. ....	91

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das enzimas segundo a UIBBM. ....	13
Tabela 2. Oxidantes geralmente utilizados em reações de epoxidação. (CHUA; XU; GUO, 2012) .....	36
Tabela 3. Epoxidação quimio-enzimática do $\beta$ -cariofileno utilizando diferentes lipases imobilizadas ou não em gel de ágar. ....	59
Tabela 4. Epoxidação quimio-enzimática do $\beta$ -cariofileno com a lipase F-AP15 imobilizada em gel de ágar em diferentes solventes orgânicos. ....	62
Tabela 5. Conversão (%) do $\beta$ -cariofileno ao mono-epóxido 41 usando gel de ágar com diferentes proporções de amido de pinhão. ....	71
Tabela 6. Determinação do teor de água nos suportes. ....	73

Tabela 7. Efeito do uso de misturas de solventes orgânicos/líquidos iônicos na epoxidação quimio-enzimática de $\beta$ -cariofileno usando diferentes suportes. <sup>(a)</sup> .....	80
Tabela 8. Valores de conversão aos produtos 41, 45 e 49 usando diferentes solventes e diferentes suportes. ....	83
Tabela 9. Efeito do uso de misturas de solvente orgânico/LI na obtenção de 41, 45, 49 utilizando a LBC imobilizada em diferentes suportes. ....	87
Tabela 10. Efeito de solventes orgânicos sobre a epoxidação na quimio-enzimática de $\beta$ -cariofileno usando o micélio UEA_06.....	91

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Biorredução de diferentes cetonas com o micélio derivado do fungo do marinho <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 em sistema bifásico de tampão de fosfato de potássio e <i>n</i> -hexano (9:1 v/v). ....	13
Esquema 2. Transesterificação da D-glicose utilizando células liofilizadas de <i>P. stutzeri</i> GIM 1.273. ....	14
Esquema 3. Resolução do ( <i>R,S</i> )-ácido mandélico catalisada pela lipase LC2-8. ....	15
Esquema 4. Hidrólise de um triacilglicerol catalisada por lipases. ....	16
Esquema 5. Reação de resolução biocatalítica do ( <i>R,S</i> )-2-octanol com acetato de vinila.....	18
Esquema 6. Acilação quimio-enzimática da D-ribono-1,4-lactona. ....	19
Esquema 7. Mecanismo proposto para a hidrólise enzimática de um éster. ....	22
Esquema 8. Síntese da palmitanilida catalisada pela lipase de <i>Mucor miehei</i> . ....	25
Esquema 9. Resolução enzimática do ( <i>R,S</i> )-1-feniletanol.....	30
Esquema 10. Reação do açúcar redutor com o ácido 3'5'-dinitrossalicílico (DNS) na presença de xilana (substrato). ....	32
Esquema 11. Representação esquemática da formação de perácidos....	37
Esquema 12. Ataque nucleofílico ao oxigênio do perácido. ....	38
Esquema 13. Reação do ciclo-hexeno com ácido <i>meta</i> -cloroperoxibenzóico 23 para formação do epóxi-ciclo-hexeno. ....	38
Esquema 14. Ataque nucleofílico de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ao complexo acil enzima. ...	39
Esquema 15. Epoxidação quimio-enzimática do ácido oleico. ....	40
Esquema 16. Mono-acilação da frutose utilizando usando ácido láurico como agente acilante e 2-metil-2-butanol como solvente e LI como co-solvente. ....	42

Esquema 17. Reação do 1-feniletanol e 2,3-di-hidro-1H-inden-1-ol como substratos modelos, utilizando a CAL-B, na presença de zeolita em sistema de solvente/LIs. ....	43
Esquema 18. Isomerização do epóxido do (+) - <i>trans</i> - $\alpha$ -pineno. ....	45
Esquema 19. Preparação do acetato de <i>n</i> -octila. ....	82
Esquema 20. Preparação do octanoato de <i>n</i> -pentila. ....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[BF<sub>4</sub>]<sup>-</sup> = tetrafluoroborato  
[BMIM]<sup>+</sup> = 1-butil-3-metil-imidazólio  
[Br]<sup>-</sup> = brometo  
[Cl]<sup>-</sup> = cloreto  
[I]<sup>-</sup> = iodeto  
[NTf<sub>2</sub>] = bis(trifluorometilsulfonil)-imida  
[PF<sub>6</sub>]<sup>-</sup> = hexafluorofosfato  
[SCN]<sup>-</sup> = tiocianato  
[SO] = sulfato de *n*-octila  
[TfO] = trifluorometanossulfonato  
A Amano12 – lipase de *Aspergillus niger*  
AK – lipase de *Pseudomonas fluorescens*  
AY Amano 30 – lipase de *Candida rugosa*  
BV – bucha vegetal  
CAL-B – lipase B de *Candida antarctica* B  
CCD – cromatografia de camada delgada  
CDCl<sub>3</sub> – clorofórmio deuterado  
CG – cromatografia gasosa  
DMF – *N,N*-dimetilformamida  
DMSO – sulfóxido de dimetila  
ee – excesso enantiomérico  
FA – filme de amido de milho  
F-AP15 – lipase de *Rhizopus oryzae*  
GA – gel de ágar  
LAN – lipase de *Aspergillus niger*  
LBC = lipase de *Burkholderia cepacia*  
Lipozyme IM – lipase de *Mucor miehei*  
Lipozyme IM RM – lipase de *Mucor miehei*  
log *P* - logaritmo do coeficiente de partição octanol/água  
LRO – lipase de *Rhizopus oligosporus*  
M Amano10 – lipase de *Mucor javanicus*  
*m*-CPBA – ácido *meta*-cloroperbenzóico  
MEV = microscopia eletrônica de varredura  
MTBE – éter *t*-butil-metílico  
PS Amano – lipase de *Burkholderia cepacia*  
PS Amano IM – lipase de *Burkholderia cepacia*  
PS Amano SD – lipase de *Burkholderia cepacia*  
PS-C Amano I – lipase de *Burkholderia cepacia*  
RMN – ressonância magnética nuclear

RNA - ácido ribonucléico

rpm – rotações por minuto

t<sub>R</sub> – tempo de retenção

THF – tetrahydrofurano

TMS – tetrametilsilano

UEA – micélios de fungos da região amazônica

UIBBM – União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

UPH – uréia peróxido de hidrogênio

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	9
1.2. ENZIMAS	10
<b>1.2.1. Lipases</b>	<b>15</b>
1.3. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	26
<b>1.3.1. Amido</b>	<b>28</b>
<b>1.3.2. Ágar</b>	<b>30</b>
<b>1.3.3. Fibras Vegetais</b>	<b>32</b>
1.4. EPÓXIDOS	35
1.5. TERPENOS	43
1.6. $\beta$ -CARIOFILENO COMO SUBSTRATO	45
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>48</b>
2.1. OBJETIVO GERAL	48
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>49</b>
3.1. REAGENTES E MICRO-ORGANISMOS	49
3.2. EQUIPAMENTOS	51
<b>3.2.1. Laboratórios de Biocatálise (301 e 306)</b>	<b>51</b>
<b>3.2.2. Central de Análises no DQ-UFSC</b>	<b>51</b>
<b>3.2.3. Outros Laboratórios</b>	<b>51</b>
3.3. MÉTODOS EXPERIMENTAIS	52
<b>3.3.1. Cultivo do Micélio UEA_06</b>	<b>52</b>
<b>3.3.2. Imobilização de Lipases em Gel de Ágar</b>	<b>53</b>
<b>3.3.3. Preparação do Filme de Amido de Milho/Dextrana e Imobilização de Lipases</b>	<b>53</b>
<b>3.3.4. Imobilização das Lipases em Bucha Vegetal</b>	<b>53</b>
<b>3.3.5. Caracterização dos Suportes</b>	<b>54</b>

<b>3.3.6. Preparação e Purificação dos Padrões (via química)</b>	<b>55</b>
<b>3.3.7. Epoxidação Químio-Enzimática do <math>\beta</math>-Cariofileno</b>	<b>55</b>
<b>3.3.8. Preparação dos Ésteres</b>	<b>56</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>57</b>
<b>4.1. CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO</b>	<b>57</b>
<b>4.2. EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DO <math>\beta</math>-CARIOFILENO USANDO LIPASES IMOBILIZADAS EM GEL DE AGAR</b>	<b>59</b>
<b>4.2.1. Avaliação do uso de diversas lipases</b>	<b>59</b>
<b>4.2.2. Efeito do Meio Orgânico</b>	<b>60</b>
<b>4.2.3. Influência do Tempo e Temperatura</b>	<b>66</b>
<b>4.2.4. Influência do Tipo de Agitação</b>	<b>68</b>
<b>4.2.5. Estudo de Re-utilização</b>	<b>70</b>
<b>4.2.6. Adição de Aditivos ao Gel de Ágar</b>	<b>70</b>
<b>4.3. EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DO <math>\beta</math>-CARIOFILENO UTILIZANDO A LIPASE de <i>Burkholderia cepacia</i> IMOBILIZADA EM DIFERENTES SUPORTES</b>	<b>72</b>
<b>4.4. CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES</b>	<b>73</b>
<b>4.4.1. Determinação do Teor de Água nos Suportes por Titulação de Karl Fischer</b>	<b>73</b>
<b>4.4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura</b>	<b>74</b>
<b>4.4.3. Análise Termogravimétrica (TGA) e Área Superficial da Bucha Vegetal</b>	<b>77</b>
<b>4.4.4. Efeito do Meio Orgânico</b>	<b>78</b>
<b>4.4.5. Influência da Temperatura</b>	<b>81</b>
<b>4.4.6. Influência do Suporte e do Meio Reacional em Reações Diferentes</b>	<b>82</b>



4.5. EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DO $\beta$ -CARIOFILENO USANDO MICÉLIOS DA REGIÃO AMAZÔNICA	89
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>93</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>95</b>
<b>7. PRODUÇÃO ACADÊMICA 2012-2015</b>	<b>109</b>
<b>7.1. Artigos completos publicados em periódicos</b>	109
<b>7.2. Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)</b>	109
<b>7.3. Apresentação de trabalho e palestra</b>	111
<b>7.4. Participação em eventos</b>	112



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A indústria química, diariamente, está dando maior importância para tecnologias sustentáveis buscando reduzir a degradação ambiental e minimizar o impacto dos processos químicos. Uma das tecnologias emergentes na academia e na indústria, que discute o desenvolvimento desses processos é a biocatálise. (CHUA; XU; GUO, 2012)

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 formam subprodutos que não são utilizados nos organismos vivos. (CABRAL, 2003; CAMPBELL et al., 2007)

As enzimas atuam sob condições suaves de temperatura (20-40°C), em meio não aquosos, e podem catalisar reações em regiões pouco reativas da molécula, não se restringindo apenas aos substratos naturais. (KUMARAGURU; FADNAVIS, 2012; LOUGHLIN, 2000; MORISSO; COSTA, 2001; SWEERS; WONG, 1986). Além disso, as velocidades de processos mediados por enzimas são maiores se comparados com a catálise química e são efetivas mesmo em frações molares muito pequenas do catalisador. (CABRAL, 2003; CAMPBELL et al., 2007)

No entanto, elas nem sempre são os catalisadores ideais para aplicações industriais, por serem instáveis e não suportar temperaturas elevadas ou solventes orgânicos. (KUO et al., 2012) Para solucionar esses problemas, o uso de técnicas de imobilização de enzimas teve grande impulso nos últimos anos. Uma das vantagens principais da imobilização é que ela permite a reciclagem e a re-utilização fácil, o que melhora significativamente a viabilidade comercial do biocatalisador. (MILNER; MAGUIRE, 2012)

A capacidade das lipases imobilizadas em catalisar uma reação de síntese em meio orgânico, está longe de ser o seu papel natural. Entretanto, já está bem descrito que as lipases são utilizadas em diversas reações tais como esterificação, transesterificação, interesterificação, acidólise e epoxidação, entre outras. (DA SILVA; NASCIMENTO, 2012; GARCIA-GALAN et al., 2013)

A epoxidação de alquenos é extremamente importante nas indústrias químicas, pois os intermediários contendo o grupo epóxido mostram-se extremamente úteis devido à variedade de derivados que podem ser obtidos. (HIYOSHI, 2012)

A reação de epoxidação não é simples, e muitas vezes são necessárias substâncias químicas e reagentes oxidantes prejudiciais ao meio ambiente. (POHLIT; FERRAZ, 1995) Um forma menos agressiva de obter epóxidos é através da peridrólise de ácidos carboxílicos na presença de peróxido de hidrogênio utilizando lipases. (BJÖRKLING; GODTFREDSSEN; KIRK, 1990)

Dentro desse contexto, este trabalho visa utilizar lipases livres ou imobilizadas e micélios da região amazônica na obtenção de epóxidos derivados do  $\beta$ -cariofileno. A influência do uso de diversos suportes e do meio reacional também foi avaliada em reações de esterificação, transesterificação e epoxidação.

## 1.2. ENZIMAS

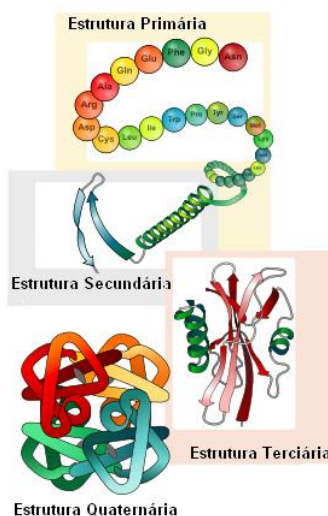
As enzimas são proteínas, com exceção de um pequeno grupo de moléculas de ácido ribonucléico (RNA), que funcionam como proteínas enzimáticas conhecidas como ribozimas e eu podem catalisar reações importantes. São constituídas por uma série de compostos orgânicos simples,  $\alpha$ -aminoácidos, que se unem por ligações peptídicas. A sequência exata de aminoácidos da cadeia protéica é denominada de estrutura primária. O arranjo espacial dessa sequência é chamado de estrutura secundária e o tridimensional, é conhecido como estrutura terciária. (CAMPBELL et al., 2007)

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. (CAMPBELL et al., 2007) A **Figura 1**, mostra a representação esquemática dessas estruturas.

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.(CAMPBELL et al., 2007; COX; LEHNINGER; NELSON, 2005; VOET, 2006) 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 dos substratos. Em geral, o sítio ativo contém aminoácidos cujas cadeias laterais formam uma superfície tridimensional complementar ao substrato. (FABER, 2011)

**Figura 1.** Representação esquemática das estruturas primária, secundária, terciária e quaternária de uma proteína.



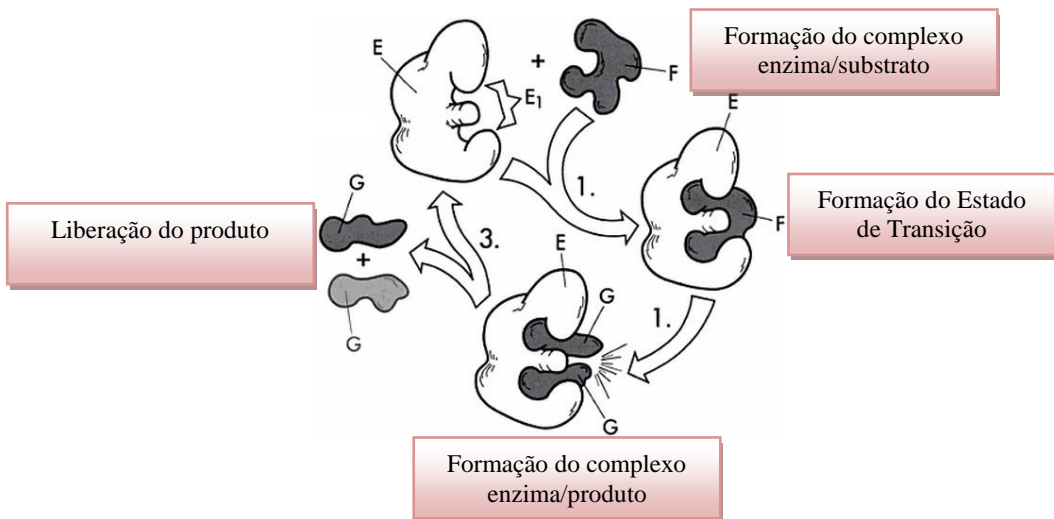
Fonte: adaptado de CAMPBELL et al., 2007

A capacidade de aproximar os substratos em uma determinada orientação favorece a diminuição da energia de ativação, que é necessária para converter o substrato ao produto. Em geral, as velocidades de reações se tornam maior, sendo na ordem de  $10^6$  até  $10^{23}$  vezes quando comparadas com as não catalisadas. (COX; LEHNINGER; NELSON, 2005; VOET, 2006) 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.** (FABER, 2011)

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**. (COX; LEHNINGER; NELSON, 2005; VOET, 2006)

**Figura 2.** Representação esquemática do mecanismo de ação enzimática. F (Substrato) G (Produtos) E (Enzima)  $E_1$  (Sítio Ativo)



Fonte: Adaptado de: COX; LEHNINGER; NELSON, 2005

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 os três tipos de seletividade, sendo químico, regio/diastereo e enantiosseletividade.(FABER, 2011)

A quimiosseletividade se refere à habilidade das enzimas reconhecerem somente um tipo de grupo funcional mesmo na presença de outros grupos reativos.(FABER, 2011)

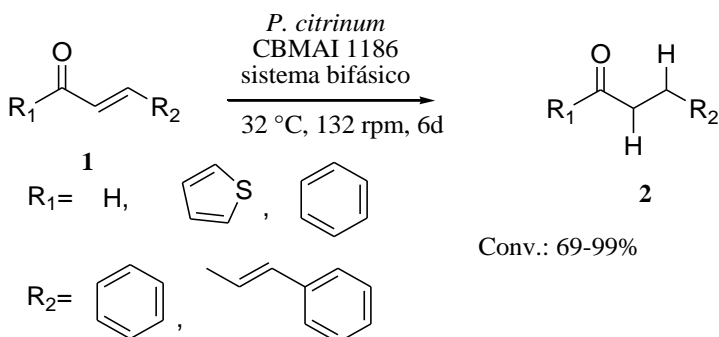
Ferreira e *col.* realizaram a redução quimiosseletiva da ligação dupla de cetonas  $\alpha$ - $\beta$  insaturadas com as enzimas enoato redutases presentes no micélio derivado do fungo marinho *Penicillium citrinum* CBMAI 1186. Em geral, as cetonas saturadas foram obtidas boas conversões (**Esquema 1**). (FERREIRA et al., 2015)

**Tabela 1.** Classificação das enzimas segundo a UIBBM.

Classe	Reação	Exemplos de enzimas
1-Oxirredutases	Oxidação-redução	Lactato desidrogenase
2- Transferases	Transferência de grupos (ex. cetonas, metilas)	Homocisteína metiltransferase
3-Hidrolases	Hidrólise/formação de ésteres, 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

Fonte: VOET, 2006

**Esquema 1.** Biorredução de diferentes cetonas com o micélio derivado do fungo do marinho *P. citrinum* CBMAI 1186 em sistema bifásico de tampão de fosfato de potássio e *n*-hexano (9:1 v/v).

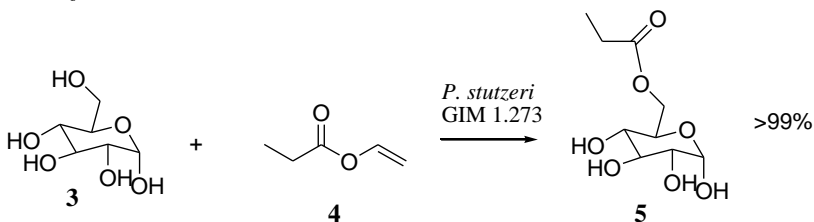


Fonte: FERREIRA et al., 2015

A regio e diastereosseletividade podem ser descritas como a possibilidade das enzimas distinguírem grupos funcionais situados em regiões diferentes do mesmo substrato. (FABER, 2011)

Por exemplo, na reação de transesterificação da D-glicose com propionato de vinila utilizando células liofilizadas de *Pseudomonas stutzeri* GIM 1.273, o éster 6-O foi obtido predominantemente (> 99%), indicando elevada regioselectividade do biocatalisador para o grupo 6-O-hidroxil da glicose (**Esquema 2**). (FENG et al., 2015)

**Esquema 2.** Transesterificação da D-glicose utilizando células liofilizadas de *P. stutzeri* GIM 1.273.



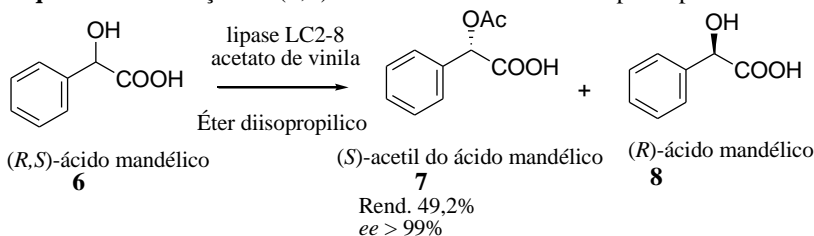
iso-octano-piridina 3:7 (v:v) teor de água 2% (v:v), razão molar de doador de acila de glicose 10:1, 35 °C, 24 h.

Fonte: FENG et al., 2015

A enantiosseletividade é a capacidade da enzima interagir com, ou formar preferencialmente um dos dois enantiômeros. Assim, as enzimas são consideradas catalisadores quirais e sua especificidade pode ser explorada para sínteses seletivas e assimétricas. (FABER, 2011)

Por exemplo, o ácido mandélico que é um precursor de centros quirais, foi acilado enantiosseletivamente a (*S*)-O-acetil ácido mandélico usando acetato de vinila como doador de acila. A reação foi catalisada pela lipase de *Pseudomonas stutzeri* LC2-8. Sob as condições de reação otimizadas, o (*S*)-O-acetil derivado do ácido mandélico foi formado com excesso enantiométrico >99% e rendimento próximo ao valor teórico máximo para a resolução cinética (50%) (**Esquema 3**). (CAO et al., 2014)



**Esquema 3.** Resolução do (*R,S*)-ácido mandélico catalisada pela lipase LC2-8.

Fonte: CAO et al., 2014

### 1.2.1. 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-acilglicerol, monoacilglicerol e glicerol. (FABER, 2011)

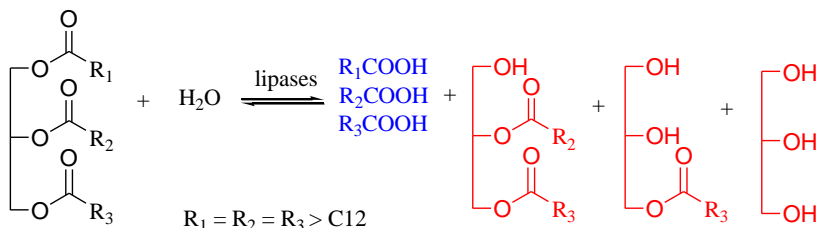
O glicerol é um composto simples que contém três grupos hidroxilas. Quando os três grupos formam ligações ésteres com ácidos graxos, o composto resultante é um triacilglicerol; o nome mais antigo desse tipo de composto é triglicerídeo. (CAMPBELL et al., 2007)

Os três grupos éster são parte polar da molécula, enquanto as cadeias dos ácidos graxos são apolares. É normal que três ácidos graxos diferentes estejam esterificados com os grupos hidroxilas da mesma molécula de glicerol. (CAMPBELL et al., 2007)

Os triacilgliceróis não ocorrem como componentes de membranas (como outros tipos de lipídeos), mas se acumulam no tecido adiposo (principalmente em células adiposas) e fornecem um meio de armazenamento de ácidos graxos, principalmente nos animais. Quando um organismo necessita de ácidos graxos, as ligações ésteres dos triacilgliceróis são hidrolisadas pelas lipases. (CAMPBELL et al., 2007)

O **Esquema 4**, mostra a hidrólise de um triacilglicerol. (CABRAL, 2003; FABER, 2011)

**Esquema 4.** Hidrólise de um triacilglicerol catalisada por lipases.



Fonte: FABER, 2011

No final da década de 80, Klibanov demonstrou que as lipases também atuavam em meios orgânicos anidros, e nesses meios não naturais adquiriam propriedades notáveis tais como uma grande estabilidade, variedade de substratos, especificidades enantioméricas, memória molecular, e a capacidade de catalisar reações não naturais. (KLIBANOV, 1989)

Nesses sistemas de solventes orgânicos, as lipases demonstraram capacidade para catalisar a síntese de ésteres que até os dias de hoje têm sido empregadas na modificação de gorduras e óleos, tanto para fornecer novos materiais de características melhoradas bem como diminuir o custo de matérias-primas. (LINKO et al., 1998; SPERANZA; RIBEIRO; MACEDO, 2016)

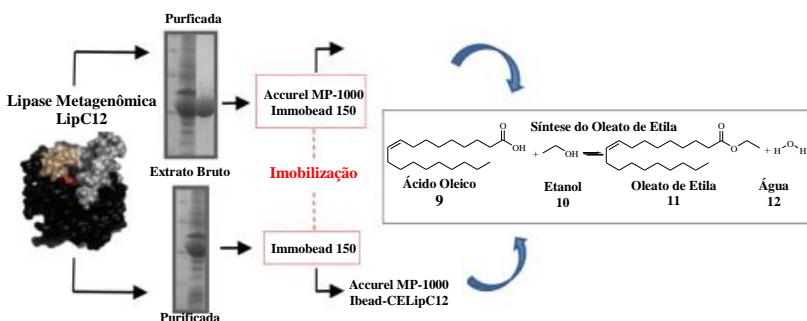
Essa descoberta foi de grande importância para os processos enzimáticos, visto que até aquela época todos os dados sobre enzimas eram a partir de solventes aquosos, considerando que esses biocatalisadores são provenientes de organismos vivos que consistem principalmente de água. (KLIBANOV, 1989)

As lipases, como a maioria das enzimas, também têm origem nesses “organismos aquosos”, elas estão presentes em diversos reinos, 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 custo menor de isolamento. (GUPTA et al., 2015; HAKI; RAKSHIT, 2003; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001)

Micro-organismos isolados em território brasileiro têm demonstrado excelente potencial como biocatalisadores frente a diferentes substratos orgânicos de interesse. (MADALOZZO et al., 2015; PILISSÃO; CARVALHO; NASCIMENTO, 2010; ZANOTTO et al., 2009)

Madalozzo *et al.* imobilizaram uma nova lipase metagenômica, brasileira, LipC12, e estudaram a sua aplicação na síntese do oleato de etila, um éster modelo para estudos de biodiesel. A conversão do ácido oleico ao oleato de etila foi de 98% utilizando *n*-hexano como solvente e foram obtidas conversões > 90% durante 10 ciclos de reação. Estes resultados demonstraram que a LipC12 tem um bom potencial para ser utilizada na síntese enzimática de biodiesel. (**Figura 3**)

**Figura 3.** Imobilização da lipase LipC12 e a sua aplicação na síntese do oleato de etila.



Fonte: MADALOZZO et al., 2015

Estudos realizados na Amazônia com a finalidade de selecionar micro-organismos para futura utilização, de interesses médico e industrial estão contribuindo para a descoberta de novas espécies como fontes de enzimas, entre outros bioativos de importância industrial. Estes dados contribuem para revelação da riqueza de espécies de fungos que constituem a microbiota regional. (TEIXEIRA et al., 2011)

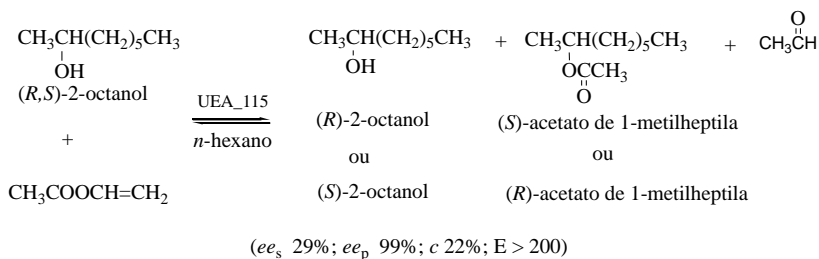
Zanotto *et al.* avaliaram 212 fungos isolados de plantas da região Amazônica para aplicações em biocatálise como produtores de lipases. (**Figura 4**)

**Figura 4.** Fotos de fungos de plantas da floresta Amazônica.

Fonte: Zanoto S. P. (UEA, AM, coleção particular)

Cerca de 90% dos fungos apresentaram atividade hidrolítica frente à tributirina e nove desses fungos apresentaram bons desempenhos de enantioseletividade na resolução do (*R,S*)-octan-2-ol (**Esquema 5**). (ZANOTTO et al., 2009)

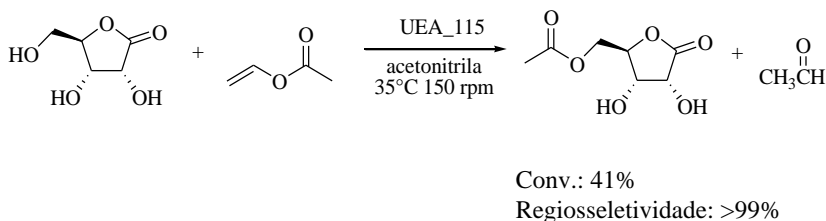
**Esquema 5.** Reação de resolução biocatalítica do (*R,S*)-2-octanol com acetato de vinila.



Fonte: ZANOTTO et al., 2009

Destes 212 fungos, os micélios UEA\_115 e UEA\_53 foram utilizados na acilação regioseletiva da *D*-ribono-1,4-lactona. O melhor resultado foi obtido com o micélio UEA\_115, pois este possibilitou uma conversão de 41% no produto acilado com regioseletividade >99%, após 72 h de reação (**Esquema 6**). (SEBRÃO; SÁ; NASCIMENTO, 2011)

**Esquema 6.** Acliação quimio-enzimática da *D*-ribono-1,4-lactona.



Fonte: SEBRÃO; SÁ; NASCIMENTO, 2011

Diversos micélios também foram avaliados na epoxidação quimio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno, e em todas as reações obteve-se o mono-epóxido do  $\beta$ -cariofileno como produto único. Depois de 168 h, as maiores conversões foram obtidas utilizando os micélios UEA\_06 (64%), seguido por UEA\_23 (55%), UEA\_01 (49%) e UEA\_41 (48%). (DA SILVA et al., 2013)

A capacidade das lipase catalisarem reações alternativas que diferem da sua reação fisiológica natural recebeu o nome de promiscuidade catalítica. Por questões linguísticas, nesse trabalho, a palavra promiscuidade será substituída por versatilidade. (HULT; BERGLUND, 2007)

Hult e Berglund classificaram essa versatilidade em três classes principais:

- a. Versatilidade de condições - É a capacidade da enzima em catalisar reações em condições não naturais como meio anidro, temperaturas ou pH extremos.
- b. Versatilidade de substrato enzimático - Quando as enzimas podem usar diversos substratos diferentes para realizar uma reação química semelhante. Isto é mostrado pelas enzimas que têm uma ampla especificidade de substrato.
- c. Versatilidade catalítica – Quimicamente, é a capacidade do sítio ativo da enzima catalisar transformações químicas distintas. (KAPOOR; GUPTA, 2012)

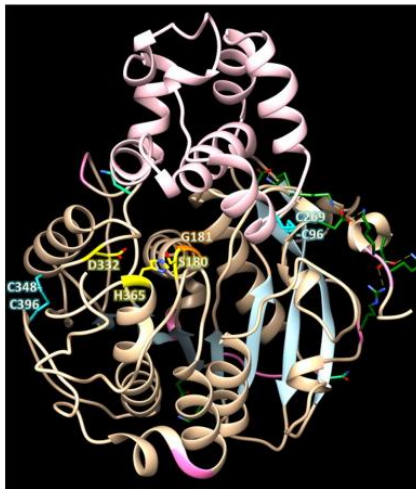
O sítio ativo de uma lipase é formado por resíduos específicos de aminoácidos, conhecidos como tríade catalítica, sendo eles serina, histidina, e ácido aspártico ou glutâmico. Uma característica essencial das lipases é uma “alça” na superfície do aminoácido serina, atuando como uma “tampa” para o sítio ativo. Ao contato com o substrato esta

“tampa” sofre mudança conformacional expondo o sítio ativo, e embora essencial, algumas lipases não apresentam esta estrutura. (GUPTA et al., 2015)

A **Figura 5** mostra o modelo 3D de uma lipase/aciltransferase de *Cândida parapsilosis* (CpLIP2) obtida pela modelagem comparativa com a estrutura 3D da lipase de *Pseudozyma antarctica* (CAL-A). A dobra  $\alpha/\beta$  hidrolase é organizada em torno da folha  $\beta$  (azul claro) e da  $\alpha$  hélice (marron claro).

O sítio ativo contém a tríade catalítica clássica (amarelo): S180, D332, H365. A tampa (rosa claro) é composta por seis  $\alpha$ -hélices e estas são ligadas as outras partes da proteína por duas dobradiças; de um lado os cachos N-terminais e C-terminais justapostos que flanqueiam a sequência da tampa, e do outro lado uma ligação dissulfeto entre o núcleo e a tampa (entre C96 e C269, em ciano). A suposta cavidade de oxidação está em laranja (G181). Pontes salinas entre os resíduos ácidos e básicos estão localizados na superfície da proteína (resíduos verde-escuros). (SUBILEAU et al., 2015)

**Figura 5.** Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *C. parapsilosis*.

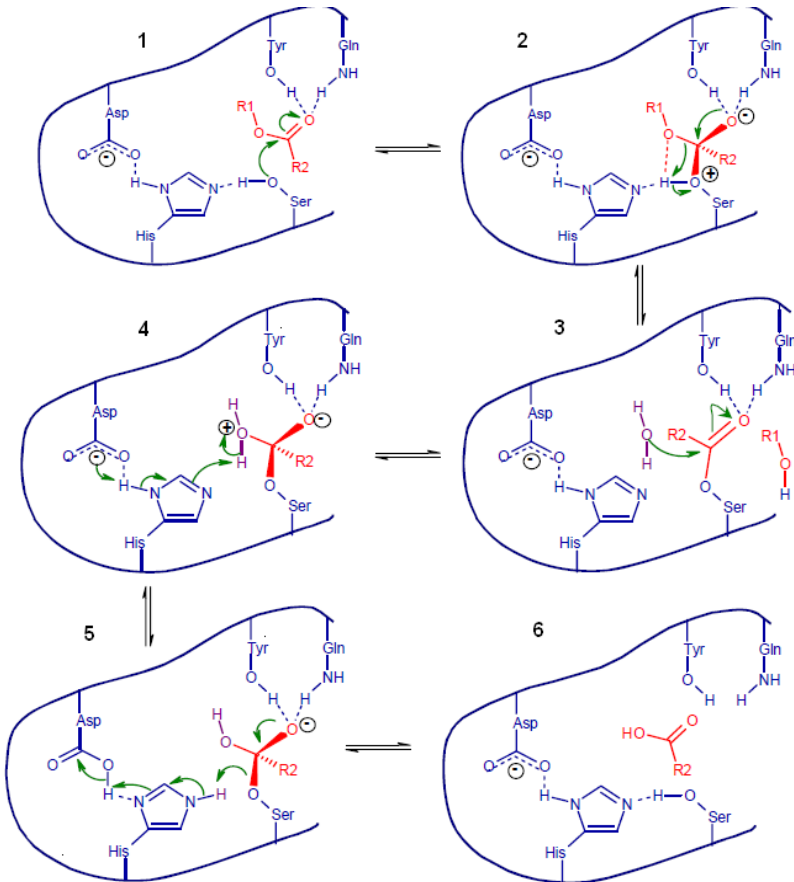


Fonte: SUBILEAU et al., 2015

O mecanismo comum de hidrólise de ésteres, realizado pelas lipases consiste nas seguintes etapas, e está representado no **Esquema 7**.

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.

**Esquema 7.** Mecanismo proposto para a hidrólise enzimática de um éster.



Fonte: CAMPBELL et al., 2007

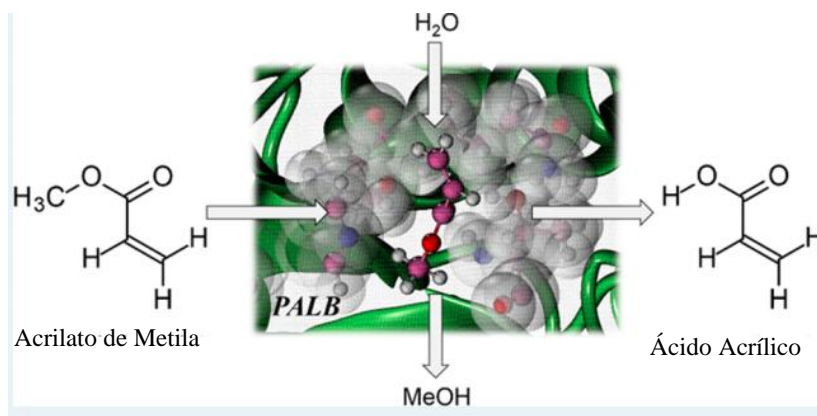
Swiderek e *col.* propuseram através de cálculos teóricos um novo mecanismo que envolve um número menor de etapas, mas os resultados sugeriram que o mecanismo com maior número de etapas é cineticamente mais favorável, considerando que as barreiras de energia são menores. (ŚWIDEREK; MARTÍ; MOLINER, 2014)

As simulações demonstraram que a primeira etapa, a ativação do grupo carbonila do substrato e do ataque nucleofílico da serina ao átomo do carbono carbonílico apresentam o estado de transição de energia mais



elevado. Sugere-se ainda, que a origem da atividade catalítica da enzima seja devido às interações favoráveis estabelecidas entre os resíduos sítio ativo, que formam uma cavidade de oxidação, que é capaz de modular o pKa da histidina para atuar como uma base ou um ácido, dependendo da etapa do processo catalítico (**Figura 6**). (ŚWIDEREK; MARTÍ; MOLINER, 2014)

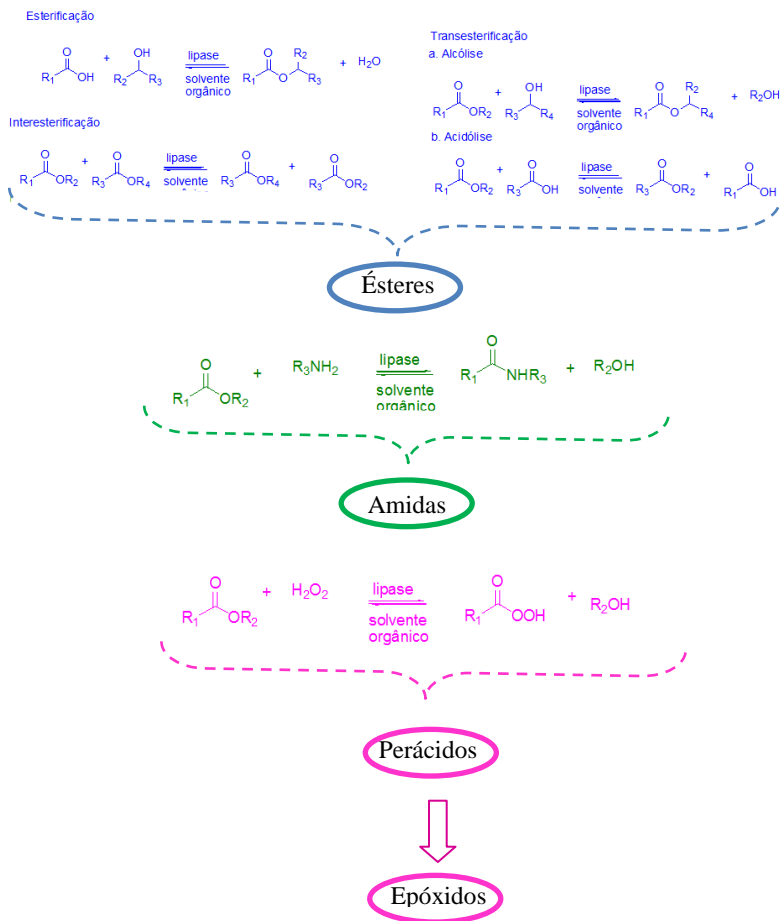
**Figura 6.** Representação do sítio ativo da lipase de *Pseudozyma antarctica*, na reação com o substrato acrilato de metila.



Fonte: ŚWIDEREK; MARTÍ; MOLINER, 2014

Essa capacidade de modular o pKa da histidina, faz com que as lipases possam ser utilizadas em várias reações, evidenciando mais uma vez a versatilidade das lipases.

Além da hidrólise de ésteres, as lipases realizam outras reações tais como esterificação, transesterificação (NASCIMENTO et al., 2015), aminólise (XIAO et al., 2013) e epoxidação (WANG et al., 2015) em solvente orgânico, sistema bifásico e em solução micelar com alta especificidade. (SALIHU; ALAM, 2015) A **Figura 7** mostra algumas reações catalisadas pelas lipases.

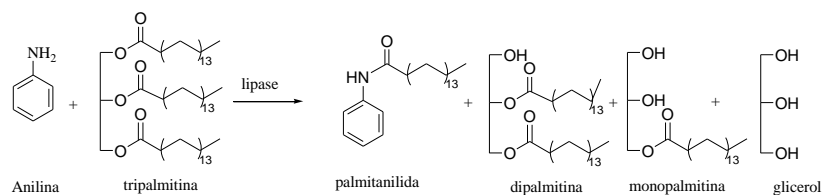
**Figura 7.** Exemplos de reações catalisadas por lipases.

Fonte: Adaptado de GHANEM, 2007

Essa capacidade de reconhecer diversos substratos e catalisar um grande número de reações, além das necessidades globais de tecnologias mais limpas, gestão de produtos menos tóxicos e dos subprodutos gerados nos processos. (WOHLGEMUTH, 2009), fez com que as lipases chamassem atenção da indústria. Elas são amplamente utilizadas, principalmente nas indústrias de cosméticos (KHAN; RATHOD, 2015), alimentos e sabores, biodiesel, têxteis, farmacêuticas, e de celulose. (SALIHU; ALAM, 2015)

Liu e *col.* utilizaram a lipase de *Mucor miehei* (Lipozyme IM20) na reação de amidificação na síntese da palmitanilida (**Esquema 8**). A palmitanilida faz parte do grupo das anilidas de ácidos graxos que possuem ampla aplicação industrial em detergentes, xampus e cosméticos. Os parâmetros do processo (temperatura de reação, razão molar substrato, quantidade de enzima) foram otimizados. O rendimento máximo da palmitanilida (88,9%) foi alcançado após 24 h de reação a 40 °C com 1,4% (70 mg) de concentração de enzima. (LIU; LIU, 2016)

**Esquema 8.** Síntese da palmitanilida catalisada pela lipase de *Mucor miehei*.



Fonte: LIU; LIU, 2016

Outra aplicação das lipases é na química analítica, Jeong e *col.* desenvolveram de um biossensor eletroquímico para a quantificação de triacilgliceróis em sebo de pele humana, com base em uma reação de cascata multienzimática. O método se mostrou eficiente pois esse sistema eletroquímico detecta rapidamente os triacilgliceróis nas amostras, diferentemente dos métodos convencionais que usam instrumentos sofisticados, caros e que devem ser utilizados por técnicos qualificados. (JEONG et al., 2014)

No entanto, elas nem sempre são os catalisadores ideais para aplicações industriais, por serem instáveis e não suportar temperaturas elevadas em solventes orgânicos. (KUO et al., 2012) Além disso, as lipases que tem atividades elevadas em meio aquoso, tendem a ter atividades mais baixas em meios não aquosos. Vários fatores podem contribuir para este efeito, incluindo perturbação da estrutura terciária devido a alterações no meio de hidrofobicidade, flexibilidade conformacional limitada, dessolvatação do sítio ativo resultando na ligação enzima-substrato limitada e a desnaturação interfacial da enzima devido à tensão interfacial. (DOUKYU; OGINO, 2010; SERDAKOWSKI; DORDICK, 2008)

Para solucionar estes problemas, nas últimas décadas foram desenvolvidos métodos de imobilização de enzimas.

### 1.3. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

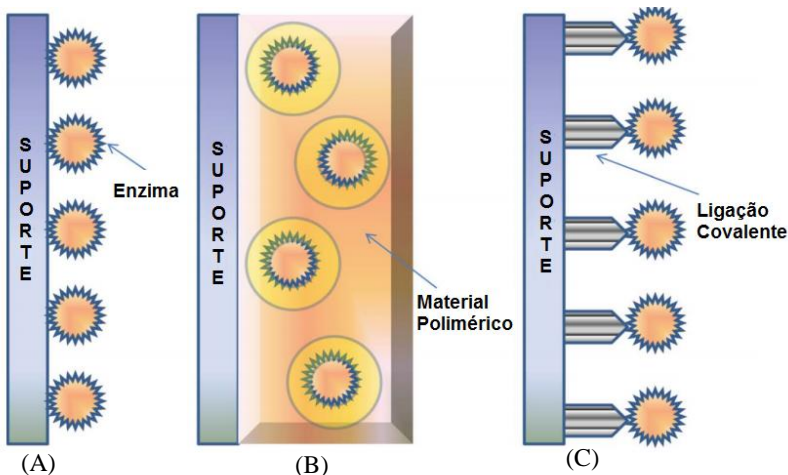
O uso da tecnologia para imobilizar enzimas ganhou impulso por várias razões. Uma das principais vantagens de imobilização é que ela permite reciclagem e re-utilização facilitada, o que melhora significativamente a viabilidade comercial da enzima. (GONÇALVES; OLIVEIRA; GONÇALVES, 2012; MATEO et al., 2007)

Os métodos de imobilização são utilizados como forma de proteger a enzima do meio orgânico, promovendo assim a manutenção ou aumento significativo da atividade catalítica. (KHALAF et al., 1996; SHELDON, 2007; SIÓDIAK; ZIEGLER-BOROWSKA; MARSZAŁŁ, 2013)

Além disso, outras vantagens associadas com a imobilização são a maior estabilidade em diferentes valores de pH e temperaturas (BRADY; JORDAN, 2009), facilidade de controle da reação e de separação do produto final. (GONÇALVES; OLIVEIRA; GONÇALVES, 2012; MARSAIOLI; PORTO, 2010)

A imobilização, tipicamente, envolve a fixação ou dispersão de uma enzima ou célula em um material insolúvel em solventes orgânicos para obter um sistema heterogêneo. Os principais métodos de imobilização são mostrados na **Figura 8**. (MOHAMAD et al., 2015)

**Figura 8.** Tipos mais comuns de imobilização de enzimas: (A) adsorção física, (B) aprisionamento e (C) ligação covalente/cross-linking.



Fonte: MOHAMAD et al., 2015

O método de adsorção física é relativamente simples e barato, não modifica quimicamente a enzima, mas tem limitações pelo fato da enzima lixiviar especialmente em solventes aquosos ou polares. Por isso, o método é mais adequado para a imobilização de lipases usadas em solventes orgânicos apolares. (BRADY; JORDAN, 2009)

A imobilização por aprisionamento consiste em “confinar” uma proteína em um polímero insolúvel (matriz polimérica) ou em microcápsula. A vantagem da utilização desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando assim a desnaturação. Contudo, a transferência de massa através da membrana pode ser um problema. (CABRAL, 2003; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; FABER, 2011)

Na imobilização por ligação cruzada as moléculas das enzimas estão covalentemente ligadas umas às outras por meio de reagentes bi- ou multifuncionais tais como o glutaraldeído, formando agregados insolúveis em água com alta massa molar (CLEs - *insoluble cross-linked enzymes*). Entretanto, esse método apresenta diversas desvantagens, tais como a baixa retenção da atividade e estabilidade mecânica, pouca reprodutibilidade, dificuldade no manuseio dos CLEs gelatinosos, ligação química com o sítio ativo, além do que a atividade catalítica da enzima pode ser afetada devido a problemas de difusão, uma vez que as moléculas do biocatalisador estão no interior da estrutura complexada, o que dificulta o acesso do substrato. (CHIBATA; TOSA, 1981; FABER, 2011; SHELDON, 2007)

A escolha da matriz é de grande importância para uma boa atuação do sistema com a enzima imobilizada. As características desejadas para um bom suporte são a área superficial grande, boa permeabilidade, características hidrofílicas, estabilidade química, mecânica e térmica, alta rigidez, forma e tamanhos adequados, resistência ao ataque de micro-organismos e poder ser re-utilizado. (CABRAL, 2003; MATEO et al., 2007; MILNER; MAGUIRE, 2012; MOHAMAD et al., 2015)

Como exemplos de suportes, podem-se citar as resinas acrílicas, caulinita, quitosana ativada com glutaraldeído, terra diatomáceas, carvão ativado, poli-álcool víniclo, celulose, carragenana, celite, poli-estireno e nanopartículas magnéticas, entre outros. (MARSAIOLI; PORTO, 2010; NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013; SHELDON, 2007)

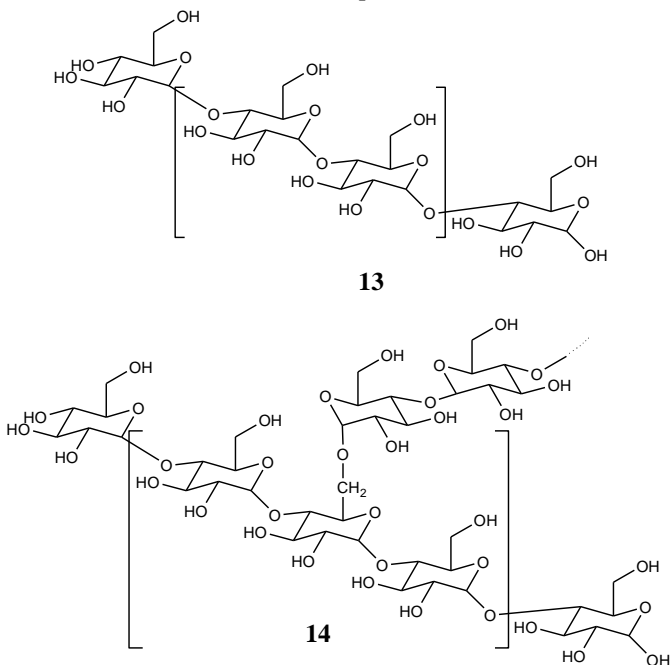
Neste trabalho, serão utilizados como suportes o ágar, fibras vegetais (bucha vegetal-*Luffa cylindrica*) e filme de amido de milho. Estes materiais serão descritos, a seguir.

### 1.3.1. Amido

O amido é um polissacarídeo heterogêneo composto essencialmente por dois polímeros de  $\alpha$ -D-glicose em proporções variadas, a amilose e a amilopectina. A proporção entre amilose e amilopectina é dependente da espécie vegetal, e do grau de maturação das plantas provenientes de uma mesma espécie. Geralmente a maioria dos amidos apresenta 10-20% de amilose e 80-90% de amilopectina. (KLAOCHANPONG et al., 2015; SOLOMONS; FRYHLE; WHEI, 2002)

A **Figura 9** apresenta as estruturas destes polímeros.

**Figura 9.** Estruturas da amilose (**13**) e amilopectina (**14**).



Fonte: SOLOMONS; FRYHLE; WHEI, 2002

A amilose é constituída por 500 a 2 mil monômeros de D-glicose unidos entre si por ligações do tipo  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 4, formando uma cadeia linear, que na forma cristalina apresenta uma conformação helicoidal. Esta conformação possibilita a formação de complexos de

inclusão com iodo (utilizado como indicador quantitativo de amilose e da presença de amido) e *n*-butanol, entre outros. (SOLOMONS; FRYHLE; WHEI, 2002)

A amilopectina é a fração altamente ramificada do amido. É também formada por unidades de D-glicose ligadas de forma  $\alpha 1 \rightarrow 4$ , porém com cadeias laterais unidas a principal de forma  $\alpha 1 \rightarrow 6$  a cada 24-30 resíduos de glicose. Pela maneira como está organizada, a conformação espacial é esférica. (SOLOMONS; FRYHLE; WHEI, 2002)

O amido é o principal polissacárido de reserva em plantas superiores e uma fonte de energia importante para os seres humanos e animais. Têm-se muitas aplicações industriais tais como adesivo, espessante, agente de coagulação, estabilizador coloidal ou agente de retenção de água. (LI et al., 2014)

Os géis de amido podem ser combinados com polióis (glicerol e/ou sorbitol) ou com outros polímeros e proteínas, formando uma massa amorfa que pode ser transformada em filmes e plásticos. (GARCÍA et al., 2011) O uso de polióis é importante para fornecer aos filmes maleabilidade, melhorando a rigidez e as propriedades mecânicas. Os géis, após desidratados originam películas rígidas, transparentes, brilhantes, resistentes e biodegradáveis. Na ausência de polímeros não fragmentáveis em sua fabricação, estas películas também podem ser chamadas de biofilmes. (LUCHESE et al., 2015; PAGNO et al., 2015)

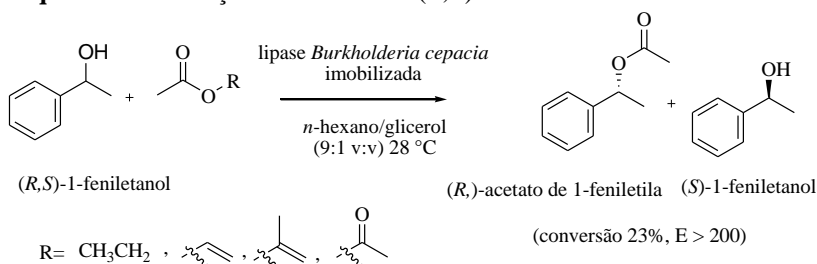
Na formação do filme, a amilose e a amilopectina formam ligações físicas cruzadas inter e intramoleculares para produzir uma rede macromolecular. Estas ligações são compostas principalmente por domínios microcristalinos de amilose. (TALJA et al., 2007) A rede formada nos filmes pode ser explorada para o “aprisionamento” de enzimas.

Hoffmann e *col.* utilizaram lipases de diferentes fontes na forma livre ou imobilizados em filme de amido de gengibre, na reação de resolução do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila e outros agentes acilantes. Os efeitos de vários parâmetros na resolução do (*R,S*)-1-feniletanol catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) imobilizada em filme de amido de gengibre (tipo do doador acila, razão molar álcool:doador acila, temperatura e solvente orgânico) foram avaliados (**Esquema 9**).

A eficiência catalítica da LBC imobilizada em blendas de amido de gengibre e poli (óxido de etileno), em diferentes composições, também foi estudada. Os acetato de vinila e o de *iso*-propenila

forneceram as maiores conversões (50%) e excessos enantioméricos em (*R*)-éster (> 99%). A razão molar álcool:doador acila e temperatura ótimas foram de 1:1 e 28 °C, respectivamente. A mistura de *n*-hexano/glicerol (9:1 v/v) foi a mais adequada para esta reação (conversão 23%, *E* > 200). A blenda de amido de gengibre/PEO (7:3 m/m) foi re-utilizada por seis vezes consecutivas. (HOFFMANN; SILVA; NASCIMENTO, 2011)

### Esquema 9. Resolução enzimática do (*R,S*)-1-feniletanol.



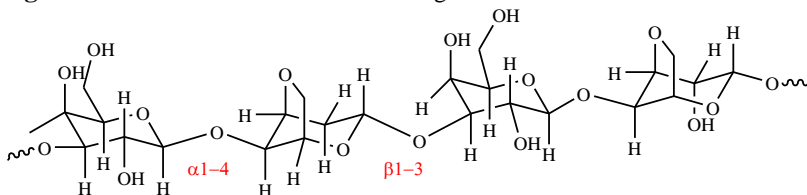
Fonte: HOFFMANN; SILVA; NASCIMENTO, 2011

### 1.3.2. Ágar

O ágar (mais corretamente nomeado de ágar-ágar) é um colóide hidrófilo extraído a partir da parede celular de certas algas da classe *Rhodophyceae*. Seu esqueleto é formado por unidades de  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3 D-galactose,  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4, 3,6-anidro-L-galactose e a agarosectina, que é a forma 3,6-anidro neutra (fração de agarose), e confere ao ágar o poder de gelificação elevado. (ARMISEN, 1995)

A **Figura 10** mostra a estrutura química dos monômeros do ágar.

**Figura 10.** Estrutura dos monômeros do ágar.



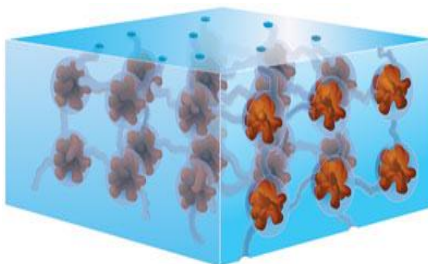
Fonte: ARMISEN, 1995



O ágar possui aplicação como agente de gelificação em alimentos e na indústria farmacêutica. É razoavelmente estável a ácidos, comparado com outros polissacarídeos e não apresenta qualquer reatividade com proteínas. O custo deste material, em comparação com os outros materiais, como nanopartículas, usados para a imobilização, é baixo. (MULAGALAPALLI et al., 2007)

O ágar utilizado como um suporte para enzimas é facilmente manuseado. A **Figura 11** mostra como as enzimas estão distribuídas no gel de ágar.

**Figura 11.** Figura ilustrativa de enzimas imobilizadas em gel de ágar.

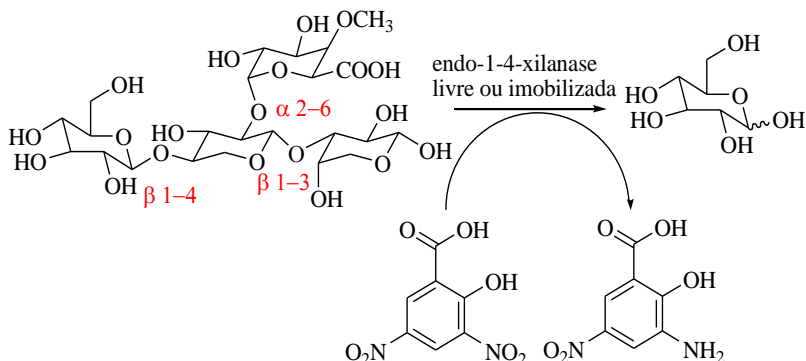


Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com>, disponível em outubro 2015.

Rehman e *col.* imobilizaram a pectinase de *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21 em ágar, utilizando o método de aprisionamento. Após imobilização, o tempo de reação aumentou de 5 para 10 min., a temperatura de 45 para 50 °C e o pH diminuiu de 10 para 9. O sistema enzima/ágar apresentou alta capacidade de re-utilização na reação de hidrólise da pectina. (REHMAN et al., 2014)

Em outro estudo, a enzima endo-1,4- $\beta$ -xilanasase foi imobilizada em ágar. As atividades catalíticas da enzima livre e imobilizada foram determinadas pela reação do açúcar redutor com o ácido 3'5'-dinitrossalicílico (DNS) na presença de xilana (substrato) (**Esquema 10**). A matriz de ágar auxiliou na manutenção da atividade da enzima em temperaturas mais altas e proporcionou uma estabilidade prolongada à temperatura em comparação com a forma livre. A endo-1,4-xilanasase imobilizada pode ser re-utilizada em 6 ciclos, demonstrando a viabilidade econômica do sistema. (BIBI et al., 2015)

**Esquema 10.** Reação do açúcar redutor com o ácido 3'5'- dinitrossalicílico (DNS) na presença de xilana (substrato).



Fonte: BIBI et al., 2015; BOBBIO; BOBBIO, 1989

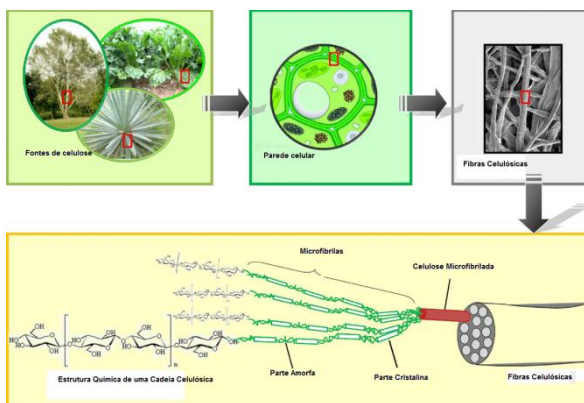
### 1.3.3. Fibras Vegetais

As fibras vegetais são compostas basicamente por celulose, hemicelulose, lignina e constituintes menores. Em geral, o teor de celulose varia entre 60-80%, o teor de lignina fica em torno de 5 -20%, enquanto que outras misturas variam cerca de 20%, exceto para algumas espécies de algodão, onde o teor de celulose pode ser de até 95%. (KLEMM et al., 2005; SAHEB; JOG, 1999)

A celulose, principal componente da parede celular da fibra, é um polissacarídeo linear constituído por um único tipo de unidade de açúcar. É o componente majoritário, perfazendo aproximadamente a metade das madeiras tanto coníferas como folhosas. A celulose pode ser caracterizada como um polímero de alta massa molar, constituído exclusivamente de unidades de  $\beta$ -D-glicose, que se ligam entre si através dos carbonos 1 e 4, formando um polímero linear. (LAVOINE et al., 2012) A **Figura 12**, mostra desde algumas fontes de celulose até a estrutura química.

As moléculas de glicose tendem a formar ligações de hidrogênio intramoleculares (entre unidades de glicose da mesma molécula) e intermoleculares (entre unidades de glicose de moléculas adjacentes). O primeiro tipo de interação é responsável por uma certa rigidez das cadeias unitárias, e a segunda pela formação da fibra vegetal. Assim, as moléculas de celulose alinham-se formando as microfibrilas, as quais formam as fibrilas que, por sua vez, se ordenam para formar as sucessivas paredes celulares das fibras. (SJÖSTRÖM, 1993)

**Figura 12.** Das fontes até as moléculas de celulose.



Fonte: LAVOINE et al., 2012

Suas longas cadeias e estruturas de malha tornam-na acessível à adsorção e a infiltração de macromoléculas. Além disso, há um grande número de grupos de hidroxilas que dão variabilidade química com alta reatividade doadora. Materiais celulósicos são geralmente hidrófilicos, insolúveis em água, estáveis a produtos químicos, não tóxicos, baratos e biodegradáveis, o que os tornam úteis para imobilização de enzimas. (KLEMM et al., 2005)

WU e *col.* modificaram a fibra da celulose para a imobilização da pectinase. A fibra de celulose foi oxidada com periodato de sódio para produzir grupos aldeídos e formar ligações covalentes com os grupos amino da pectinase. Comparado com a enzima livre, a pectinase acoplada em fibra de celulose oxidada apresentou melhor estabilidade e desempenho na redução da demanda catiônica de águas alcalinas, bem como boa capacidade de re-utilização. (WU et al., 2013)

A esponja vegetal derivada de plantas (*Luffa cylindrica*) é uma matriz de baixo custo, biologicamente disponível e renovável, produzida na maioria dos países tropicais e subtropicais. A esponja é feita de interconexões, com uma rede aberta de suporte fibroso (celulose) possibilitando o contato rápido das enzimas imobilizadas com o meio. Essa matriz é livre de materiais que possam ser tóxicos às enzimas, tem aplicação e técnica de operação simples e uma alta estabilidade durante longos períodos de uso repetido. (IQBAL et al., 2005; MELEIGY;

KHALAF, 2009) (OGBONNA et al., 1997; PARTAP et al., 2012) A **Figura 13** mostra a planta de *Luffa cylindrica* e seu fruto maduro e seco.

**Figura 13.** Planta de *Luffa cylindrica* e o seu fruto.



Fonte: <http://blog.ruralpecuaria.com.br/2011/05/bucha-vegetal-cultural-e-manejo.html> disponível em janeiro 2016

Moriwaki e *col.* imobilizaram células de *Bacillus firmus* cepa 37 e *Bacillus sphaericus* cepa 41 em bucha vegetal para a produção de ciclodextrinas (CDs). Ambos os micro-organismos produziram níveis significativos de ciclodextrina glicosiltransferase para três ciclos consecutivos com formação preferencial da  $\beta$ -CD, e inibição da formação de outras CDs. Os estudos mostraram também que a interação entre as células *Bacillus sphaericus* cepa 41 e a bucha vegetal ocorreu por adsorção. (MORIWAKI et al., 2014)

Sattari e *col.* imobilizaram a lipase de *Rhizopus oryzae* em bucha vegetal e utilizaram na síntese do oleato de etila (**11**) utilizando ácido oleico (**9**) como substrato modelo. As atividades da lipase nas reações de esterificação e hidrólise foram maiores quando a enzima foi imobilizada em comparação com a forma livre. Em 12 h de reação na presença de *n*-hexano, o produto foi obtido com 80% de rendimento. (SATTARI; VAHABZADEH; AGHTAEI, 2015)

Além de todas essas vantagens, a imobilização de enzimas é muito importante em reações de epoxidação utilizando peróxido de hidrogênio, pois um problema grave que ocorre na epoxidação mediada por lipases é a desativação da enzima por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (TÖRNVALL et al., 2009). Portanto, após imobilização a enzima estará protegida do meio reacional. Nesse sentido é muito importante a escolha do suporte, pois

este deve ser robusto, resistente ao  $H_2O_2$  e ter uma estrutura que permita o contato da enzima com o substrato sem desativá-la. Como já citado, inicialmente, a preparação de epóxidos é de interesse neste trabalho.

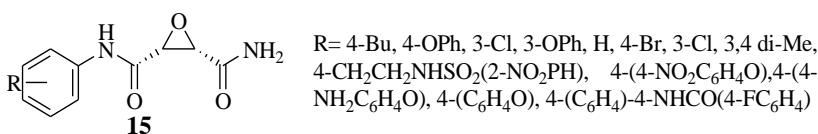
#### 1.4. EPÓXIDOS

Os epóxidos são éteres cíclicos formados por três átomos (C-O-C), também conhecidos como anéis oxiranos. Devido à tensão do anel e polaridade, os epóxidos são suscetíveis às reações com um grande número de nucleófilos, eletrófilos, ácidos, bases, agentes redutores e oxidantes. (MURPHREE; PADWA, 2006; POHLIT; FERRAZ, 1995)

Os epóxidos são uma matéria-prima importante em muitos processos industriais, encontrando aplicações em adesivos, polímeros, revestimentos e tintas (DE VRIES; JANSSEN, 2003), sendo ainda que alguns desses compostos exibem atividade biológica. (AVERY et al., 2015; LEBLANC et al., 2005).

Avery e *col.* descreveram uma série de compostos que contêm o ( $\pm$ ) *cis*-epóxido bisamida. Esses compostos mostraram um grande potencial *in vitro* na inibição do fator FXIII-A. Inibidores do fator XIII-A impedem a produção de coágulos poliméricos reticulados no plasma evitando doenças graves como trombose, arterosclerose e doenças cardíacas coronárias. (AVERY et al., 2015) (**Figura 14**)

**Figura 14.** Derivados do ( $\pm$ ) *cis*-epóxido bisamida utilizados no teste *in vitro* na inibição do fator FXIII-A.



Fonte: AVERY et al., 2015

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.

Muitos metais são utilizados como catalisadores. Entre os mais 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. De especial importância catalítica são titânio (IV), vanádio (V), molibdênio (VI) e o tungstênio (VI). Esses metais atuam como 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. (OSTOVIC; BRUICE, 1992)

A **Tabela 2** mostra uma lista de alguns agentes oxidantes utilizados para a epoxidação de olefinas.

**Tabela 2.** Oxidantes geralmente utilizados em reações de epoxidação. (CHUA; XU; GUO, 2012)

Oxidante	Nome Químico	O <sub>2</sub> Ativo (%)	Sub-produtos
PhIO	Iodosil benzeno	7,3	PhI
NaIO <sub>4</sub>	Periodato de sódio	7,5	NaIO <sub>3</sub>
Me <sub>3</sub> SiOOSiMe <sub>3</sub>	Peróxido de bis(trimetilsilil)	9,0	Me <sub>3</sub> SiOOSiMe <sub>3</sub>
<i>m</i> ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COOOH	Ácido <i>meta</i> -cloro <i>per</i> -benzóico	9,3	<i>m</i> -ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COOH
KHSO <sub>5</sub>	Peroxi monossulfato de potássio	10,5	KHSO <sub>4</sub>
C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> (NMO)	Betaína	13,7	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO(NMO)
NH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Uréia peróxido hidrogênio	16,0	NH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O
<i>t</i> -BuOOH	Hidroperóxido de <i>terc</i> -butila	17,8	<i>t</i> -BuOH
CH <sub>3</sub> COOOH	Ácido per-acético	21,1	CH <sub>3</sub> COOH
NaOCl	Hipoclorito de sódio	21,6	NaCl
CrO <sub>3</sub>	Trióxido de crômio	24,0	Sais de Cr(III)
HNO <sub>3</sub>	Ácido nítrico	25,0	NOx
KMnO <sub>4</sub>	Permanganato de potássio	30,4	Sais de Mn(II)
O <sub>3</sub>	Ozônio	33,3	O <sub>2</sub>
N <sub>2</sub> O	Óxido nitroso	36,4	N <sub>2</sub>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio	47,1	H <sub>2</sub> O
O <sub>2</sub>	Oxigênio molecular	100,0	Nada ou H <sub>2</sub> O

Fonte: CHUA; XU; GUO, 2012

Apesar do oxigênio molecular ter o maior teor de oxigênio ativo, ele normalmente não é utilizado como um agente oxidante para a oxidação ou epoxidação porque a transferência de massa de uma fase gasosa para uma líquida requer elevadas pressões, sendo assim menos eficiente. Alguns doadores de oxigênio, tal como o CrO<sub>3</sub> não têm sido relatados como oxidantes adequados devido ao rearranjo fácil (com abertura de anel) e a continuação da oxidação do epóxidos. (MIYAURA; KOCHI, 1983)

O peróxido de hidrogênio é o oxidante mais utilizado para a epoxidação devido ao baixo custo, facilidade de utilização e é livre da

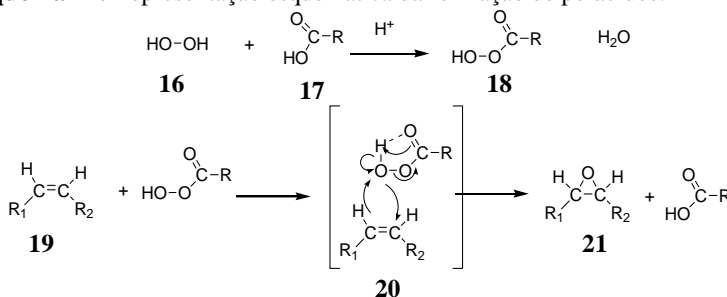
poluição de efluentes pós reação, pois seu sub-produto é a água. (TUNDO; ESPOSITO, 2008)

Alguns hidroperóxidos orgânicos, tais como hidroperóxido de *tert*-butila (TBHP) e ureia peróxido de hidrogênio (UPH), também são amplamente utilizados como reagentes de epoxidação. Estes compostos são geralmente estáveis e mais hidrofóbicos, o que os tornam mais compatíveis com alguns substratos, reduzem a abertura do anel e permitem uma maior solubilidade em solventes orgânicos. (ANKUDEY; OLIVO; PEEPLES, 2006)

O peróxido de hidrogênio e/ou seus derivados juntamente com anidrido ou ácido carboxílico formam os perácidos ou peróxi-ácidos. 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 (**18**). (POHLIT; FERRAZ, 1995)

A ligação oxigênio-oxigênio do perácido é fraca (cerca de 35kcal/mol) e, portanto, tende a apresentar uma conformação com ligações de hidrogênio intramoleculares em solução. O grau de polarização elevado resulta em um átomo de oxigênio eletrofílico que é capaz de ser adicionado a alcenos e formar epóxidos. Na presença do catalisador ácido, a epoxidação ocorre em uma única etapa com um estado de transição, como mostrado no **Esquema 11**. No estado de transição **20**, o oxigênio é adicionado e o próton é deslocado simultaneamente. Essa reação é conhecida como "Reação de Prilezhaev". (CHUA; XU; GUO, 2012)

**Esquema 11.** Representação esquemática da formação de perácidos.

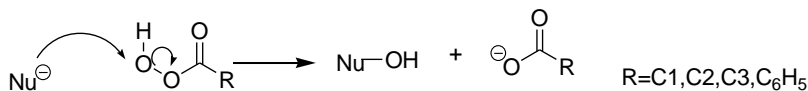


Fonte: CHUA; XU; GUO, 2012

Os perácidos 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. (**Esquema 12**).

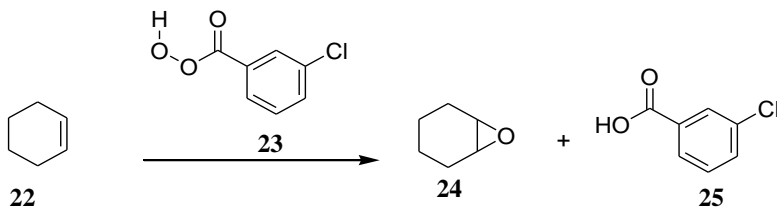
**Esquema 12.** Ataque nucleofílico ao oxigênio do perácido.



Fonte: CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012

Um dos peróxi-ácidos mais reativos é o ácido peróxi-trifluoroacético. Entretanto, o perácido mais comumente usado é o ácido *meta*-cloroperóxibenzóico conhecido como *m*-CPBA, que reage com olefinas para formar epóxidos. (**Esquema 13**).

**Esquema 13.** Reação do ciclo-hexeno com ácido *meta*-cloroperbenzóico **23** para formação do epóxi-ciclo-hexeno.



Fonte: CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012

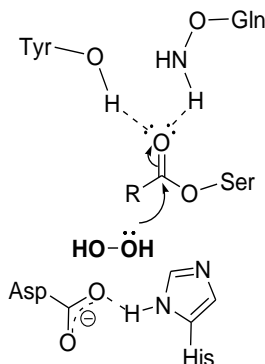
A natureza tóxica desses reagentes e o potencial para hidrolisar o epóxido dificulta o uso em grande escala. Juntamente com as questões de segurança, a geração de grandes quantidades de sub-produtos clorados e de resíduos ácidos, esses métodos tornam-se desvantajosos.

No início da década de 90, Björkling, Godtfredsen e Kirk descreveram o uso de lipases na peridrólise dos ácidos carboxílicos na presença de peróxido de hidrogênio. (BJORKLING; GODTFREDSSEN; KIRK, 1990)

O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) reage com o complexo acil-enzima, formado pelos ácidos graxos e pelo grupo hidroxila da serina no sítio ativo, para formar os peróxi-ácidos correspondentes, como apresentado no **Esquema 14**. (FABER, 2011)



**Esquema 14.** Ataque nucleofílico de  $H_2O_2$  ao complexo acil enzima.

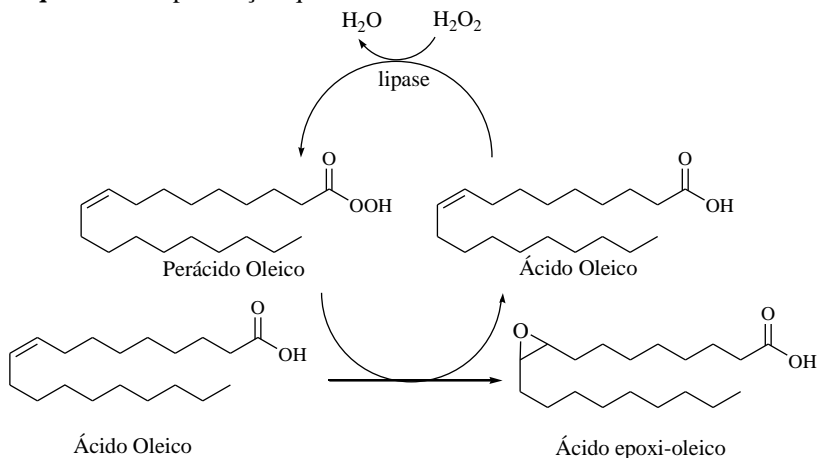


Fonte: Adaptado de FABER, 2011

Desde essa época, o uso de lipases na epoxidação quimio-enzimática de ligações duplas tem sido amplamente utilizada. (ANKUDEY; OLIVO; PEEPLES, 2006; DA SILVA et al., 2013) A simplicidade do processo e eficiência da reação em temperatura e pressão normais permitem que a oxidação de ligações duplas, ocorra *in situ*. Nessa reação, não há necessidade de isolar o perácido, e além disso a re-utilização do biocatalisador tem mostrado vantagens significativas para todo o processo. (MOREIRA; NASCIMENTO, 2007)

Corrêa e *col.* realizaram a auto-epoxidação do ácido oleico utilizando a lipase PSC-I Amano como biocatalisador na reação (**Esquema 15**). Vários parâmetros foram avaliados, e o melhor resultado foi obtido após 3h, a 55°C, utilizando 10% de enzima e 0,2% de peróxido de hidrogênio a 150 rpm. Nestas condições, o epóxido foi obtido com 88% de rendimento. (CORRÊA et al., 2012)

A epoxidação enzimática pode ser realizada em solvente orgânico (KLAAS; WARWEL, 1996), em sistema sem solvente (HAGSTRÖM et al., 2011) ou na presença de líquidos iônicos (LIs). (SILVA et al., 2011)

**Esquema 15.** Epoxidação químio-enzimática do ácido oleico.

Fonte: CORRÊA et al., 2012

## 1.5 SOLVENTES E LÍQUIDOS IÔNICOS

Está bem estabelecido na literatura que solventes com maiores valores de  $\log P$  são melhores em biocatálise. 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. Considera-se que os solventes com  $\log P > 4,00$  (não polares) são os mais eficientes para estas reações. 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. (LAANE et al., 1987)

Para reações de epoxidação quimio-enzimática, solventes hidrofílicos são conhecidos por diminuir a velocidade de reação (devido à sua tendência para remover a água ligada da enzima e também através da interferência com as ligações de hidrogênio intra-moleculares do peróxido formado), enquanto solventes clorados e aromáticos (por exemplo, tolueno) são mais adequados para esse tipo de reação (SIENEL; RIETH; ROWBOTTOM, 2000).

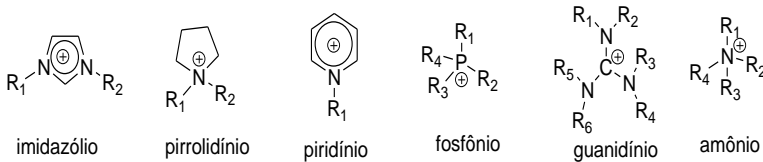
Além de fazer parte dos processos, o uso de solventes ajuda a manter a homogeneidade do sistema, auxilia na mistura e também atua como um dissipador de calor para reações exotérmicas (LANCASTER;

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY (GREAT BRITAIN), 2010). Geralmente os solventes são compostos orgânicos voláteis, e o uso dos mesmos fere os postulados da química verde no processo biocatalítico. Abordagens livres de solvente para epoxidação quimio-enzimática tem sido usadas tanto com o excesso do reagente como "solvente" (KLAAS; WARWEL, 1996), ou com o uso alternativo de líquidos iônicos (SILVA et al., 2011) ou de lactonas (XU; KHAW; LI, 2009).

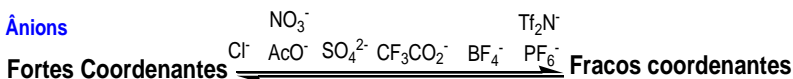
Os líquidos iônicos (LIs) são compostos formados de íons, sendo a maioria líquidos à temperatura ambiente ou muito abaixo desta. São formados por um cátion, geralmente orgânico e um ânion. A **Figura 15** mostra as estruturas de alguns LIs comumente usados em biocatálise.

**Figura 15.** Cátions e ânions comumente usados nos LIs.

### Cátions



### Ânions



cloreto, nitrato, acetato, sulfato, trifluoroacetato, tetrafluoroborato, hexafluorofosfato, bis(trifluorometano sulfonil) amida

Fonte: VAN RANTWIJK; SHELDON, 2007

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, interações múltiplas, solvatação de compostos orgânicos e inorgânicos, propriedades químicas e térmicas de excelente estabilidade, e alta condutividade iônica e eletroquímica. (MAI; AHN; KOO, 2014; VAN RANTWIJK; SHELDON, 2007)

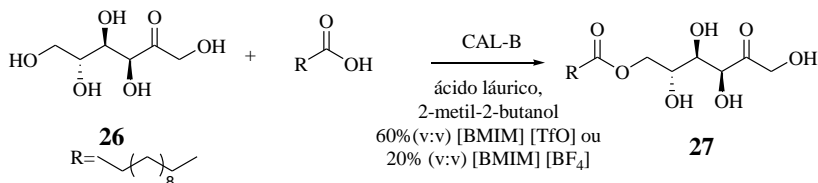
Além disso, as propriedades físico-químicas tais como a viscosidade, hidrofobicidade, densidade e solubilidade podem ser modificadas, simplesmente selecionando diferentes combinações de

cátions e ânions, bem como substituintes ligados para obter LIs para demandas específicas. (MONIRUZZAMAN et al., 2010)

Todas essas combinações interessantes de propriedades deram início a várias aplicações incluindo a extração, síntese orgânica, catálise, síntese inorgânica, síntese de nanomateriais e em reações enzimáticas. (MONIRUZZAMAN et al., 2010)

Li e *col.* utilizaram os LIs como co-solventes na síntese seletiva da frutose mono-acilada catalisada pela lipase de *Cândida antarctica* (CAL-B) usando ácido láurico como agente acilante e 2-metil-2-butanol como solvente (**Esquema 16**). Foram utilizados LIs à base de 1-butil-3-metil-imidazólio. Quando foi utilizado 60% do LI usando o ânion trifluorometanosulfonato [BMIM][TfO] (v/v) e 20% do LI com o ânion tetrafluoroborato [BMIM][BF<sub>4</sub>] (v/v), o mono laurato de frutose foi obtido com rendimento de 85% e 78%, respectivamente. (LI et al., 2015)

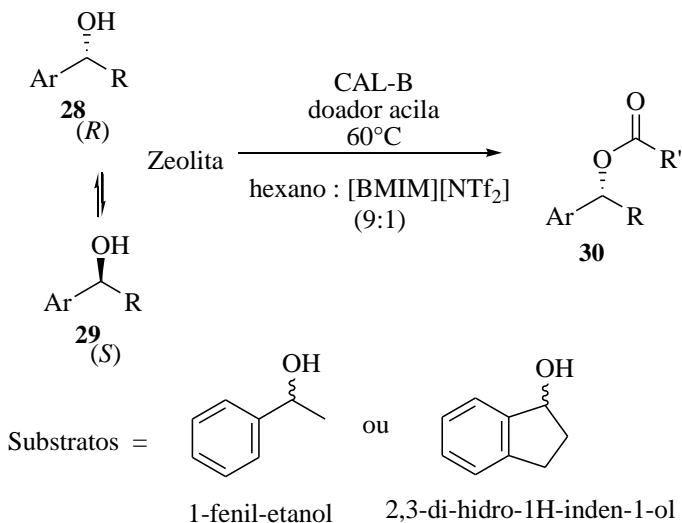
**Esquema 16.** Mono-acilação da frutose utilizando usando ácido láurico como agente acilante e 2-metil-2-butanol como solvente e LIs como co-solventes.



Fonte: LI et al., 2015

Shimmura e *col.* utilizaram a mesma lipase (CAL-B) combinada com uma zeólita na resolução de dois álcoois (1-feniletanol e 2,3-di-hidro-1H-inden-1-ol) com octanoato de vinila ou pentanoato de *p*-clorofenila como doadores acilas em um sistema misto de hexano/bis(trifluorometilsulfonil)-imida de 1-butil-3-metil-imidazólio [BMIM][NTf<sub>2</sub>] 9:1 (v/v) na presença de 1,0 eq. de água. (**Esquema 17**) Os resultados mostraram que os dois álcoois secundários foram obtidos com sucesso na forma opticamente pura e com elevado rendimento, sendo > 70%. (SHIMOMURA et al., 2015)

**Esquema 17.** Reação do 1-feniletanol e 2,3-di-hidro-1H-inden-1-ol como substratos modelos, utilizando a CAL-B, na presença de zeolita em sistema de solvente/LIs.



Fonte: SHIMOMURA et al., 2015

Os epóxidos podem ser derivados a partir de compostos sintéticos ou de produtos naturais, como óleos vegetais. O aumento das preocupações ambientais têm estimulado o uso dos os óleos vegetais como uma alternativa atrativa para a produção de materiais à base de epóxi. Como as plantas são recursos bio-renováveis, estes podem ser usados para reduzir o impacto de produtos sintéticos no meio ambiente.

Uma classe especial de óleos vegetais, e mais especificamente os chamados óleos essenciais, são os terpenos e estes serão usados neste trabalho.

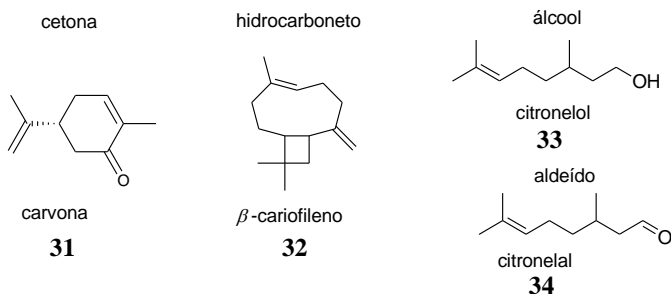
### 1.5. TERPENOS

Quimicamente, os terpenos são compostos derivados do isopreno (2-metil-1,3-butadieno). A maioria deles contém 10, 15, 20 ou 30 átomos de carbono. (SOLOMONS; FRYHLE; WHEI, 2002; TEMPLETON, 1969)

Além da estrutura isoprênica, os terpenos podem conter outros átomos (por exemplo, o oxigênio) e diversos grupos funcionais tais como álcoois, cetonas e aldeídos, sendo então chamados de terpenóides.

A **Figura 16** mostra exemplos de alguns terpenos. (SOLOMONS; FRYHLE; WHEI, 2002)

**Figura 16.** Exemplos de terpenos e terpenóides pertencentes a diferentes classes de compostos orgânicos.



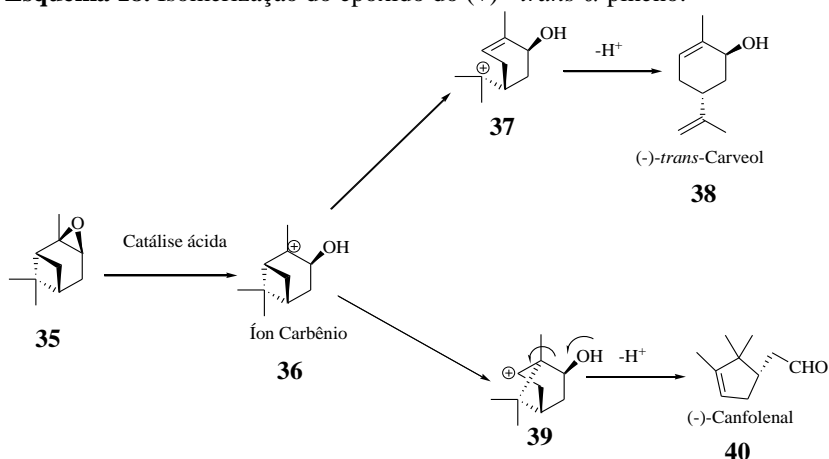
Fonte: SOLOMONS; FRYHLE; WHEI, 2002

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. O termo foi inicialmente usado para todos os compostos voláteis oleosos, imiscíveis em água e geralmente com cheiros de resina das plantas. Atualmente, estes compostos são a base de muitos perfumes, detergentes, aromas, agroquímicos e substâncias terapêuticas. (TEMPLETON, 1969)

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 outros materiais comercialmente importantes. (SURBURG et al., 2006)

Por exemplo, o epóxido do  $\alpha$ -pineno é um intermediário chave na síntese de sabores, aromas, e agentes terapêuticos, e também pode ser isomerizado a fragrâncias mais valiosas, tais como aldeído canfolênico e *trans*-carveol. (MONTEIRO; VELOSO, 2004; MOTHERWELL et al., 2004) Estes produtos estão comercialmente disponíveis como uma mistura de isômeros, e a obtenção de frações puras é de grande interesse. O canfolenal é aplicado como aditivo, amaciante, ingrediente de detergente, fragrância, e precursor na síntese de fragrâncias (naturanol, santalol, polisantol, ebanol, etc). O **Esquema 18** mostra o procedimento da reação e como o epóxido do  $\alpha$ -pineno é comercialmente interessante devido à reatividade elevada e suscetibilidade alta em relação a vários catalisadores. (GOLETS; AJAIKUMAR; MIKKOLA, 2015)

**Esquema 18.** Isomerização do epóxido do (+) - *trans*- $\alpha$ -pineno.



Fonte: GOLETS; AJAIKUMAR; MIKKOLA, 2015

Dentre os terpenos destaca-se o  $\beta$ -cariofileno, que foi usado neste trabalho.

### 1.6. $\beta$ -CARIOFILENO COMO SUBSTRATO

O  $\beta$ -cariofileno é um sesquiterpeno presente em produtos naturais como 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.

Por exemplo, o aroma e o sabor característicos de pimenta são fornecidos pelas componentes do seu óleo essencial, tais como  $\beta$ -cariofileno, limoneno,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -felandreno,  $\delta$ -3-careno, sabineno,  $\beta$ -bisaboleno,  $\alpha$ -pineno, eugenol, terpinen-4-ol, hedicariol,  $\beta$ -eudesmol,  $\alpha$ -humuleno, zingibereno, elemicina, bulnesol, óxido de cariofileno e cubenol. (JELEŇ; GRACKA, 2015)

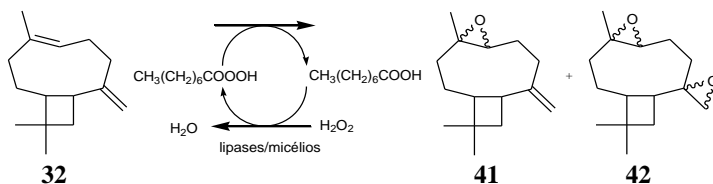
Além disso, o  $\beta$ -cariofileno é frequentemente usado em cosméticos, e é um aditivo alimentar. É um componente do extrato da *Cannabis sativa* (Sativex), uma droga aprovada nos países europeus e no Canadá (SIBBALD, 2005). Apresenta também atividade anti-inflamatória (HORVÁTH et al., 2012), efeito antioxidante (KUBO et al., 1996; SINGH et al., 2006), anti-espasmódico (LEONHARDT et al., 2010), anti-viral (ASTANI; REICHLING; SCHNITZLER, 2011), e os efeitos dos anestésicos locais. (GHELARDINI et al., 2001)

Pavela e *col.* avaliaram 122 espécies de plantas como larvicidas botânicos. As espécies que apresentaram bons resultados continham na sua composição majoritariamente substâncias do grupo sesquiterpenos entre eles o  $\beta$ -cariofileno. (PAVELA, 2015)

O  $\beta$ -cariofileno é também um ingrediente de perfumaria usado em cosméticos decorativos, perfumes finos, xampus, sabonetes e outros produtos de higiene pessoal, bem como em produtos não-cosméticos, tais como os de limpeza e detergentes. Seu uso em todo o mundo é de aproximadamente 0,1 toneladas por ano. (BHATIA et al., 2008)

Quimicamente, o  $\beta$ -cariofileno é 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 os agentes oxidantes. Devido a diferenças na reatividade, é possível que ocorra a formação do mono-epóxido (**41**) e/ou di-epóxido (**42**). (**Figura 17**)

**Figura 17.** Epoxidação quimio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno.



Fonte: desenvolvido pelo autor

A funcionalização de terpenos, tais como o  $\beta$ -cariofileno, mediada por lipases representa uma maneira importante para a valorização dos produtos naturais que formam compostos biologicamente ativos tais como anti-fúngicos, (CHANG et al., 2008) anti-bactericidas, (MAGIATIS et al., 2002) anti-inflamatórios, (CHAVAN; WAKTE; SHINDE, 2010) anti-inseticidas, (SILVA et al., 2008) e com atividades citotóxicas. (MONZOTE et al., 2009)

Park e *col.* investigaram se óxido de  $\beta$ -cariofileno apresenta efeitos anti-câncer. Eles observaram que epóxido do  $\beta$ -cariofileno pode potencializar significativamente os efeitos apoptóticos de vários inibidores farmacológicos quando utilizados em combinação em células tumorais. (PARK et al., 2011)



Apesar do mono-epóxido do  $\beta$ -cariofileno ser um fármaco atraente e um composto agrícola, a sua origem é limitada a partir de algumas plantas como erva-cidreira (*Melissa officinalis*), eucalipto, (*Melaleuca stypheloides*) e plantas dos gêneros *Calocedrus*, *Achillea* e *Heteropyxis*.(CHANG et al., 2008; CHAVAN; WAKTE; SHINDE, 2010; MAGIATIS et al., 2002; MONZOTE et al., 2009; SILVA et al., 2008)

Nesse sentido é importante buscar rotas sintéticas eficientes, seletivas e ambientalmente corretas para a obtenção do mono-epóxido do  $\beta$ -cariofileno. A epoxidação químio-enzimática destaca-se nesse sentido, pois ocorre em condições brandas e com conversões seletivas a um único produto.

Da Silva e *col.* avaliaram a influência de diversos parâmetros (enzima, agente oxidante, solvente, doador acila, entre outros) na epoxidação químio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno utilizando a lipase de *C. antarctica* (CAL-B) imobilizada em resina aniônica na tentativa de obter apenas o mono-epóxido como produto. (DA SILVA et al., 2013)

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. A partir dessas considerações teóricas, a seguir serão apresentados os objetivos deste trabalho.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Utilizar lipases de várias procedências livres ou imobilizadas em materiais poliméricos e micélios como catalisadores em reações de peridrólise de ácidos carboxílicos para formação dos respectivos perácidos e a utilização destes na oxidação *in situ* do  $\beta$ -cariofileno.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Imobilizar lipases de diversas procedências em gel de ágar e utilizá-las na epoxidação químio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno.
- Analisar o efeito do tempo, temperatura, velocidade de agitação, meio orgânico e influência dos Líquidos iônicos (LIs) na reação de epoxidação usando a lipase de *Rhizopus oryzae* (F-AP15) imobilizada em gel de ágar.
- Imobilizar a lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) em gel de ágar, bucha vegetal e filme de amido de milho.
- Caracterizar os suportes com e sem lipase através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), análise termogravimétrica, área superficial e determinar o teor de água por titulação Karl Fischer.
- Obter seletivamente o mono-epóxido do  $\beta$ -cariofileno.
- Avaliar a influência do solvente orgânico e de LIs derivados do 1-butil-3-metil imidazólio [BMIM][X] onde X=  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{PF}_6^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$  e da temperatura utilizando a LBC imobilizada nos três suportes, na epoxidação químio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno e em reações de esterificação e transesterificação.
- Analisar o efeito do solvente orgânico na lixiviação da LBC imobilizada em bucha vegetal nas reações de epoxidação e esterificação.
- Cultivar micélios a partir das cepas oriundas da região Amazônica.
- Preparar o epóxido derivado do  $\beta$ -cariofileno, na presença de micélios.
- Comparar e correlacionar os dados obtidos com os descritos na literatura, incluindo reações de esterificação e transesterificação.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. REAGENTES E MICRO-ORGANISMOS

Os reagentes utilizados nesse trabalho foram:

- **Carlo Erba:** acetona (99,5%);
- **Chemis:** éter etílico (98%);
- **F. Maia:** tetrahydrofurano (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%), asparagina;
- **Grupo Química:** acetato de etila (99,8%), *N,N*-dimetilformamida (99%), dimetilsulfóxido (99%);
- **ISO FAR:** ágar
- **Neon:** nitrato de ferro (III);
- **Nuclear:** sulfato de magnésio anidro;
- **Reagen:** glicose, sulfato de manganês;
- **Salada:** óleo de girassol;
- **Sigma-Aldrich:**  $\beta$ -cariofileno (80%), tetrametilsilano (TMS), clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>); hidrocloreto de tiamina; brometo de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][Br] (99%), iodeto de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][I] (99%), octil sulfato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][SO] (99%)
- **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 (99,5%), 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 60 G 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), *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, 1638U/g<sup>3</sup>; PS Amano SD, 23.000 U/g; PS Amano-30.000U/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, 30.000u/g<sup>5</sup>); *Pseudomonas fluorescens* (AK, 25.000 U/g), *Aspergillus niger* (A Amano12, 120.000u/g) e de *Mucor javanicus* (M Amano10, 10.000u/g).

Foram também usados os 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>ra</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Patricia Zanotto do Laboratório de Bioorgânica da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus-AM.

As três lipases nativas de *A.niger* (LAN18, 2U/mL<sup>6</sup>), *Rhizopus oligosporus* (LRO 14,9U/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>ra</sup>. Dr<sup>a</sup> Patrícia O. Carvalho (USF-Bragança Paulista-SP).

---

<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)).

<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.

## 3.2. EQUIPAMENTOS

### 3.2.1. Laboratórios de Biocatálise (301 e 306)

- ✓ Agitadores magnéticos (Dist)
- ✓ Rota evaporador (Buchi 461)
- ✓ Balanças analíticas Marte A 500)
- ✓ Agitador rotatório ou orbital (Certomat MO)
- ✓ Banho termostatzado (Micro Química - MQBTC9920).
- ✓ Banho tipo Dubnoff (Tecnal - TE0532).
- ✓ Banho ultrassom (Thorton - T1440).
- ✓ Cromatografo a gás (CG Agilent Tecnologia 7820 A), equipado com coluna apolar (Shimadzu CPB-5-M25-025m)

### 3.2.2. Central de Análises no DQ-UFSC

- ✓ Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (400 MHz) e carbono (100 MHz) foram obtidos no espectrômetro Varian, utilizando como referência interna o tetrametilsilano (TMS,  $\delta = 0,00$ ). Como solvente foi o utilizado clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ).

### 3.2.3. Outros Laboratórios

- ✓ Analisador de área de superfície NOVA modelo 2200E Quantachrome Instruments. (Laboratório de Fenômenos Interficiais-coordenado pelo Prof. Dr Faruk Nome).
- ✓ Aparelho da Shimadzu equipado com módulo TGA-50 (Laboratório de Síntese de Cristais Líquidos coordenado pelo Prof. Dr. Hugo Gallardo Olmedo)
- ✓ Shaker Innova 44 (laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras (DB-UFSC) coordenado pelo Prof. Dr Boris U.Stambuck).

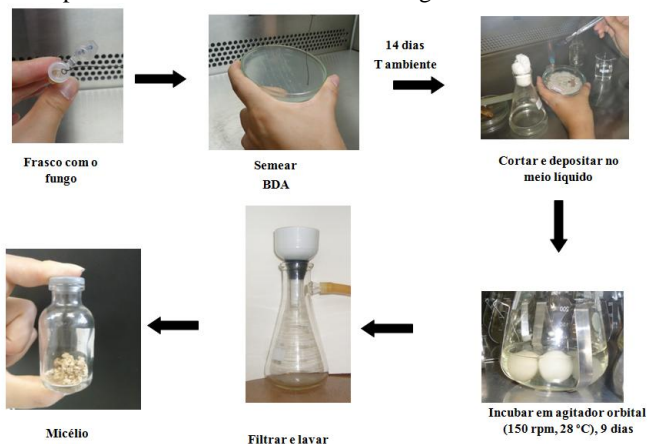
### 3.3. MÉTODOS EXPERIMENTAIS

#### 3.3.1. Cultivo do Micélio UEA\_06

Em um béquer de 1L foram adicionados 250 mL de água destilada e 50 g de batata picada. As batatas foram cozidas durante 20 minutos. Após resfriada, a solução foi filtrada com gaze. Foram adicionados ao caldo 5 g de dextrose e água suficiente para completar 500 mL, o pH foi ajustado para 5,8 e posteriormente foram acrescentados 3,75 g de ágar. Em seguida, a solução foi esterilizada em 121°C a 1 atm por 15 minutos em autoclave. O meio de cultura foi vertido ainda líquido, sobre a placa de Petri esteril.

Sobre o meio de cultura sólido, foi semeado o fungo. Este foi cultivado por aproximadamente 14 dias. Depois de decorrido este tempo, o sólido foi cortado em cubos com aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> e depositados em um meio líquido sintético contendo 1,2 g de asparagina, 1,2 g de glicose, 5,8 mg de Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,6 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,3 g de MgSO<sub>4</sub>, 3 mg de hidrócloro de tiamina, 0,14 mg de MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O e 2% (v/v) de óleo de girassol. Esse meio, foi usado para induzir a produção de lipases (GHANEM, 2007), e foi incubado em temperatura ambiente por 3-9 dias em Shaker Innova 44 com temperatura controlada (28°C). Os micélios do fungo foram coletados do meio de cultura, filtrados a vácuo, lavados com água e acetona, secos por 48 h em um dessecador e pesados posteriormente. (**Figura 18**)

**Figura 18.** Etapas usadas no crescimento dos fungos.



Fonte: desenvolvido pelo autor

### **3.3.2. Imobilização de Lipases em Gel de Ágar**

Em um béquer de 100 mL foram adicionadas 0,4 g de ágar, 1 mL de água, e o sistema foi deixado no ultrassom por 3 min. Depois de 3 min completou-se com 8 mL de água fervente ( $\approx 100$  °C). Quando a mistura tornou-se transparente, deixou-se gelificar, até atingir uma temperatura de aproximadamente 30°C, e em seguida adicionou-se de 30 ou 50 mg das lipases F-AP15, LBC ou outras, dissolvidas em 2 mL de água. Após o resfriamento obteve-se um gel consistente e com auxílio de uma espátula este foi passado por uma peneira fina sem granulometria definida, obtendo-se assim pedaços pequenos de gel de ágar com enzima. Os pedaços de gel foram guardados em solvente orgânico, para uso posterior. Foi também preparado um gel controle, conforme o procedimento acima, mas sem a lipase.

### **3.3.3. Preparação do Filme de Amido de Milho/Dextrana e Imobilização de Lipases**

Inicialmente, 0,8 g de amido de milho e 0,2 g de dextrana foram colocados em um béquer de 50 mL. A mistura foi dissolvida em 15 mL de água destilada e, em seguida, adicionado 0,3 g de sorbitol. A solução formada foi mantida sob agitação magnética e aquecimento a cerca de 55°C durante 35 min. Depois de esfriar à temperatura ambiente, foi adicionada 30mg de LBC e o sistema foi agitado durante mais 10 min. A solução foi transferida para uma placa de Petri e colocada na capela para a evaporação de água ( $\sim 24$  h). O filme contendo a enzima imobilizada foi então cortado em pedaços pequenos e transferidos para um Erlenmeyer de 150 mL contendo o solvente. Foi também preparado um filme controle, conforme o procedimento acima, mas sem a lipase.

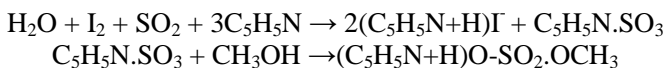
### **3.3.4. Imobilização das Lipases em Bucha Vegetal**

Primeiramente a bucha vegetal (BV) foi colocada em uma solução de  $H_2O_2$  durante 24 h, seca e cortada em pequenos discos ( $\sim 1$  cm<sup>3</sup>). Em seguida, foi adicionada 30 mg de LBC a 25 mL de solução tampão de fosfato de potássio (pH 7,2). A solução foi colocada sobre a esponja vegetal (0,5 g) em uma placa de Petri e deixou-se secar à temperatura ambiente por  $\sim 24$ h. O sistema BV/lipase está pronto para uso nas reações biocatalisadas.

### 3.3.5. Caracterização dos Suportes

#### 3.3.5.1 Determinação da Água nos Suportes por Titulação de Karl Fischer

A quantidade de água presente nos suportes mediante evaporação à temperatura ambiente foi determinada por titulação pelo método de Karl Fischer, com base na determinação quantitativa de água em uma solução anidra de dióxido de enxofre e iodo (633 titulador automático Karl Fischer da Metrohm AG, CH-Herisau 9100). O método baseia-se na determinação quantitativa de água em uma solução anidra de dióxido de enxofre e iodo. (MORITA, 2007).



As quantidades de água foram expressas em porcentagem (%).

#### 3.3.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias dos suportes foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM-6390LV, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica. Os filmes e as buchas com ou sem lipases foram colocadas em suporte metálico (stub), as amostras foram fixadas no suporte com fitas dupla-face de C, Au e posteriormente analisadas (ampliações de 100, 250x e 500x).

#### 3.3.5.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise Termogravimétrica (TGA) foi realizada no Laboratório de Síntese de Cristais Líquidos e Materiais Moleculares. A amostra foi submetida sob ar sintético (atmosfera oxidante) – 20 mL/min, em uma panela pequena de platina, aquecimento de 30 °C a 900 °C, com uma taxa de 10 °C/min.

#### 3.3.5.2 Determinação da Área Superficial

A área superficial foi realizada utilizando analisador de área de superfície NOVA modelo 2200E Quantachrome Instruments. A determinação foi realizada utilizando uma massa de cerca de 0,094 g BV a uma temperatura de 196°C por adsorção e dessorção de azoto na



amostra em condições de pressão de vácuo a 0,100 mmHg. Esta análise foi realizada no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interficiais.

### 3.3.6. Preparação e Purificação dos Padrões (via química)

Os epóxidos derivados do terpeno  $\beta$ -cariofileno usados como padrões foram obtidos utilizando 1,5 mmol dos substratos, 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 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. 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 dos epóxidos foram comparados com a literatura.

### 3.3.7. Epoxidação Químio-Enzimática do $\beta$ -Cariofileno

Em uma reação típica de epoxidação quimio-enzimática, foram utilizados 0,6 mL (2,5 mmol) do substrato, 30-50 mg de lipase (imobilizada ou não) ou 100 mg de micélios, 5 mmol de peróxido de hidrogênio aquoso 30% e 1,0 mmol de ácido carboxílico em 10 mL de diclorometano ou outro solvente puro. Foram também utilizadas misturas de solventes com os diferentes LIs. A reação foi mantida sob agitação em um agitador (150 rpm) a 25 °C por 24h.

As amostras das reações foram analisadas 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 em 280 °C e 290 °C, respectivamente. A taxa de fluxo de gás de hidrogênio foi de 7mL/min, utilizando 1  $\mu\text{L}$  de amostra. Nos resultados e discussão, as condições reacionais específicas, serão detalhadas para cada experimento.

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 experimentos controle, ou seja na ausência dos biocatalisadores e do agente oxidante em condições similares às descritas para a reação típica.

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 (9:1 v/v). Os produtos foram caracterizados por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , incluindo o ponto de fusão, e comparados com os dados obtidos na literatura. (DAMODARAN; DEV, 1968)(SKÖLD et al., 2006)

### 3.3.8. Síntese Biocatalisada dos Ésteres

Para realizar as reações de esterificação e transesterificação, foram adicionados em um erlenmeyer de 150 mL contendo a lipase imobilizada e 25 mL de solvente orgânico 10 mmol de álcool (*n*-pentanol ou *n*-octanol) e 10 mmol de ácido carboxílico (ácido octanóico) ou éster (acetato de vinila). A mistura foi colocada em banho termostatizado com agitação (Technal TE-0532) por 24 h. As reações foram monitoradas por cromatografia de camada delgada, usando como eluente hexano:acetato de etila (7:3 v/v). Após 24 h, a mistura reacional foi separada dos suportes, e transferida para um balão. O suporte foi lavado com solvente orgânico até que não houvesse mais a presença dos reagentes, e o solvente evaporado em rota-evaporador. A formação dos ésteres foi caracterizada por RMN de  $\text{H}^1$  e IV, e quantificada por cromatografia gasosa. (ALVES, 2015; DA SILVA, 2013)

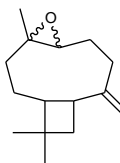
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente lipases de diversas procedências foram imobilizadas em gel de ágar e utilizadas como catalisadores na epoxidação quimio-enzimática de  $\beta$ -cariofileno. Vários parâmetros experimentais, tais como a utilização de solventes orgânicos, incluindo diferentes LIs derivados do 1-butil-3-metil-imidazólio, tempo, temperatura, velocidade de agitação, re-utilização e inclusão de aditivos ao gel foram avaliados. Posteriormente, a lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) foi imobilizada em três suportes diferentes, filme de amido de milho, gel de ágar e em bucha vegetal, e utilizada na mesma reação. Os suportes foram caracterizados por titulação de Karl Fischer, MEV e TGA. Foram avaliados sete solventes orgânicos com valores diferentes de  $\log P$ . Subseqüentemente, dois solventes foram escolhidos para serem utilizados em misturas com LIs de modo a investigar a influência do meio. Os resultados obtidos na reação de epoxidação com LBC imobilizada nos três suportes foram comparados com os obtidos nas reações de transesterificação na obtenção do acetato de octila, e de esterificação na preparação do octanoato de pentila. Micélios da região amazônica também foram utilizados como biocatalisadores na reação de epoxidação.

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO

Os epóxidos **41** e **42** derivados do  $\beta$ -cariofileno foram preparados, purificados e isolados, usando as condições descritas por Thiago B. Bitencourt. (DA SILVA et al., 2013) Os dados espectrométricos também foram comparados com os da literatura.

4, 12, 12-trimetil-9-metileno-5-oxatriciclo[8.2.0.0<sup>4,6</sup>] dodecano (**41**)



$C_{15}H_{24}O$   
220,18 g/mol

**Rend.**(41%, 225 mg); p.f: 62–64 °C (Lit. 62–63 °C)

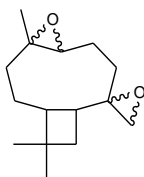
**RMN de  $^1H$**  (400 MHz,  $CDCl_3$ , TMS):  $\delta$  (ppm) 4,97 (s, 1H), 4,85 (1H), 2,91(q, 10,4 Hz, 1H), 2,58 (d, 9,2 Hz, 1H), 2,36 (m, 1H) 2,15 (q, 4,4 Hz, 1H), 2,11 (m, 2H) 1,80-1,55(m, 5H), 1,34-1,29 (m, 5H) 0,95 (m, 6H).

**RMN de  $^{13}C$**  (100 MHz,  $CDCl_3$ , TMS):  $\delta$  (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[8.2.0.0<sup>4,6</sup>]dodecan-9-2'-oxirano]  
(42)



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

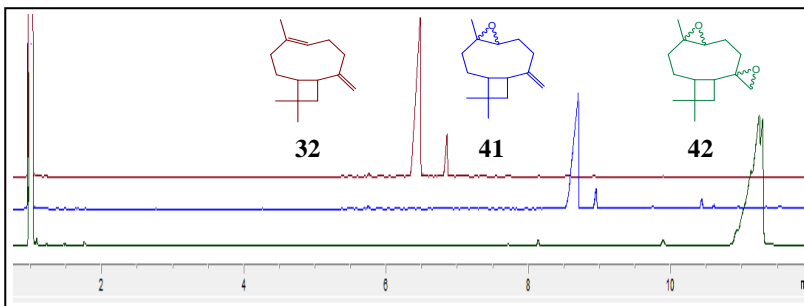
**Rend.** (38%, 225 mg); p.f.: 73–75 °C (Lit.72–73 °C)

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ (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** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ (ppm) 65 63,0, 60,0, 52, 50,0, 49,0, 40,0, 39,0, 34,0, 30,1, 29,8, 29,7, 27,2, 21 17,0.

As porcentagens de conversão aos produtos foram determinadas através da razão das áreas dos picos dos reagentes e produtos obtidos por CG. A **Figura 19** mostra o cromatograma do β-cariofileno e dos produtos isolados na reação *via* química.

**Figura 19.** Cromatograma do reagente e produtos isolados da epoxidação do β-cariofileno ( $t_R$  **32** = 6,5,  $t_R$  **41** = 8,5,  $t_R$  **42** =11,0 min). (Condições de análise: descritas no item 3.3.7, p. 53).



Fonte: desenvolvido pelo autor

Após identificar e caracterizar os produtos, foram avaliados diversos parâmetros na epoxidação químio-enzimática do β-cariofileno com lipases imobilizadas em gel de ágar.

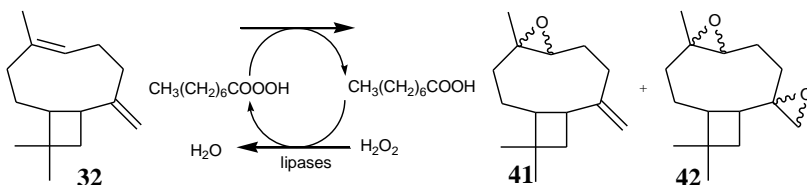
## 4.2. EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DO $\beta$ -CARIOFILENO USANDO LIPASES IMOBILIZADAS EM GEL DE AGAR

### 4.2.1. Avaliação do uso de diversas lipases

O primeiro estudo realizado foi a avaliação da eficiência das enzimas imobilizadas em gel de ágar em epoxidar o substrato (**32**) aos produtos (**41**) e (**42**). Para fins comparativos, as lipases também foram usadas na forma não imobilizada. Foram usadas sete lipases comerciais e três oriundas de micro-organismos do solo na região de Bueno Brandão MG (LRO, LAN e Lipase 32).

Ao utilizar as lipases comerciais como catalisadores, observou-se a formação apenas do mono-epóxido (**41**), e os resultados estão apresentandos na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Epoxidação químio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno utilizando diferentes lipases imobilizadas ou não em gel de ágar.



Entrada	Lipases Comerciais	Atividade	Conversão (%) <sup>b</sup>	
			Livre	Imobilizada
1	F-API5	150 u/mg	16	15
2	PS Amano	30.000U/g	16	8
3	AK Amano 20	25.000 U/g	25	6
4	M Amano 10	10.000u/g	23	6
5	AY Amano 30	30.000u/g	23	2
6	AS Amano	15.000 u/g	3	3
7	AYS Amano	30.000 u/g	3	2

Fonte: desenvolvido pelo autor

a)  $\beta$ -cariofileno (2,5mmol), PHA (5,0mmol), ácido octanóico (1,0mmol), lipase (50 mg) imobilizada em gel de ágar (0,4 g de ágar/10 mL de água), diclorometano (10 mL), temperatura ambiente, 150 rpm, 24 h.

b) Determinado por CG.

Como pode ser observado na **Tabela 3**, as conversões do  $\beta$ -cariofileno ao seu respectivo epóxido utilizando diferentes lipases imobilizadas variaram de 2 a 15%, sendo que o melhor resultado foi obtido utilizando a lipase F-AP15 (15%). Nos estudos iniciais, utilizou-se diclorometano como meio reacional. Pode se observar também que quando foram utilizadas as lipases não-imobilizadas, as conversões do reagente **32** ao produto **41** foram superiores. Por exemplo, ao usar as lipases F-AP15 e PS Amano, as conversões foram de 16%, e após imobilização foram de 15 e 8%, respectivamente (**Tabela 3**, entradas 1 e 2).

Ao usar as lipases AK Amano 20, M Amano 10 e AY Amano 30 na forma livre, as conversões ao mono-epóxido **41**, foram de aproximadamente 25%. Após imobilização, estes valores foram de 2 a 6% (**Tabela 3**, entradas 3-5).

Ao usar as lipases AS Amano e AYS Amano nas formas livre ou imobilizada, as conversões ao produto **41** foram <5% (**Tabela 3**, entradas 6 e 7). Resultados similares foram obtidos ao utilizar as lipases nativas LRO, LAN e a lipase 32 (dados não mostrados na **Tabela 3**).

Em geral, as conversões ao produto **41** foram menores ao usar as lipases imobilizadas. Isso se deve, provavelmente, ao fato que após imobilização o catalisador pode não assumir as modificações estruturais adequadas e necessárias, que favorecessem o encaixe adequado do substrato no sítio ativo, bem como a limitações na difusão do substrato ao sítio ativo. (CABRAL, 2003; FABER, 2011; ZHU et al., 2011)

Não existem regras específicas para prever a atividade e a estabilidade de uma enzima mediante a imobilização, podendo este processo inibir ou ativar a atividade da enzima. O que se pode afirmar é que a maioria das lipases imobilizadas apresentam maior resistência à temperatura e a diferentes solventes que as livres. Esta observação é atribuída ao fato de que enzimas imobilizadas são menos sensíveis a desativação, pois sua estrutura é mais rígida. (FABER, 2011)

A partir destes resultados, foi escolhida lipase F-AP15 imobilizada em gel de ágar para avaliar outros parâmetros reacionais tais como efeito do meio orgânico, temperatura, tempo, agitação, re-utilização e adição de aditivos com o intuito de obter conversões maiores do substrato **32** ao produto **41**.

#### 4.2.2. Efeito do Meio Orgânico

Como pode ser observado na epoxidação químico-enzimática do  $\beta$ -cariofileno (DA SILVA et al., 2013) e do citrionelol (DA SILVA; NASCIMENTO, 2012), o efeito do meio orgânico é um fator determinante na formação dos epóxidos. Logo, o segundo parâmetro a ser analisado foi a influência desse meio ao utilizar a lipase F-AP15 imobilizada em gel de ágar. Foram avaliados dezesseis solventes orgânicos com diferentes valores de Log *P*. Os resultados obtidos de conversão ao monoepóxido, usando os diversos solventes estão apresentados na **Tabela 4**.

Quando foram usados *n*-hexano e ciclohexano, as conversões de **32** em **41** foram de 88%. Ao utilizar tolueno e MTBE as conversões foram de ~50%. Ao usar acetonitrila, etanol, clorofórmio, acetato de etila, éter etílico e diclorometano, as conversões do substrato **32** ao produto **41** foram < 35%. Ao empregar THF, acetona, metanol, DMF, DMSO, como solventes não foi detectada a formação de **41**. (**Tabela 4**, entradas 10, 11,14,15 e 16)

Pode-se observar também que com exceção da reação que utilizou acetonitrila como solvente (**Tabela 4**, entrada 13), as conversões de **32** em **41** estão relacionadas com o Log *P*, conforme proposto por Laane e *col.*. O resultado obtido com esse solvente (acetonitrila) é inesperado baseando-se apenas na polaridade. Entretanto, deve-se considerar a solubilização do peróxido de hidrogênio neste meio, essencial para a formação do peroxi-ácido. Além disso, o uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aquoso pode ter proporcionado o teor de água necessário para manter a atividade da enzima. (MOREIRA; NASCIMENTO, 2007)

Com objetivo de aumentar a conversão em **41**, avaliou-se a influência do uso de líquidos iônicos (LIs) derivados do imidazol em misturas com solventes orgânicos.

Os LIs usados foram. tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][BF<sub>4</sub>], hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][PF<sub>6</sub>], tiocianato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][SCN], cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][Cl] e brometo de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][Br], na proporção 9:1 (v:v). A escolha desta composição foi baseada em trabalhos da literatura que utilizaram estes LIs na resolução da (*R,S*)-feniletilamina (PILISSÃO; CARVALHO; NASCIMENTO, 2009) e na obtenção de oxaziridinas (BITENCOURT; NASCIMENTO, 2010).

Foram selecionados cinco solventes com diferentes valores de Log *P*, sendo estes o tolueno, éter *t*-butil metílico, diclorometano, etanol e acetonitrila. Ao utilizar estes solventes puros, as conversões de **32** em **41** foram próximas ou inferiores a 50%. Os resultados das conversões de **32**

a **41** utilizando mistura dos solventes com os LIs estão apresentados na **Figura 20**. Por motivos de comparação, foram também incluídos os valores de conversão na ausência de LI.

**Tabela 4.** Epoxidação químico-enzimática do  $\beta$ -cariofileno com a lipase F-API5 imobilizada em gel de ágar em diferentes solventes orgânicos.

Entrada	Solvente	Log $P^c$	Conversão (%) <sup>b</sup>
1	<i>n</i> - Hexano(HEX)	3,50	88
2	Cicloexano (CHEX)	3,20	88
3	Tolueno (TOL)	2,50	52
4	Cloroformio (CLO)	2,00	16
5	<i>t</i> -Butanol (TBU)	1,45	0
6	Éter- <i>t</i> -butil-metílico (MTBE)	1,43	49
7	Diclorometano (DCM)	0,93	15
8	Eteretílico (EE)	0,85	15
9	Acetato de etila (ACE)	0,68	7
10	Tetrahidrofurano (THF)	0,49	0
11	Acetona (ACTO)	-0,23	0
12	Etanol (ETOH)	-0,24	5
13	Acetonitrila (ACN)	-0,33	34
14	Metanol (MeOH)	-0,76	0
15	Dimetilformamida (DMF)	-1,00	0
16	Dimetilsulfóxido (DMSO)	-1,30	0

Fonte: desenvolvido pelo autor

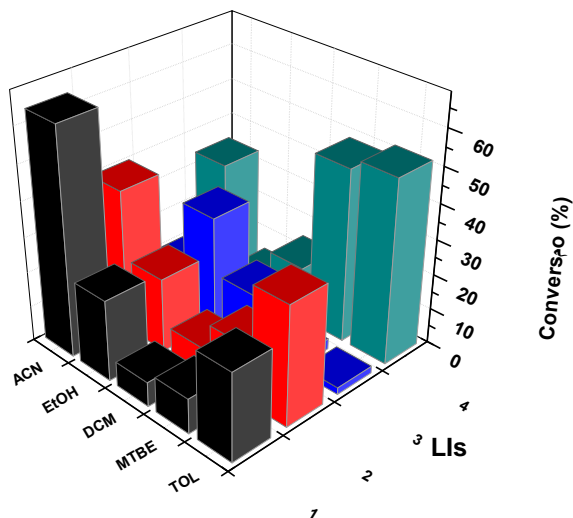
(a) Cond. Reac.:  $\beta$ -cariofileno (2,5mmol), PHA (5,0mmol), ácido octanóico(1,0mmol), lipase (50 mg) imobilizada em gel de agar (0,4 g de ágar/10 mL de água), solvente (10 mL), t.a., 150 rpm, 24 h.

(b) Determinada por CG.

(c) LAANE et al., 1987.



**Figura 20.** Efeito do uso da mistura de solventes orgânicos com líquidos iônicos na epoxidação químico-enzimática do  $\beta$ -cariofileno.



Fonte: desenvolvido pelo autor

- (a) Cond. Reac.  $\beta$ -cariofileno(2,5mmol), PHA (5,0mmol), ácido octanóico(1,0mmol), lipase F-AP15 (50 mg) imobilizada em gel de ágar (0,4 g de ágar/10 mL de água), solvente:LI 9:1 (v:v), t.a., 150 rpm, 24 h). 1-[BMIM][BF<sub>4</sub>], 2-[BMIM][PF<sub>6</sub>], 3-[BMIM][SCN], 4- sem adição de LI.
- (b) Determinado por CG.

Pode-se observar na **Figura 20**, que quando foi utilizado acetonitrila como solvente sem adição de LI, a conversão de **32** ao produto **41** foi de 34%, e ao usar a mistura ACN com os LIs [BMIM][BF<sub>4</sub>] e [BMIM][PF<sub>6</sub>] as conversões do  $\beta$ -cariofileno ao mono-epóxido aumentaram para 64 e 40%, respectivamente. Ao empregar [BMIM][SCN] com acetonitrila a conversão de **32** a **41** foi de 10%.

Quando foi utilizado etanol, a conversão de **32** a **41** foi de apenas 5%. Ao usar este solvente em misturas com os diferentes LIs, as conversões do substrato ao produto **41** aumentaram. O maior valor foi obtido usando o LI [BMIM][SCN] (31%), seguido por [BMIM][BF<sub>4</sub>] (23%) e [BMIM][PF<sub>6</sub>] (21%).

Os resultados obtidos com diclorometano (DCM) não apresentaram mudanças significativas, pois ao usar o solvente sem

mistura com LIs a conversão de **32** a **41** foi de 15%. Este resultado é similar ao empregar a mistura DCM/[BMIM][SCN]. Ao usar a mistura de DCM com [BMIM][BF<sub>4</sub>] e [BMIM][PF<sub>6</sub>], as conversões do β-cariofileno ao mono-epóxido foram > 10%.

Ao usar éter-*t*-butil-metílico (MTBE) ou tolueno, as conversões ao produto **32** foram de 49 e 52%, respectivamente. Ao empregar estes solventes com misturas de LIs, as conversões variam de 3-16% e 2-34%. As maiores conversões ao produto **41** foram obtidas quando foram utilizadas as misturas de MTBE/[BMIM][PF<sub>6</sub>] e TOL/[BMIM][PF<sub>6</sub>], sendo de 16% e 34%, respectivamente.

Vale salientar que foram também utilizadas misturas com os LIs [BMIM][Br] e [BMIM][Cl], mas não houve formação do produto **41**.

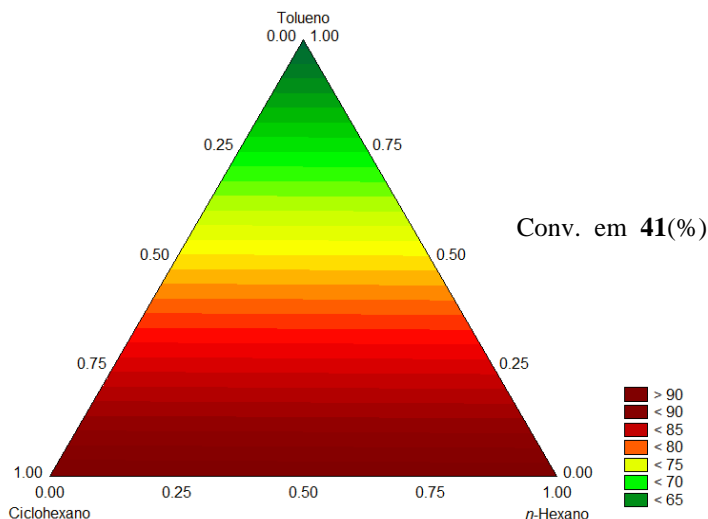
Pode-se observar que o aumento das conversões ao usar as misturas de solventes orgânicos/LIs em relação aos solventes puros foi dependente da polaridade do solvente e do LI. Betti, Landini e Maia relataram que a nucleofilicidade de uma série representativa de ânions associados com cátions imidazólios é dependente da interação como cátion assim como com o conteúdo de água presente no meio. (BETTI; LANDINI; MAIA, 2008)

Esta observação, permite sugerir porque o melhor resultado foi obtido ao utilizar misturas de acetonitrila com os diferentes LIs. Além disso, os LIs, e em particular seus ânions, formam ligações de hidrogênio fortes que auxiliam na interação “enzima-substrato”. Essas ligações são estabilizadas na presença de solventes polares. (MONIRUZZAMAN et al., 2010). Outros parâmetros tais como a viscosidade e transferência de massa também devem ser considerados e podem aumentar ou diminuir a atividade enzimática. (FENG et al., 2013)

Apesar de ter obtido aumentos nas conversões de **31** em **41** utilizando acetonitrila e etanol como solventes, o gel de agar bem como os líquidos iônicos, não puderam ser re-utilizados. Os líquidos iônicos interagiram fortemente com o gel de ágar, não sendo possível a separação e recuperação adequada do meio reacional. Além disso, observaram-se alterações no aspecto macroscópico do gel.

A seguir, foram realizadas reações usando diferentes proporções de volume dos solventes nos quais as conversões de **32** em **41** foram maiores que 50% (tolueno, *n*-hexano e ciclohexano). A superfície triangular apresenta as proporções dos solventes bem como as conversões de **32** em **41**. (**Figura 21**)

**Figura 21.** Valores de conversão do  $\beta$ -cariofileno ao mono-epóxido em função da mistura de solventes usando superfície triangular.



Fonte: desenvolvido pelo autor

- (a) Cond. Reac.  $\beta$ -cariofileno (2,5mmol), PHA (5,0mmol, 30%), ácido octanóico (1,0mmol), lipase F-AP15 (50 mg) imobilizada em gel de ágar (0,4 g de ágar/10 mL de água), solvente (10 mL), t.a., 150 rpm, 24 h.
- (b) Determinado por CG.

Pode-se observar na **Figura 21**, que com o aumento da proporção de tolueno, as conversões de **32** em **41** diminuíram de 88 a 52%. Porém, aumentando a proporção de ciclohexano as conversões aumentaram de 72 a 88% e utilizando qualquer proporção de *n*-hexano as conversões mantiveram-se em 88%. A partir desses resultados o *n*-hexano foi escolhido como solvente para a avaliação de outros parâmetros reacionais, tais como tempo, temperatura, velocidade de agitação, re-utilização do suporte e adição de aditivos.

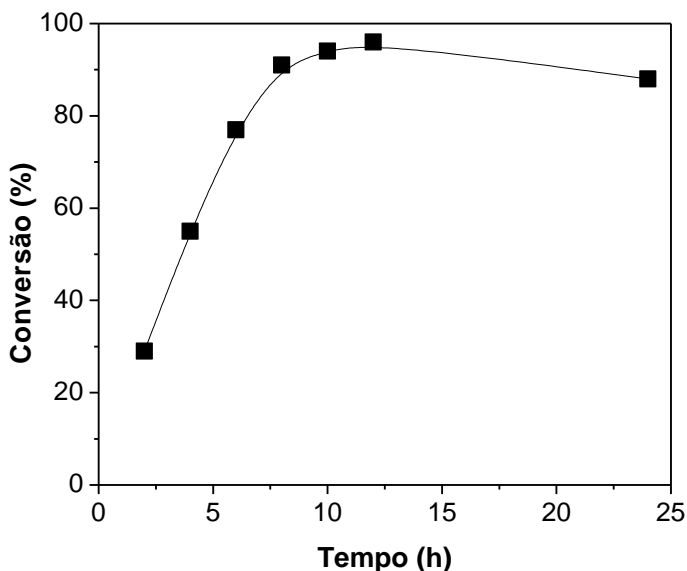
Vale salientar que foi realizada a reação de epoxidação com a enzima F-AP15 não imobilizada em *n*-hexano, e não houve conversão do  $\beta$ -cariofileno ao seu respectivo epóxido.

Nesse sentido pode-se observar que o gel protegeu a lipase do meio orgânico e do agente oxidante, permitindo que ela catalise a reação de formação do peroxiácido na primeira etapa, e posterior formação do epóxido.

#### 4.2.3. Influência do Tempo e Temperatura

O próximo estudo realizado foi a avaliação do tempo de reação. Os dados de conversão ao mono-epóxido do  $\beta$ -cariofileno estão apresentados na **Figura 22**.

**Figura 22.** Influência do tempo na epoxidação químico-enzimática do  $\beta$ -cariofileno.



Fonte: desenvolvido pelo autor

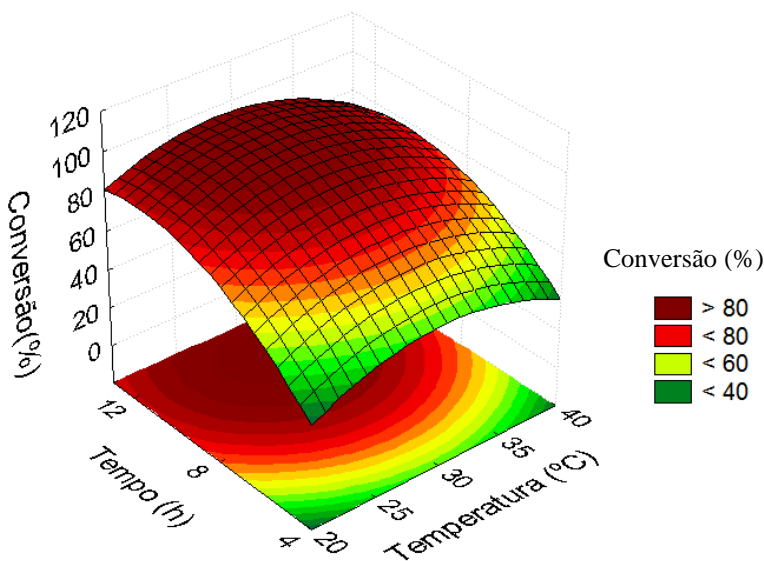
- Cond. Reac.  $\beta$ -cariofileno (2,5mmol), PHA (5,0mmol, 30%), ácido octanóico (1,0mmol), lipase F-API5 (50 mg) imobilizada em gel de ágar (0,4 g de ágar/10 mL de água) *n*-hexano (10 mL), t.a., 150 rpm.
- Determinado por CG.

Observa-se nos dados da **Figura 22** um aumento na conversão em **32** em função do tempo. A maior conversão em **41** foi obtida após 12 h, sendo de 96%. A partir desse tempo os valores de conversões diminuíram um pouco em 24h, sendo que a conversão a **41** foi de 88%.

Outro parâmetro que influencia as reações químico-enzimáticas é a temperatura. A temperatura afeta a velocidade de uma reação catalisada por enzimas e pode influenciar na atividade, seletividade e estabilidade do biocatalisador, bem como no equilíbrio da reação. (KAPOOR; GUPTA, 2012)

Para avaliar simultaneamente a influência do tempo e temperatura nesta reação, estas variáveis foram analisadas conjuntamente, em sistema bidimensional. Foram escolhidos três tempos de reação (4, 8 e 12 h) e cinco temperaturas (20, 25, 30, 35 e 40°C). Os resultados são apresentados na **Figura 23**.

**Figura 23.** Influência do tempo e da temperatura na epoxidação químico-enzimática do  $\beta$ -cariofileno.



Fonte: desenvolvido pelo autor

- (a) Cond. Reac.:  $\beta$ -cariofileno (2,5mmol),  $H_2O_2$  (5,0mmol, 30%), ácido octanóico (1,0mmol), lipase F-AP15 (50 mg) imobilizada em gel de agar (0,4 g de ágar/10 mL de água) hexano (10 mL), 150 rpm.
- (b) Determinado por CG.

A **Figura 23** corrobora com a **Figura 22**, pois com o aumento do tempo, a conversão de **32** em **41** também aumentou. Em todas as temperaturas estudadas, as conversões do reagente **32** ao produto **41** aumentaram até 35 °C e, após este valor, diminuiu. Por exemplo, em 4 h, à 20 °C, a conversão foi de 35%, em 35 °C foi de 52% e em 40°C foi de 35%.

Em 8h, as conversões aumentaram de 68 a 96% nas temperaturas 20 a 35 °C, e diminuiu para 64% a 40 °C. Em 12 h, as variações nas conversões foram menores, sendo de 78% a 20 °C, 91% a 35 °C e 78% a 40 °C. O maior valor de conversão de **32** em **41** foi obtido em 8h a 35°C, sendo de 96%.

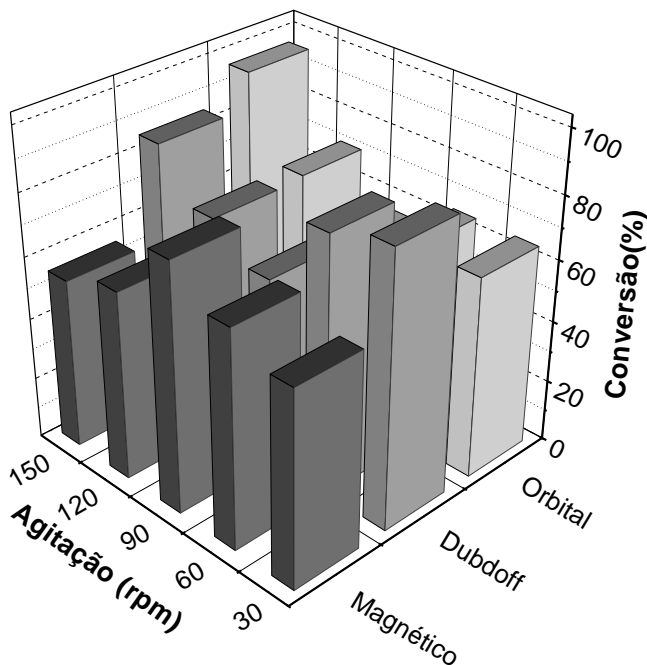
Conforme discutido na literatura, em temperaturas mais elevadas, a energia de desnaturação supera a energia de ativação para catálise enzimática, tornando o processo de desnaturação da enzima mais rápido. (FABER, 2011) A partir desse estudo optou-se por trabalhar com temperatura de 35<sup>0</sup> C na avaliação do tipo de agitação, reutilização do suporte e na adição de aditivos.

#### 4.2.4. Influência do Tipo de Agitação

O modo e a intensidade da agitação em reações com enzimas imobilizadas, ou não, são importantes, pois estes podem definir a quantidade de enzima e substrato (reagentes) que estarão disponíveis para catalisar a reação. A interação da enzima pode ser um fator limitante, pois com aumento da velocidade de agitação pode ocorrer redução ou aumento do contato da enzima com os reagentes, suporte e o solvente orgânico. (FENG et al., 2013)

Para avaliar este parâmetro, as reações foram realizadas em diferentes agitadores tais como tipo Dubdoff, orbital e magnético e velocidades de agitação (rpm). Os resultados obtidos de conversão ao monoepóxido **41** estão apresentados na **Figura 24**.

**Figura 24.** Conversão (%) do  $\beta$ -cariofilenono epóxico **41** em diferentes agitadores e rotações.



Fonte: desenvolvida pelo autor

- (a) Cond. Reac.:  $\beta$ -cariofileno (2,5mmol),  $H_2O_2$  (5,0mmol, 30%), ácido octanóico (1,0mmol), lipase F-AP15 (50 mg) imobilizada em gel de ágar (0,4 g de ágar/10 mL de água) hexano (10 mL).
- (b) Determinado por CG.

Quando foi utilizado o agitador tipo Dubdoff, as conversões de **32** em **41** apresentaram relação direta com a velocidade de agitação, sendo que o melhor resultado obtido em 30 rpm (88%). Ao usar o agitador orbital, as conversões aumentaram com a velocidade de agitação, sendo que em 150 rpm a conversão ao produto **41** foi de 96%.

Com o agitador magnético, as conversões aumentaram com a velocidade de agitação até 90 rpm (80%), e posteriormente diminuíram (61-55%). Esses dados são concordantes com os de Oliveira e *col.* na esterificação enzimática do ácido oleico e etanol onde foi verificado que

em taxas mais baixas de agitação, o equilíbrio para a conversão dos reagentes ao produto leva mais tempo para ser atingido e assim, mais tempo para a reação ser completada.

Segundo os autores, quando foi utilizada a agitação magnética, velocidades mais elevadas, nesse caso de 120-150 rpm, o sistema pode exibir um vórtice (movimento espiral ao redor de um centro de rotação), que diminui a quantidade de solvente e reagentes disponíveis para reação e conseqüentemente diminui a conversão ao produto. (OLIVEIRA et al., 2000)

A partir destes resultados e dos melhores obtidos nos estudos anteriores (lipase F-A15, hexano, 8h, 35°C), observou-se que o uso do agitador orbital com a velocidade de agitação de 150 rpm, foi o sistema mais adequado para a obtenção seletiva do mono-epóxido em conversão alta (96%).

#### **4.2.5. Estudo de Re-utilização**

A avaliação da re-utilização do biocatalisador é um outro parâmetro importante em reações catalisadas por enzimas imobilizadas, que visa diminuir os custos de todo o processo.

O gel de ágar utilizado em uma reação foi lavado cinco vezes com o respectivo solvente, e utilizado novamente como catalisador nas melhores condições obtidas anteriormente (lipase F-AP15, hexano, 8h, 35°C). Ao usar a lipase imobilizada em gel de ágar pela segunda vez, o mono-epóxido foi obtido com conversão de 86%. Entretanto, ao utilizar o gel pela terceira vez, não foi observada conversão satisfatória (<50%) de **32** em **41**. Esse resultado, provavelmente, deve-se ao fato que na formação do peroxi-ácido, utilizando um ácido carboxílico e peróxido de hidrogênio, há formação de moléculas de água e essas não são possíveis de serem retiradas do gel, aumentando assim a quantidade de água no sistema de imobilização, e conseqüentemente dificultando a difusão do peroxi-ácido nas próximas utilizações.

Na tentativa de melhorar as conversões e possibilitar a re-utilização foram adicionados ao gel diferentes aditivos, tais como amido de pinhão e líquidos iônicos.

#### **4.2.6. Adição de Aditivos ao Gel de Ágar**

Visando melhorar as condições de estabilidade na re-utilização do suporte, variou-se a quantidade de agar (0,1-0,4 g), e adicionou-se amido de pinhão (0,1-0,5 g) mantendo-se as quantidades iniciais de



reagentes utilizados na preparação do gel (10 mL de água 30 mg de FAP-15). (**Tabela 5**)

Analisando os dados da **Tabela 5**, pode-se observar que o aspecto macroscópico do gel de ágar com amido de pinhão variou com as diferentes quantidades de amido de pinhão e de ágar. Quando a massa de ágar variou de 0,1 a 0,3 e a de amido de pinhão de 0,4 a 0,2 g, o gel apresentou um aspecto mole, dificultando a passagem pela peneira e a formação dos cubos. O produto **41** foi formado com conversão de 6%.

Quando a quantidade de ágar foi mantida em 0,4 g e foi adicionado o amido de pinhão (0,1-0,3 g), não houveram diferenças visíveis quando comparado ao gel de ágar sem adição de amido de pinhão. As conversões ao produto variaram de 60 a 40%, e quando a quantidade de amido de pinhão aumentou de 0,4 a 0,5 g, o aspecto do gel ficou modificado e endurecido, dificultando novamente a passagem pela peneira. As conversões ao produto **41** foram de 40-36%.

**Tabela 5.** Conversão (%) do  $\beta$ -cariofileno ao mono- epóxido **41** usando gel de ágar com diferentes proporções de amido de pinhão.

Massa de Ágar (g)	Massa Amido de Pinhão (g)	Textura	Conversão (%) <sup>(b)</sup>
0,1	0,4	Mole	6
0,2	0,3	Mole	6
0,3	0,2	Mole	6
0,4	0,1	Consistente	60
0,4	0,0	Consistente	88
0,4	0,2	Consistente	45
0,4	0,3	Consistente	40
0,4	0,4	Duro	40
0,4	0,5	Duro	36

Fonte: desenvolvido pelo autor

- (a) Cond. Reac.:  $\beta$ -cariofileno (2,5mmol),  $H_2O_2$  (5,0mmol, 30%), ácido octanoíco (1,0mmol), lipase F-AP15 (50 mg) imobilizada em gel de agar (0,4 g de ágar/10 mL de água) + amido de pinhão (0,1-0,5g) hexano (10 mL), 8h, 150 rpm.
- (b) Determinado por CG.

Como pode ser observada na **Tabela 5**, mantendo-se a quantidade de ágar e aumentando da quantidade de amido de pinhão, a conversão do reagente **32** ao produto **41** diminuiu. A maior conversão foi obtida quando foram utilizadas 0,1 g de amido de pinhão (60%).

Provavelmente, com aumento da quantidade de amido a estrutura do gel é alterada, dificultando a difusão dos reagentes diminuindo assim, a formação do epóxido. Também foi realizado o teste de re-utilização com os suportes contendo diferentes proporções de amido de pinhão no gel de ágar, mas não houve a formação do produto **41**.

Como foi observado na seção 4.3.2. (Estudo do Efeito do Meio Orgânico), não foi possível a recuperação dos LIs pois estes ficaram aprisionados no gel de agar. Então, optou-se por adicionar os LIs (1 mL) na preparação do suporte, mantendo-se as quantidades iniciais de reagentes utilizados na preparação do gel (0,4 g de agar, 10 mL de água 30 mg da lipase F-AP15). Foram utilizados cinco LIs ([BMIM][BF<sub>4</sub>], BMIM][PF<sub>6</sub>], [BMIM][SCN], [BMIM][Cl] e [BMIM][Br]) na preparação do gel e posterior utilização na reação de epoxidação quimio-enzimática. Quando foram usados os líquidos iônicos [BMIM][Cl] e [BMIM][Br] houve a formação do mono-epóxido **41** com conversões de 16 e 6%, respectivamente. Quando foram usados os LIs [BMIM][BF<sub>4</sub>], BMIM][PF<sub>6</sub>], [BMIM][SCN], não houve formação do produto. Pode-se observar que a adição de LIs ao suporte não foi benéfica nesta reação.

Na busca por outros suportes para imobilização de lipases e utilização em reações de epoxidação, optou-se por testar alguns suportes que já estavam sendo utilizados no laboratório em reações de esterificação e transesterificação (filme de amido de milho e bucha vegetal) e comparar os resultados obtidos com as lipases imobilizadas em gel de ágar. Para essas reações foi utilizada a lipase de *Burkholderia cepacia* (PS Amano 30.000 U/g) visto que a lipase F-AP15 não forma filme de amido de milho e as conversões ao produto **41** utilizando LBC foram semelhantes às obtidas com F-AP15 (**Tabela 3** página 57).

#### 4.3. EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DO $\beta$ -CARIOFILENO UTILIZANDO A LIPASE de *Burkholderia cepacia* IMOBILIZADA EM DIFERENTES SUPORTES

Neste estudo, a lipase proveniente de *Burkholderia cepacia* (LBC) foi imobilizada em três suportes diferentes, filme de amido de milho (FA), gel de ágar (GA) e bucha vegetal (BV), e utilizados para obtenção do epóxido de  $\beta$ -cariofileno.

Inicialmente foi determinada a quantidade de água nos suporte com ou sem lipase, e posteriormente foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos suportes. Foram

também realizadas a análise termogravimétrica e determinação da área superficial da bucha vegetal.

#### 4.4. CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES

Está bem descrito e discutido na literatura que as enzimas necessitam de uma quantidade mínima de água para a manutenção da configuração natural bem como da atividade catalítica. (FABER, 2011; MATEO et al., 2007) Quando a enzima é imobilizada, essa quantidade de água deve ser mantida. Nesse sentido, o teor de água nos suportes com e sem enzima foram determinadas através da titulação Karl Fischer.

##### 4.4.2. Determinação do teor de água nos suportes por titulação de Karl Fischer

O teor de água nos suportes (FA, GA, BV) foi determinado pelo método de titulação de Karl Fischer. Os suportes, com ou sem enzima, apresentaram diferentes porcentagens de água em massa. Estes dados estão mostrados na **Tabela 6**.

**Tabela 6.** Determinação do teor de água nos suportes.

Suporte	Sem enzima (%)	Com enzima (LBC) (%)
Bucha Vegetal	16	15
Filme de Amido de Milho	15	2
Gel de Agar	96	81

Fonte: desenvolvido pelo autor

Ao analisar os resultados apresentados na **Tabela 6**, observa-se que a quantidade de água é maior no gel de ágar, seguido pela bucha vegetal e posteriormente pelo filme de amido. Essa quantidade de água presente no suporte auxilia na estabilização da conformação da lipase através das ligações de hidrogênio com os resíduos de serina, histidina, aspartato e/ou ácido glutâmico localizados no sítio catalítico das lipases.

O gel de ágar apresenta estrutura molecular em cadeia com conformação helicoidal, e tais interações entre estas cadeias formam uma rede tridimensional capaz de aprisionar um considerável número de moléculas de água nos interstícios. (LAHAYE; ROCHAS, 1991)

A celulose tem unidades de D-glicopiranosídeo unidas ao modo 1→4 em cadeias longas, não ramificadas. Porém, de forma diferente do

que ocorre no amido, as ligações na celulose são tipo  $\beta$ -glicosídicas. Esta configuração dos átomos de carbono anoméricos da celulose faz com que as cadeias de celulose sejam essencialmente lineares. O arranjo linear das unidades de glicose com ligação  $\beta$ , faz com que haja uma distribuição uniforme dos grupos OH no exterior da cadeia. Quando duas ou mais cadeias entram em contato, os grupos hidroxilas estão na posição ideal para unir integralmente as cadeias formando ligações de hidrogênio. (SOLOMONS; FRYHLE; WHEI, 2002)

As cadeias de unidades de D-glicose do amido, com as ligações  $\alpha$ -glicosídicas, como as da amilose, tendem assumir configuração helicoidal. Esta configuração faz com que a molécula de amilose tenha forma mais compacta dificultando a entrada de moléculas de água. (SOLOMONS; FRYHLE; WHEI, 2002) Estas observações corroboram com os resultados discutidos no item 4.2.6 página 69; onde foi observado que com o aumento de massa de amido de pinhão no gel, o mono-epóxido foi formado em conversões menores (dados apresentados na **Tabela 5**)

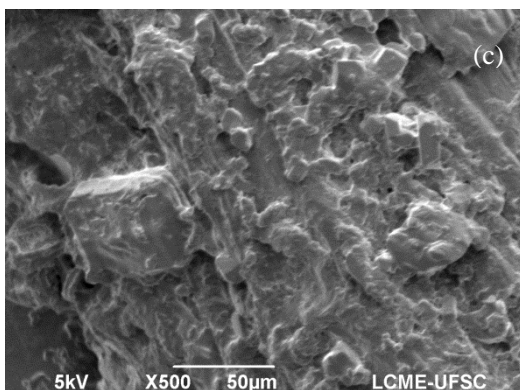
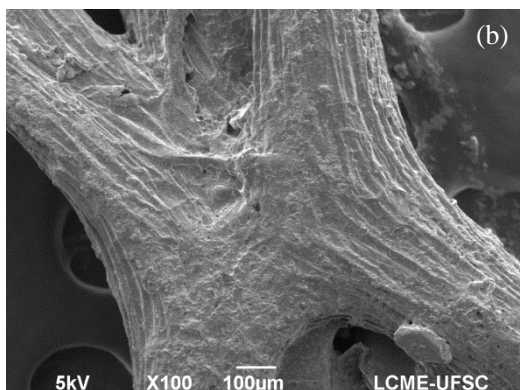
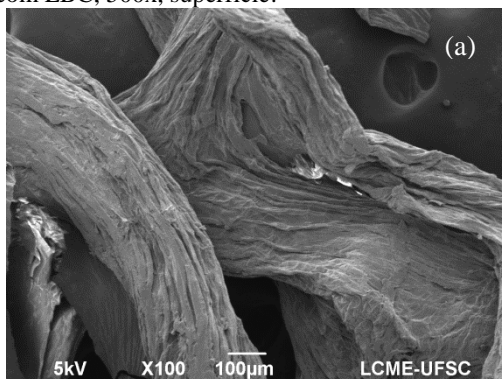
Nesse sentido, pode-se observar que a maneira como os monômeros se unem nos polímeros pode influenciar na quantidade de água presente em cada suporte.

A interação dessas cadeias formando uma rede tridimensional leva a formação de estrutura macromolecular dos polímeros, permitindo que as enzimas possam estar na superfície ou na parte interna. Uma forma de observar se as enzimas estão encapsuladas ou na superfície dos materiais poliméricos é através de imagens de alta resolução da superfície das amostras. Essas imagens podem ser obtidas através da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

#### **4.4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura**

A lipase de *Burkholderia cepacia* foi imobilizada em filme de amido de milho e em bucha vegetal. Esses sistemas foram também caracterizados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Devido à maneira com que as imagens são obtidas, estas tem uma aparência tridimensional característica e são úteis para avaliar a estrutura superficial de uma dada amostra. As imagens obtidas estão apresentadas nas **Figuras 25 e 26**. Devido à grande quantidade de água no gel, não foram realizadas imagens por MEV.

**Figura 25.** Imagens de MEV das amostras de bucha vegetal com e sem a LBC imobilizada. Ampliações: (a) sem LBC, 100x, superfície, (b) com LBC, 100x, superfície; (c) com LBC, 500x, superfície.



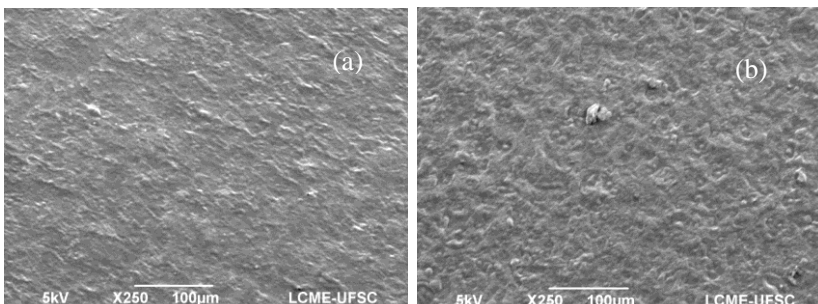
Fonte: desenvolvido pelo autor

As **Figuras 25 b e c** mostram que a lipase está adsorvida na superfície da bucha vegetal. O método usado foi a adsorção física e este provoca pouca ou nenhuma alteração conformacional na enzima ou destruição do seu sítio ativo. Porém devido à força de ligação menor entre a enzima e o suporte, tem-se como desvantagem a possível perda das enzimas adsorvidas ao longo dos re-usos. (IZRAEL ŽIVKOVIĆ et al., 2015)

As imagens de MEV apresentadas na **Figura 26** mostram o filme de amido de milho com e sem lipase. As micrografias apresentam certa rugosidade homogênea do suporte, bem como a presença da LBC na **Figura 26 b**. A lipase está retida no filme principalmente na superfície, formando aglomerados em determinadas regiões. Esse método de imobilização de enzima por confinamento em matriz polimérica consiste em “aprisionar” a enzima em um polímero insolúvel, sólido e poroso. A vantagem da utilização desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando assim a desnaturação. (GONÇALVES; OLIVEIRA; GONÇALVES, 2012)

Como observado nas **Figuras 25 e 26**, os métodos de imobilização na bucha vegetal e filme de amido de milho são diferentes. No caso da bucha vegetal a enzima é adsorvida e nesse método a área superficial do suporte é muito importante, para se ter uma ideia de quantidade de enzima que pode ficar adsorvida. Entretanto, antes de realizar a análise da área superficial torna-se necessário avaliar a estabilidade do material através da análise termogravimétrica.

**Figura 26.** Imagens de MEV das amostras de filme de amido de milho com e sem a LBC imobilizada. Ampliações: (a) sem LBC, 250x, superfície, (b) com LBC, 250x, superfície.



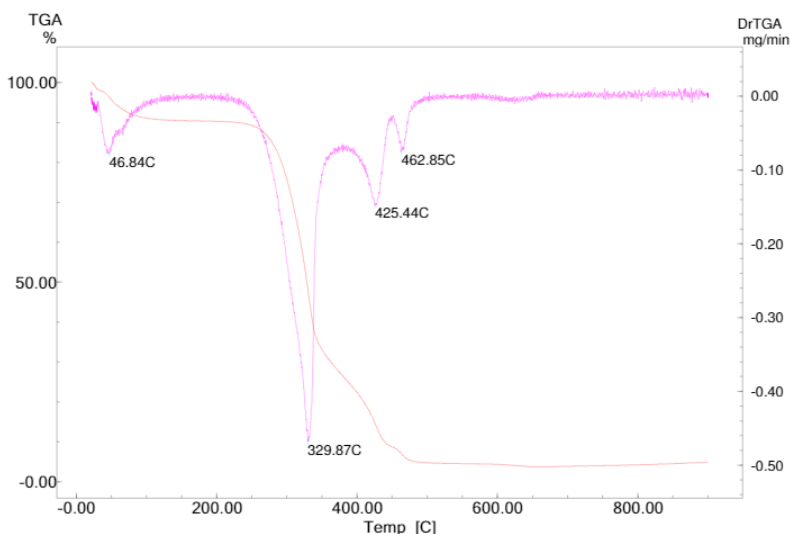
Fonte: desenvolvido pelo autor

#### 4.4.3. Análise Termogravimétrica (TGA) e Área Superficial da Bucha Vegetal

Primeiramente, foi determinada a temperatura de decomposição da BV para que posteriormente fosse determinada a área da superfície.

A **Figura 27** mostra o gráfico da análise termogravimétrica (TGA).

**Figura 27.** Análise Termogravimétrica da Bucha Vegetal.



Fonte: desenvolvido pelo autor

Condições de análise: ar sintético (atmosfera oxidante) – 20 mL/min, 30 °C - 900 °C, taxa de 10°C/min.

Observa-se que o material não apresenta água adsorvida (~100° C), e que a taxa de degradação máxima foi observada em 329 °C. A partir de 500 °C, verificou-se uma baixa percentagem de resíduos.

A partir desses resultados, a área da superfície do suporte foi determinada, obtendo-se como valor médio de  $0,633 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , este valor é considerado pequeno em relação à outros suportes como o carvão ativado ( $340,3\text{-}2201,6 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ). Entretanto, apesar da área superficial ser pequena, a BV é uma alternativa adequada para o uso como suporte.

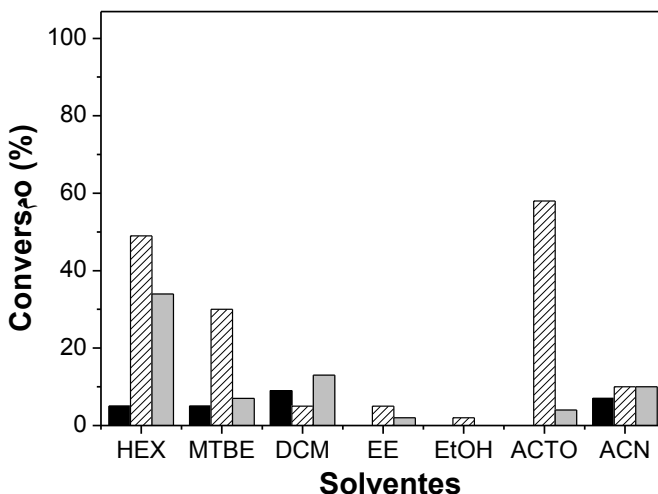
A BV tem sido usada como uma matriz para imobilização de plantas, algas, bactérias e células de levedura. (MORIWAKI et al., 2014; OBOH; ALUYOR, 2009) Estes dados indicam que a BV é bastante estável, e portanto adequada para imobilização de enzimas, em especial as lipases que foram usadas neste trabalho.

A partir da caracterização dos suportes, foram avaliados diferentes parâmetros como efeito do meio orgânico, temperatura nos suportes na epoxidação do  $\beta$ -cariofileno.

#### 4.4.4. Efeito do Meio Orgânico

Inicialmente, foram testados sete solventes, sendo eles *n*-hexano, MTBE, diclorometano, éter etílico, etanol, acetona e acetonitrila. Os resultados de conversão ao correspondente epóxido estão apresentados na **Figura 28**.

**Figura 28.** Influência de diferentes solventes na epoxidação quimio-enzimática da  $\beta$ -cariofileno usando a LBC imobilizada em filme de amido (■), gel de açúcar (▨) e bucha vegetal (■).



Fonte: desenvolvido pelo autor

- (a) Cond. Reac.: 2,5 mmol  $\beta$ -cariofileno, 1,0 mmol de ácido octanóico, 5 mmol de  $H_2O_2$ , 30 mg LBC imobilizadas em diferentes suportes, 10 mL de solvente, a 150 rpm, 24 h, t.a. (25°C). (b) Determinado por CG.



Como pode ser observado na **Figura 28**, os valores de conversão ao monoepóxido **41** foram dependentes do solvente orgânico e do suporte utilizado na imobilização da LBC.

Ao usar a lipase imobilizada em filme de amido de milho, os valores de conversão em **41** variaram de 0-9%, sendo que o maior valor foi obtido ao usar diclorometano como solvente (9%).

Com a enzima imobilizada na bucha vegetal, as conversões ao produto **41** variaram de 0-34%, sendo que o melhor foi obtido ao usar *n*-hexano (34%).

Quando a LBC foi imobilizada em gel de ágar, o produto foi obtido com conversões que variam de 2 a 58%, sendo que em *n*-hexano e acetona **41** foi obtido com 49 e 58% de conversão, respectivamente.

Ao usar *n*-hexano, a conversão a **41** foi maior ao usar a lipase F-AP15 (88%) do que com a LBC (49%). (**Tabela 7**). Entretanto, ao usar acetona as conversões obtidas com a lipase de *Burkholderia cepacia* foram maiores (58%). Apesar de ambas as enzimas serem lipases, elas possuem atividades catalíticas diferentes e como são originadas de micro-organismos diferentes, provavelmente, possuem sítios ativos com conformações diferentes e isso faz com que o substrato se encaixe melhor em cada uma delas. (PLEISS; FISCHER; SCHMID, 1998)

Vale salientar que com o uso de CAL-B, a conversão ao produto **41** foi > 99% ao usar *n*-hexano, MTBE, acetona, e acetonitrila como solventes na reação em 8h. (DA SILVA et al., 2013)

A seguir, influência do uso de misturas de solventes/LIs foi testada com a LBC imobilizada nos diferentes suportes. Para analisar esse parâmetro foram utilizados dois solventes com polaridades diferentes (*n*-hexano, e acetonitrila). A **Tabela 7** mostra os dados obtidos.

Como observado na **Tabela 7**, quando a LBC foi imobilizada em filme de amido e utilizando os vários LIs em misturas com *n*-hexano, os graus de conversão foram moderados (23%) ou muito baixos (0-5%). No entanto, é importante mencionar que foi observado um aumento com o uso de *n*-hexano/[BMIM][PF<sub>6</sub>] (23%) em comparação com o solvente orgânico puro (5%), verificando-se o efeito positivo deste LI na formação do monoepóxido. Quando a LBC foi imobilizada em gel de ágar ou bucha vegetal, e utilizando os vários LIs, foi observada uma diminuição nos valores de conversão. Estes variaram de 0-20%, sendo inferiores aos obtidos na presença de *n*-hexano puro (49% e 34%).

Quando a acetona nitrila foi utilizada em misturas com os diferentes LIs, na maioria dos casos, foi observado um efeito benéfico, dependendo do suporte utilizado para a LBC. Com o uso do filme de amido, o valor da conversão ao monoepóxido **41** usando ACN/[BMIM][PF<sub>6</sub>] foi maior (14%) do que o obtido com o solvente orgânico puro (7%).

**Tabela 7.** Efeito do uso de misturas de solventes orgânicos/líquidos iônicos na epoxidação quimio-enzimática de  $\beta$ -cariofileno usando diferentes suportes. <sup>(a)</sup>

		Conversão (%) <sup>(b)</sup>					
		HEX			ACN		
LI	Suporte	FA	GA	BV	FA	GA	BV
[BMIM][PF <sub>6</sub> ]		23	20	11	14	87	19
[BMIM][BF <sub>4</sub> ]		1	4	2	0	63	6
[BMIM][SCN]		0	0	0	0	53	28
[BMIM][Cl]		5	18	2	0	42	9
[BMIM][Br]		1	19	0	16	7	0
[BMIM][I]		0	0	0	0	9	0
[BMIM][OS]		0	0	6	24	24	7
Sem LI		5	49	34	7	10	10

Fonte: desenvolvido pelo autor

(a) Cond. Reac.: 2,5 mmol de substrato, 5 mmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 mmol de ácido octanóico, 30 mg LBC imobilizada em diferentes suportes, solvente: LI 9: 1 (v: v), a 150 rpm, 24 h, t.a.

(b) Determinada por CG.

Uma tendência semelhante foi observada quando a lipase foi imobilizada em bucha vegetal. Neste caso, os valores de conversão ao monoepóxido usando ACN/[BMIM][PF<sub>6</sub>] ou ACN/[BMIM][SCN] foram maiores (19% e 28%) do que a obtida usando o solvente orgânico puro (10%).

Quando a LBC foi imobilizada em gel de ágar, houve uma melhora na conversão utilizando os vários LIs. Como pode ser observado na **Tabela 7**, os valores mais elevados foram obtidos com o uso das misturas de ACN/[BMIM][PF<sub>6</sub>] e ACN/[BMIM][BF<sub>4</sub>], sendo de 87% e 63%, respectivamente. Quando as misturas de ACN/[BMIM][SCN] e ACN/[BMIM][Cl] foram usadas, os valores de conversão foram de 53 e 42%.

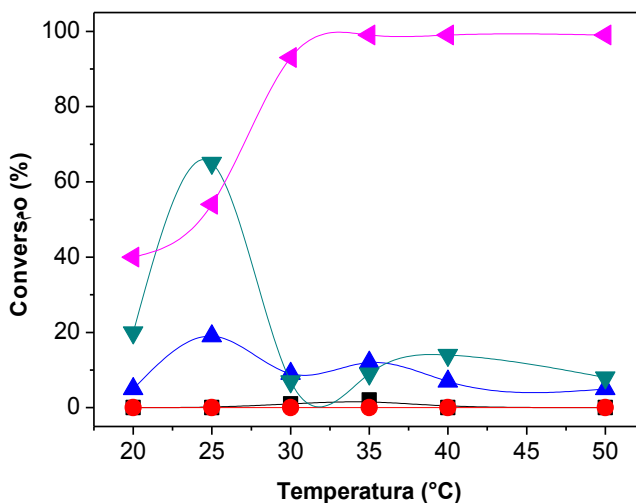
Vale salientar que os maiores valores foram obtidos quando foi utilizado o LI/[BMIM][PF<sub>6</sub>].

Esses resultados corroboram com os obtidos utilizando a lipase F-API5 imobilizada em gel de agar (ver seção 4.3.2. página 59) que mostram que a quantidade de água presente no suporte (seção 4.1.2 página 72), auxilia na estabilização das interações entre enzima-substrato, e quanto maior a quantidade de água no meio, mais elevadas foram as conversões ao monoepóxido [GA (81%), BV (16%), FA (2%)].

#### 4.4.5. Influência da Temperatura

Para avaliar o efeito da temperatura na conversão ao monoepóxido, optou-se por trabalhar com *n*-hexano como solvente. Foram testadas 7 temperaturas, sendo de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50°C nas reações com a LBC imobilizada nos três suportes. Os resultados foram comparados com a lipase não imobilizada e na ausência desta (**Figura 29**).

**Figura 29.** Influência da temperatura na epoxidação quimio-enzimática da  $\beta$ -cariofileno usando LBC imobilizada em filme de amido de milho ( $\blacktriangle$ ), gel de agar ( $\blacktriangleleft$ ) e bucha vegetal ( $\blacktriangledown$ ), (— $\blacksquare$ —) LBC (— $\bullet$ —) Sem LBC



Fonte: desenvolvido pelo autor.

- (a) Cond. Reac.: 2,5 mmol  $\beta$ -cariofileno, 1,0 mmol de ácido octanóico, 5 mmol de  $H_2O_2$ , 30 mg LBC imobilizada em diferentes suportes, 10 mL de *n*-hexano, a 150 rpm, 24 h, t.a.  
 (b) Determinada por CG.

Pode-se observar na **Figura 29** que quando a reação foi realizada na ausência da LBC, não houve a conversão do substrato ao monoepóxido. Usando a lipase não imobilizada os valores de conversão ao produto foram muito baixos (0-2%).

Quando a lipase foi imobilizada em gel de agar, os valores de conversão aumentaram com a temperatura, sendo que em 35°C a formação do produto foi > 99%.

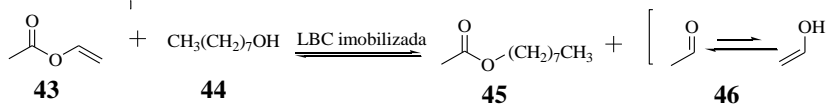
Ao usar a bucha vegetal como suporte, a maior conversão foi obtida em 25°C (65%), e a partir dessa temperatura as conversões em **41** foram de 8-20%. As conversões ao produto utilizando o filme de amido como suporte, variaram de 5-19% sendo que o maior valor foi obtido em 25°C (19%).

Vale salientar que os três suportes se mostraram resistentes em todas as temperaturas, mantendo seu aspecto macroscópico durante o tempo de reação (24h).

#### 4.4.3. Influência do Suporte e do Meio Reacional em Reações Diferentes

Para fins de comparação foram também realizadas reações de esterificação e transesterificação utilizando os diferentes suportes e solventes de várias polaridades, incluindo LIs. (NASCIMENTO et al., 2015) Foram preparados os ésteres de aroma acetato de *n*-octila e o octanoato de *n*-pentila. (**Esquemas 19 e 20**)

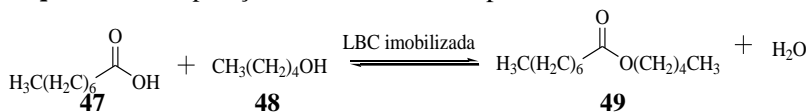
**Esquema 19.** Preparação do acetato de *n*-octila.



Cond. Reac.: 1-octanol (10 mmol) e acetato de vinila (10 mmol), 30 mg LBC imobilizada em diferentes suportes, 25 mL de *n*-hexano, a 150 rpm, 24 h, t.a.

Fonte: NASCIMENTO et al., 2015

**Esquema 20.** Preparação do octanoato de *n*-pentila.



Cond. Reac.: *n*-pentanol (10 mmol) e ácido octanóico (10 mmol), 30 mg LBC imobilizada em diferentes suportes, 25 mL de *n*-hexano, a 150 rpm, 24 h, t.a.

Fonte: NASCIMENTO et al., 2015

A **Tabela 8** mostra os valores de conversão aos produtos de cada reação, incluindo também a obtenção do monoepóxido **41**.

**Tabela 8.** Valores de conversão aos produtos **41**, **45** e **49** usando diferentes solventes e diferentes suportes.

Solvente	Conversão 45 (%) <sup>(b)</sup>			Conversão 49 (%) <sup>(b)</sup>			Conversão 41 (%) <sup>(b)</sup>		
	FA	GA	BV	FA	GA	BV	FA	GA	BV
<i>n</i> -Hexano	81	53	84	36	96	99	5	49	34
MTBE	99	17	99	36	59	48	5	30	7
Diclorometano	18	3	45	15	27	25	9	5	13
Éter Etilíco	31	11	33	5	8	8	0	5	2
Etanol	0	2	4	0	3	0	0	2	0
Acetona	61	11	77	0	19	13	0	19	4
Acetonitrila	48	19	94	0	2	26	7	10	10

Fonte: desenvolvido pelo autor

(a) Cond. Reac.: **45** idem **Esquema 14**, **49** idem **Esquema 15**; **41** idem **Figura 27** variando os solventes.

(b) Determinada por CG.

Ao usar *n*-hexano pode-se observar que em geral, as maiores conversões foram obtidas utilizando a BV como suporte. Salienta-se que o octanoato de *n*-pentila foi obtido com conversões > 99%.

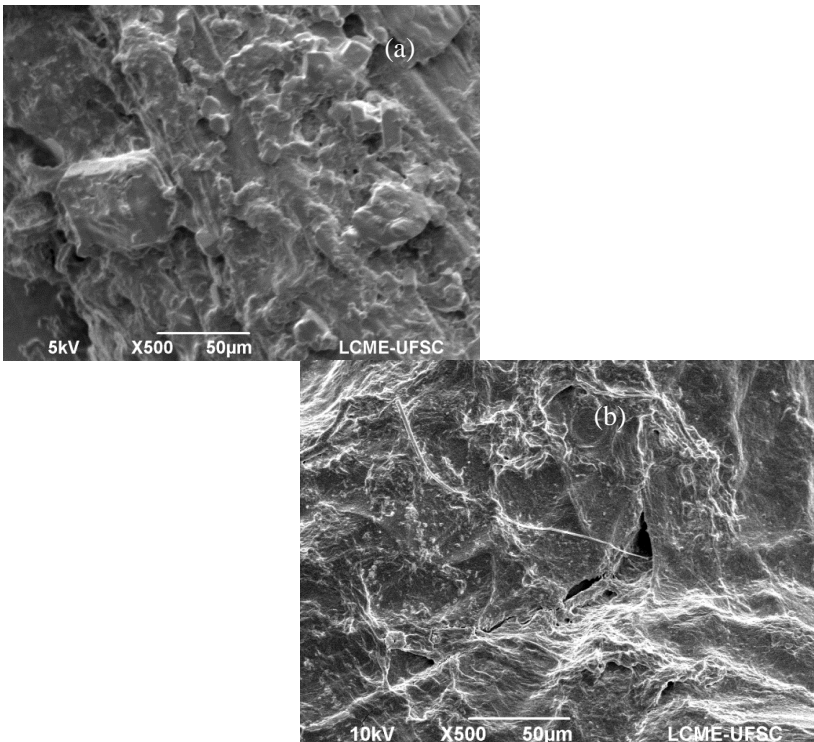
Após as reações de esterificação e epoxidação na presença de *n*-hexano, pedaços da BV foram cortados e analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (**Figura 30**) com objetivo de verificar se ocorreu ou não a lixiviação da lipase imobilizada na BV nas diferentes reações.

Pode-se observar na **Figura 30**, que após a reação de esterificação a LBC permanece adsorvida na bucha (**Figura 30 a**) podendo ser re-utilizada outras vezes, diferentemente do que aconteceu

com a reação de epoxidação, na qual pode-se observar a ausência da lipase após a reação.

A BV é formada de celulose (unidades de glicose). O arranjo linear das unidades de glicose uniformemente distribuídos deixam os grupos OH do lado de fora da cadeia. Estes grupos hidroxilas fazem ligações de hidrogênio com os grupos laterais dos aminoácidos da cadeia peptídica da lipase mantendo-as adsorvidas nas BV. Quando se utiliza a lipase imobilizada em solventes polares, ou com reagentes em solução aquosa, no caso da reação de epoxidação -peróxido de hidrogênio - o solvente interage com os grupos hidroxilas competindo com as ligações de hidrogênio entre a BV e os grupos das cadeias laterais das lipases, levando ao enfraquecimento da interação, e, portanto a lixiviação da lipase.

**Figura 30.** Micrografias da BV após a reação de esterificação (a) e epoxidação (b). Ampliações: 500x.



Fonte: desenvolvido pelo autor.

Usando MTBE como solvente, foram obtidos ótimos resultados de preparação do acetato de *n*-octila utilizando a LBC imobilizada em FA e BV (>99%). Nas reações de esterificação e epoxidação, os maiores resultados foram obtidos quando a LBC foi imobilizada em GA sendo de 59 e 30%, respectivamente.

Quando foram usados diclorometano, éter etílico e etanol, as conversões aos produtos **41**, **45** e **49** foram de moderadas a baixas independentes do suporte variando de 0-45%. A maior conversão foi obtida na preparação do octanoato de *n*-pentila (45%) em diclorometano com a lipase imobilizada em BV.

A **Figura 31** mostra imagens de MEV dos suportes utilizados após as reações de esterificação e epoxidação em dois solventes diferentes (éter etílico e diclorometano).

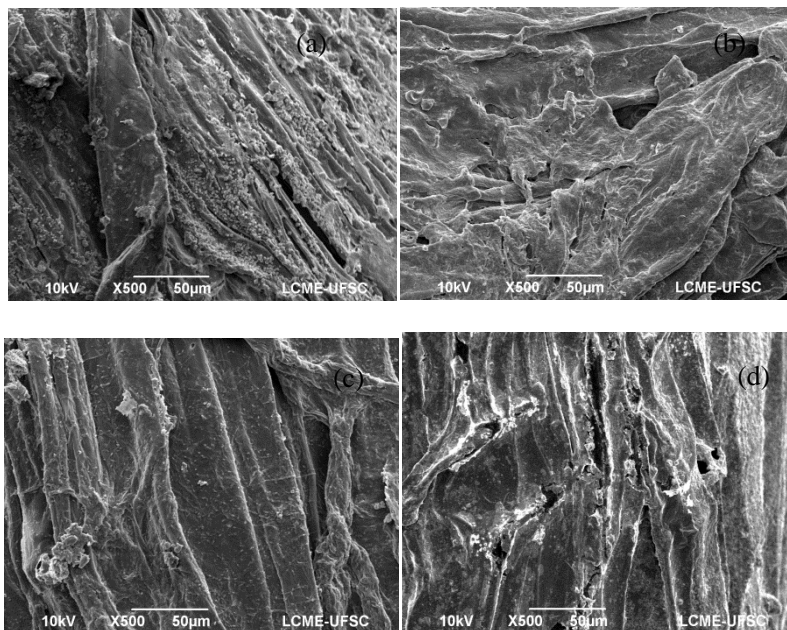
Pode-se observar na **Figura 31 a** que após a reação de esterificação em diclorometano, parte da LBC permaneceu adsorvida na BV. Entretanto, não foi observada a presença da LBC após a reação de epoxidação. Ao usar éter etílico, em ambas as reações, as conversões aos produtos **41** e **45** foram < 10% e ao observar as imagens da **Figura 29 c** e **d** pode-se observar a ausência da lipase após as reações.

As imagens de MEV corroboram também com vários trabalhos que relatam que o uso de solventes apolares são os mais adequados para reações biocatalisadas. (FABER, 2011; LAANE et al., 1987)

Utilizando acetona como solvente, foram obtidos bons resultados na reação de transesterificação quando a lipase foi imobilizada em FA e BV, formando o produto com conversões de 61 e 77%. Para as reações de esterificação e epoxidação os maiores resultados foram obtidos utilizando a LBC imobilizada em GA (19% e 58%).

Em acetonitrila e com a lipase imobilizada em BV, obtiveram-se os maiores valores, destacando-se que **45** foi obtido com conversão de 94%. Caliskan e *col.* obtiveram resultados semelhantes na transesterificação do acetato de 1-benzil-4,5,6,7-tetra-hidro-6,6-dimetil-4-oxo-1H-indol-7-il com acetato de vinila como doador acila, onde os melhores resultados (>99%) foram obtidos utilizando a lipase PS Amano (LBC) em acetonitrila. (CALISKAN; ERSEZ, 2015)

**Figura 31.** Figuras do MEV da BV após a reação em diclorometano (a,b) e éter etílico (c,d); Reação de esterificação (a,c); Reação de epoxidação (b,d). Ampliações: 500x.



Fonte: desenvolvido pelo autor

Em seguida foram usadas misturas de solventes/LIs nas reações de transesterificação e esterificação com a lipase imobilizada em diferentes suportes e comparadas com os valores obtidos na reação de epoxidação. Foram utilizados dois solventes em cada reação, e quatro LIs, sendo eles [BMIM][PF<sub>6</sub>], [BMIM][BF<sub>4</sub>], [BMIM][SCN] e [BMIM][Cl] (**Tabela 9**).

Na reação de transesterificação, o produto **45** foi obtido com conversões >99% quando a lipase foi imobilizada em filme de amido e em gel de ágar usando *n*-hexano e éter etílico como solvente nas misturas com LIs os [BMIM][BF<sub>4</sub>], [BMIM][PF<sub>6</sub>], [BMIM][SCN], bem como na mistura éter etílico/[BMIM][Cl] com a lipase imobilizada em GA. Quando a lipase foi imobilizada em BV os resultados foram maiores na ausência de LIs, independente do solvente orgânico (ver dados **Tabela 9**).



**Tabela 9.** Efeito do uso de misturas de solvente orgânico/LIs na obtenção de **41**, **45**, **49** utilizando a LBC imobilizada em diferentes suportes.

	Conversão 45 (%) <sup>(b)</sup>						Conversão 49 (%) <sup>(b)</sup>						Conversão 41 (%) <sup>(b)</sup>					
	FA		GA		BV		FA		GA		BV		FA		GA		BV	
Ânion do LI	HEX	EE	HEX	EE	HEX	EE	MTBE	EE	MTBE	EE	MTBE	EE	HEX	ACN	HEX	ACN	HEX	ACN
[PF <sub>6</sub> ]	99	99	99	99	55	4	99	70	38	98	76	28	23	14	20	87	11	19
[BF <sub>4</sub> ]	99	99	99	99	35	8	99	99	2	0	0	3	1	0	4	63	2	6
[SCN]	99	99	99	99	30	6	99	78	0	75	91	0	0	0	0	53	0	28
[Cl]	82	90	9	99	37	13	60	68	0	99	47	46	5	0	18	42	2	9
Sem LI	81	31	53	11	84	33	36	5	59	8	48	8	5	7	49	10	34	10

Fonte: desenvolvido pelo autor

- (a) Condições de reação **45**: 1-octanol (10 mmol) e acetato de vinila (10 mmol), 30 mg LBC imobilizada em diferentes suportes, solvente:LI (9:1 v/v), a 150 rpm, 24 h, t.a. [**49**: *n*-pentanol (10 mmol) e ácido octanóico (10 mmol) 30 mg LBC imobilizada em diferentes suportes, solvente:LI (9:1 v/v), a 150 rpm, 24 h, t.a.][**41**: 2,5 mmol de substrato, 5 mmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 mmol de ácido octanóico, 30 mg LBC imobilizada em diferentes suportes, solvente: LI (9: 1 v: v), 150 rpm, 24 h, t.a
- (b) Determinada por CG.

Na obtenção do octanoato de *n*-pentila, o produto **49** foi obtido com conversões > 99% com LBC imobilizada em FA ao usar MTBE com os LIs [BMIM][BF<sub>4</sub>], [BMIM][PF<sub>6</sub>], [BMIM][SCN] e éter etílico com [BMIM][BF<sub>4</sub>]. Quando a lipase foi imobilizada em GA, as maiores conversões foram obtidas ao usar mistura éter etílico/[BMIM][Cl] (> 99%), e em MTBE sem LI (59%). Ao usar a enzima imobilizada em BV, **49** foi obtido com 91% ao usar MTBE/[BMIM][SCN], e 46% em éter etílico/[BMIM][Cl]. Estes valores são, em geral, maiores do que os obtidos na ausência de LIs.

Pan e *col.* avaliaram o efeito do meio reacional na atividade de esterificação do ácido láurico com dodecanol e na conformação da LBC. Os estudos mostraram que a atividade da lipase é maior nas misturas solventes/LIs do que em solvente puro ou LIs puro. Os resultados provavelmente são explicados pelo fato de que a viscosidade dos LIs é diminuída pela adição de solventes orgânicos, o que aumenta a transferência de massa, resultando no aumento reação de esterificação. (PAN et al., 2010)

Comparando as três reações pode-se observar que os LIs tiveram influência positiva na maioria delas. O LI utilizado na mistura com maior influência benéfica foi o [BMIM][PF<sub>6</sub>] seguido pelo [BMIM][BF<sub>4</sub>]. Como citado acima, os LIs, e em particular seus ânions, formam fortes ligações de hidrogênio que auxiliam na interação enzima-substrato. (MONIRUZZAMAN et al., 2010)

Ghaedizadeh e *col.* estudaram a cinética, estrutura e a dinâmica da enzima luciferase de *Renilla* na presença dos LIs [BMIM][PF<sub>6</sub>] e [BMIM][BF<sub>4</sub>] utilizando a técnica de simulação de dinâmica molecular, juntamente com os procedimentos experimentais. Os resultados mostraram que embora o número de moléculas de [BMIM] retidas na superfície da enzima aumentaram na presença de [BF<sub>4</sub>], o número de ligações de hidrogênio não foi alterado. No entanto, o número de moléculas de [PF<sub>6</sub>] foi maior do que o número de [BF<sub>4</sub>] sobre a superfície da proteína, e um aumento significativo do número de ligações de hidrogênio também foi observado na presença de [PF<sub>6</sub>], quando comparado com ânion [BF<sub>4</sub>]. Portanto, as ligações de hidrogênio são talvez, a razão principal para a interação entre [PF<sub>6</sub>] e [BF<sub>4</sub>] com a luciferase de *Renilla*.

As interações de proteínas com LIs também têm impacto sobre a estrutura da enzima, especialmente em [BMIM][PF<sub>6</sub>], nas quais as interações da luciferase de *Renilla* (com  $\alpha/\beta$  vezes) com os ânions de flúor provoca um colapso conformacional nas hélices expostas. Com base nos resultados, as distorções estruturais na luciferase de *Renilla*, na

presença de LIs, é iniciado a partir da camada exterior da enzima, um modelo chamado de "colapso  $\alpha$ -protetor". (GHAEDIZADEH et al., 2016)

Os dados apresentados na **Tabela 9**, mostraram tanto a influência do suporte bem como a do meio reacional em diferentes reações. Em geral, foi verificado o efeito positivo do uso de LIs como co-solvente. O uso de LIs em reações biocatalisadas, tem sido descrito na literatura e amplia o uso de solventes polares nestas reações

Mais especificamente, os resultados aqui relatados para a formação de monoepóxido **41** mostram claramente a influência do suporte utilizado e do meio reacional. Como relatado anteriormente, o peróxido de hidrogênio é necessário para a formação do peroxiácido e, assim o suporte deve ser resistente a este reagente e não ser solúvel em água. (SHEN et al., 2014) Os filmes de amido não são muito estáveis na presença de peróxido de hidrogênio aquoso e a lipase pode ser liberada para o meio, o que não é uma condição favorável. A bucha vegetal também foi considerada inadequada como um suporte, considerando que a lipase foi adsorvida fracamente e pode ser liberada para a água presente no meio. Portanto, o gel de ágar foi considerado o suporte mais adequado para esta reação. Um aumento da polaridade do meio causada pela presença dos LIs levou a um aumento do grau de conversão ao produto. Como discutido, os ânions dos LIs também influenciaram nas reações estudadas.

#### 4.5. EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DO $\beta$ -CARIOFILENO USANDO MICÉLIOS DA REGIÃO AMAZÔNICA

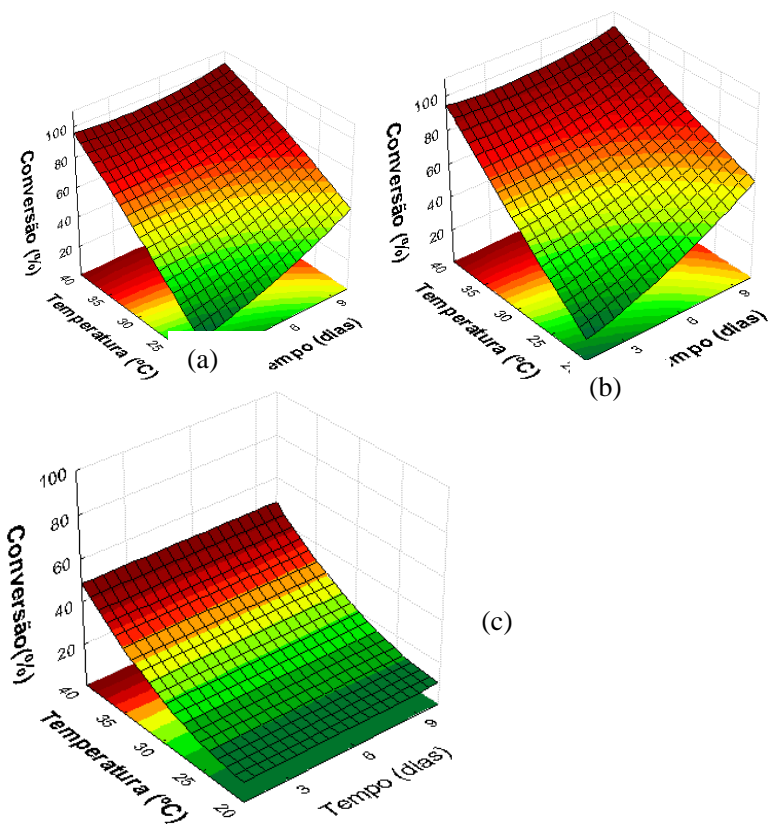
Com objetivo de explorar outras fontes de biocatalisadores, deu-se continuidade aos estudos da reação de epoxidação do  $\beta$ -cariofileno com micélios oriundos da região Amazônica. Resultados prévios mostraram o potencial de nove micélios para esta reação. (DA SILVA et al., 2013)

As conversões ao mono-epóxido foram dependentes tanto dos micélios quanto do tempo de reação. Os melhores resultados foram obtidos usando os micélios UEA\_06 micélios (64%), seguido por UEA\_23, UEA\_01, UEA\_41 e UEA\_115 (55, 49, 48 e 46%, respectivamente), em 168h (7 dias) de reação em diclorometano.

No intuito de diminuir o tempo de reação e verificar a influência da temperatura nesse sistema, foram selecionados três micélios que apresentaram diferentes conversões ao produto **41**, UEA\_06 (64%), UEA\_27 (9%) e UEA\_115 (46%).

Foram avaliadas as seguintes temperaturas 20, 25, 30, 35 e 40°C e os tempos de 3, 6, 9 dias. Os resultados foram analisados utilizando a metodologia de superfície de resposta (RSM) e estão apresentados na **Figura 32**.

**Figura 32.** Curvas de superfície de resposta da influência do tempo e da temperatura na epoxidação quimio-enzimática de  $\beta$ -cariofileno usando o UEA\_06 micélio (a), UEA\_115 (b) e UEA\_27 (c).



Fonte: desenvolvido pelo autor

- (a) Cond. Reac.:  $\beta$ -cariofileno (2,5 mmol), PHA 30% (5,0 mmol), ácido octanóico (1,0 mmol), micélio (100 mg), diclorometano solvente (10 mL), a 150 rpm
- (b) Determinado por GC

Os resultados mostraram que as maiores conversões foram obtidas usando-se diclorometano e acetonitrila como solventes orgânicos, sendo de 79% e 26% respectivamente. Na presença de outros solventes, os graus de conversão foram <10%, demonstrando não serem favoráveis para esta reação. Não foi observada nenhuma relação direta com a Log *P*. No entanto, resultados semelhantes foram observados na epoxidação de fenil ciclo-hexeno na presença de CAL-B. Boas conversões ao epóxido correspondente foram obtidas quando foi utilizado um solvente com baixo coeficiente de partição. Por exemplo, em diclorometano a conversão ao produto foi de 97% na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% (ANKUDEY; OLIVO; PEEPLES, 2006)

No próximo estudo, foi avaliada a influência dos reagentes responsáveis pela formação do peroxiácido, ou seja o ácido octanóico (1-3 mmol) e peróxido de hidrogênio 30% (5-25 mmol). Para apresentar os resultados foi utilizada a metodologia de superfície de resposta, e estes estão apresentados na **Figura 33**.

**Tabela 10.** Efeito de solventes orgânicos sobre a epoxidação na quimio-enzimática de  $\beta$ -cariofileno usando o micélio UEA\_06.

Solvente (Log <i>P</i> ) <sup>(c)</sup>	Conversão (%) <sup>(b)</sup>
<i>n</i> - Hexano (3,50)	4
MTBE (1,43)	5
Diclorometano (0,93)	79
Acetona (-0,23)	10
Etanol (- 0,24)	3
Acetonitrila (-0,33)	26

Fonte: desenvolvido pelo autor

- (a) Cond. Reac.:  $\beta$ -cariofileno (2,5 mmol), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% (5,0 mmol), ácido octanóico (1,0 mmol), micélio UEA\_06 (100 mg), solvente orgânico (10 mL), a 150 rpm, 35 ° C, 3 dias .
- (b) Determinado por GC.
- (c) (LAANE et al., 1987)

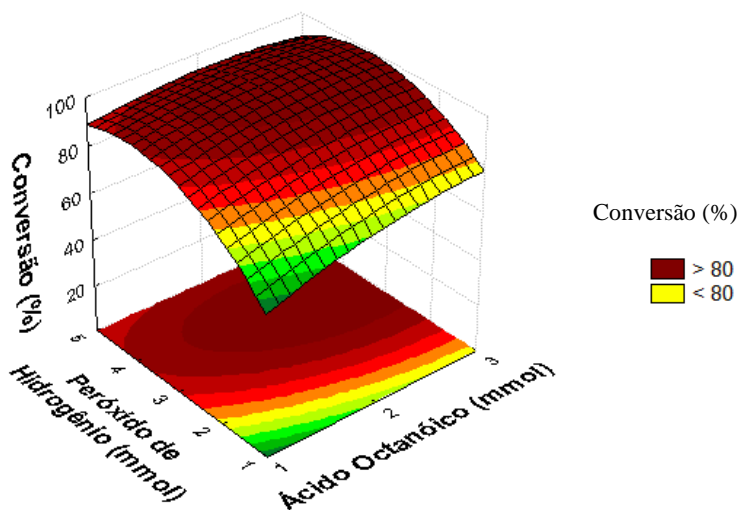
Os resultados mostraram um aumento na conversão de **41**, com o aumento do agente oxidante e a da quantidade de doador de acila.

Usando 1 mmol de ácido octanóico e variando a quantidade de peróxido de hidrogênio a conversão de **41** variou 55-87%. Quando foi usado 2 mmol do ácido octanóico as conversões foram entre 73-99% , e com 3 mmols foram 82-99%.

Porém, quando a reação foi realizada sem o biocatalisador, nas condições descritas acima, a conversão ao produto **41** foi também > 99%. Ou seja, o micélio não atuou como catalisador.

Um dos problemas que pode ter ocorrido, foi a estocagem da cepa correspondente ao micélio UEA\_06 por tempo longo (~1 ano na geladeira). Todavia, salienta-se que é importante buscar novas fontes de biocatalisadores na natureza.

**Figura 33.** Superfície de resposta da influência de ácido octanóico e quantidade de peróxido de hidrogênio na epoxidação quimio-enzimática de  $\beta$ -cariofileno usando o micélio UEA\_06.



Fonte: desenvolvido pelo autor

- Cond. . Reac.:  $\beta$ -cariofileno (2,5 mmol),  $H_2O_2$  a 30% (5,0-25,0 mmol), ácido octanóico (1,0-3,0 mmol), micélio UEA\_06 (100 mg), diclorometano (10 mL), a 150 rpm, temperatura ambiente, 3 dias.
- Determinado por CG.

## 5.CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, têm-se as seguintes conclusões:

A epoxidação químico-enzimática do  $\beta$ -cariofileno foi realizada em condições brandas com lipases imobilizadas em gel de ágar. A porcentagem de conversão ao mono-epóxido **41** foi dependente de alguns fatores experimentais tais como procedência das lipases, solvente, tempo, temperatura e tipo de agitação. Em geral, o mono-epóxido do  $\beta$ -cariofileno foi obtido como produto único.

Para a obtenção preferencial de **41**, deve-se considerar que:

- A lipase de *Rhizopus oryzae* (F-AP15) foi o biocatalisador mais eficiente após imobilização em gel de ágar (15%);
- O melhor solvente orgânico foi *n*-hexano (>88%, 24h);
- Ao usar misturas de solvente orgânicos com LIs, o melhor resultado foi obtido ao usar acetonitrila/[BMIM][BF<sub>4</sub>] (9:1 v/v) (64%, 24h);
- As condições mais adequadas foram 8 h de reação, 35 °C e o uso de agitador orbital a 150 rpm (96%);
- A lipase imobilizada no gel de ágar não pode ser re-utilizada;
- A adição de aditivos ao gel de ágar não foi benéfica para esta reação e não possibilitou a re-utilização.

A lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) foi imobilizada em três suportes diferentes sendo eles filme de amido de milho (FA), gel de ágar (GA) e bucha vegetal (BV) e utilizados na obtenção de **41**.

- Quando a LBC foi imobilizada em FA, a maior conversão ao produto **41** foi obtido ao usar diclorometano (9%);
- Ao usar GA como suporte em acetona, **41** foi obtido com conversão de 58%;
- Quando a LBC foi imobilizada em BV, a maior conversão obtida foi em *n*-hexano (34%).
- Ao usar as misturas solvente/LIs o maior valor da conversão a **41** foi obtido com o uso da mistura de ACN/[BMIM][PF<sub>6</sub>] (87%);
- A temperatura mais adequada foi 35°C, usando os diferentes suportes destacando que quando a LBC foi imobilizada em GA, **41** foi obtido com conversões > 99%.
  - A LBC imobilizada nestes suportes mostrou-se eficiente para as reações de esterificação e transesterificação.

- Quando LBC foi imobilizada em FA ou BV e usando MTBE como solvente, o acetato de *n*-octila (**45**) foi obtido com conversão >99%.
- Ao usar a LBC imobilizada em BV e *n*-hexano como solvente, o octanoato de *n*-pentila (**49**) foi obtido com conversões >99%.
- Foram obtidos ótimos resultados ao usar a LBC imobilizada em FA e GA e misturas de solventes/LIs na preparação de **45** (>99%).

Comparando as três reações, pode-se observar que os LIs tiveram influência positiva na maioria delas, sendo [BMIM][PF<sub>6</sub>] e [BMIM][BF<sub>4</sub>] os mais eficientes. Esses resultados mostraram tanto a influência do suporte bem como a do meio reacional em diferentes reações.

Diferentes micélios (UEA\_27, UEA\_115 e UEA\_06), foram também usados na obtenção de **41**.

- Usando o micélio UEA\_06, as maiores conversões a **41** foram obtidas na presença de diclorometano e acetonitrila, sendo de 79% e 26%, respectivamente.
- Verificou-se a influência do ácido octanóico e o peróxido de hidrogênio na formação de **41**, e dependendo das quantidades as conversões foram > 99%;
- Quando a reação foi realizada na ausência o biocatalisador, nas condições otimizadas ( $\beta$ -cariofileno (2,5 mmol), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15 mmol), ácido octanóico (3,0 mmol), diclorometano, a 35 °C, 3 dias.), a conversão a **41** foi > 99%. Ou seja, os micélios não atuam catalisadores nessa reação.

Portanto, a partir destes resultados verificou-se a grande importância da otimização das condições reacionais em sistemas biocatalíticos. A reação de epoxidação mostrou-se fortemente influenciada por diversos fatores. Salienta-se também a seletividade do processo, sendo que apenas um dos compostos foi obtido dependendo das condições experimentais, sendo, portanto uma das vantagens da biocatálise



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M. M. **Imobilização de Lipases em Bucha Vegetal: Preparação de Esteres de Aroma**. Trabalho de Conclusão de Curso—Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

ANKUDEY, E. G.; OLIVO, H. F.; PEEPLES, T. L. Lipase-mediated epoxidation utilizing urea hydrogen peroxide in ethyl acetate. **Green Chemistry**, v. 8, n. 10, p. 923, 2006.

ARMISEN, R. World-wide use and importance of Gracilaria. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, n. 3, p. 231–243, maio 1995.

ASTANI, A.; REICHLING, J.; SCHNITZLER, P. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1–8, 2011.

AVERY, C. A. et al. ( $\pm$ ) cis-bisamido epoxides: A novel series of potent FXIII-A inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 98, p. 49–53, jun. 2015.

BETTI, C.; LANDINI, D.; MAIA, A. Reactivity of anionic nucleophiles in ionic liquids and molecular solvents. **Tetrahedron**, v. 64, n. 8, p. 1689–1695, 18 fev. 2008.

BHATIA, S. P. et al. Fragrance material review on  $\alpha$ -bisabolol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11, p. S72–S76, nov. 2008.

BIBI, Z. et al. Agar–agar entrapment increases the stability of endo- $\beta$ -1,4-xylanase for repeated biodegradation of xylan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 121–127, abr. 2015.

BITENCOURT, T. B.; NASCIMENTO, M. DA G. The influence of organic solvent and ionic liquids on the selective formation of 2-(2-ethylhexyl)-3-phenyl-1,2-oxaziridine mediated by lipases. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 23, n. 10, p. 995–999, 25 ago. 2010.

BJORKLING, F.; GODTFREDSSEN, S. E.; KIRK, O. Lipase-mediated formation of peroxycarboxylic acids used in catalytic epoxidation of alkenes. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 19, p. 1301, 1990.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. . **Introdução à química de alimentos**. São Paulo: Varela, 1989.

BRADY, D.; JORDAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 11, p. 1639–1650, 2009.

CABRAL, J. S. **Engenharia enzimática**. Lisboa: Lidel, 2003.

CALISKAN, Z. Z.; ERSEZ, M. S. Stereoselective synthesis of optically active 1-benzyl-4,5,6,7-tetrahydro-6,6-dimethyl-4-oxo-1H-indol-7-yl acetate and 1-benzyl-6,7-dihydro-7-hydroxy-6,6-dimethyl-1H-indol-4(5H)-one through lipase-catalyzed esterification and transesterification processes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 111, p. 64–70, jan. 2015.

CAMPBELL, M. K. et al. **Bioquímica**. São Paulo: Thomson, 2007.

CAO, Y. et al. Highly efficient resolution of mandelic acid using lipase from *Pseudomonas stutzeri* LC2-8 and a molecular modeling approach to rationalize its enantioselectivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 108–113, jan. 2014.

CHANG, H. et al. Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6266–6270, set. 2008.

CHAVAN, M. J.; WAKTE, P. S.; SHINDE, D. B. Analgesic and anti-inflammatory activity of caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. **Phytomedicine**, v. 17, n. 2, p. 149–151, fev. 2010.

CHIBATA, I.; TOSA, T. Use of immobilized cells. **Annual Review of Biophysics and Bioengineering**, v. 10, n. 1, p. 197–216, jun. 1981.

CHUA, S.-C.; XU, X.; GUO, Z. Emerging sustainable technology for epoxidation directed toward plant oil-based plasticizers. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 10, p. 1439–1451, Outubro 2012.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. G. **Organic chemistry**. 2nd ed. Oxford ; New York: Oxford University Press, 2012.

CORRÊA, F. DE A. et al. Epoxidation of oleic acid catalyzed by PSCI-Amano lipase optimized by experimental design. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 81, p. 7–11, set. 2012.

COX, M. M.; LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. **Principles of biochemistry**. New York: Freeman, 2005.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. DA G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623–630, ago. 2004.

DAMODARAN, N. P.; DEV, S. Studies in sesquiterpenes—XXXVII: Sesquiterpenoids from the essential oil of zingiber zerumbet smith. **Tetrahedron**, v. 24, n. 11, p. 4113–4122, 1968.

DA SILVA, J. C. **Preparação do acetato de 1-octila catalisada por lipases imobilizadas em filmes de amido de milho/dextrana**. Trabalho de Conclusão de Curso—Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

DA SILVA, J. M. R. et al. Enzymatic epoxidation of  $\beta$ -caryophyllene using free or immobilized lipases or mycelia from the Amazon region. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 95, p. 48–54, nov. 2013.

DA SILVA, J. M. R.; NASCIMENTO, M. DA G. Chemoenzymatic epoxidation of citronellol catalyzed by lipases. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 517–522, mar. 2012.

DE VRIES, E. J.; JANSSEN, D. B. Biocatalytic conversion of epoxides. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 414–420, Agosto 2003.

DOUKYU, N.; OGINO, H. Organic solvent-tolerant enzymes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 3, p. 270–282, fev. 2010.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry: a textbook**. Berlin: Springer Berlin, 2011.

FENG, G. et al. A new, efficient and highly-regioselective approach to synthesis of 6-O-propionyl-D-glucose by using whole-cell biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal**, v. 95, p. 56–61, mar. 2015.

FENG, X. et al. The spinning cloth disc reactor for immobilized enzymes: A new process intensification technology for enzymatic reactions. **Chemical Engineering Journal**, v. 221, p. 407–417, abr. 2013.

FERREIRA, I. M. et al. Chemoselective biohydrogenation of  $\alpha$ ,  $\beta$ - and  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -unsaturated ketones by the marine-derived fungus *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 in a biphasic system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 59–65, maio 2015.

GARCIA-GALAN, C. et al. Biotechnological prospects of the lipase from *Mucor javanicus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 93, p. 34–43, Setembro 2013.

GARCÍA, N. L. et al. Effect of glycerol on the morphology of nanocomposites made from thermoplastic starch and starch nanocrystals. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 203–210, fev. 2011.

GHAEDIZADEH, S. et al. Understanding the molecular behaviour of *Renilla luciferase* in imidazolium-based ionic liquids, a new model for the  $\alpha/\beta$  fold collapse. **Biochemical Engineering Journal**, v. 105, p. 505–513, jan. 2016.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, v. 63, n. 8, p. 1721–1754, 19 fev. 2007.

GHELARDINI, C. et al. Local anaesthetic activity of  $\beta$ -caryophyllene. **II Farmaco**, v. 56, n. 5-7, p. 387–389, jul. 2001.

GOLETS, M.; AJAIKUMAR, S.; MIKKOLA, J.-P. Catalytic upgrading of extractives to chemicals: monoterpenes to “exicals”. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 9, p. 3141–3169, 13 maio 2015.

GONÇALVES, R. A. C.; OLIVEIRA, A. J. B.; GONÇALVES, J. E. **Biocatálise e Biotransformação Fundamentos e Aplicações**. São Paulo: Editora Schoba, 2012. v. 2

GUPTA, R. et al. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. **Progress in Lipid Research**, v. 57, p. 40–54, jan. 2015.

HAGSTRÖM, A. E. V. et al. Chemo-enzymatic epoxidation–process options for improving biocatalytic productivity. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 1, p. 67–76, 2011.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 17–34, Agosto 2003.

HIYOSHI, N. Nanocrystalline sodalite: Preparation and application to epoxidation of 2-cyclohexen-1-one with hydrogen peroxide. **Applied Catalysis A: General**, v. 419–420, p. 164–169, 29 mar. 2012.

HOFFMANN, I.; SILVA, V. D.; NASCIMENTO, M. DA G. Enantioselective resolution of (*R,S*)-1-phenylethanol catalyzed by lipases immobilized in starch films. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1559–1567, ago. 2011.

HORVÁTH, B. et al.  $\beta$ -Caryophyllene ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in a cannabinoid 2 receptor-dependent manner. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 8, p. 1325–1333, abr. 2012.

HULT, K.; BERGLUND, P. Enzyme promiscuity: mechanism and applications. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 231–238, maio 2007.

IQBAL, M. et al. Production of fungal biomass immobilized loofa sponge (FBILS)-discs for the removal of heavy metal ions and chlorinated compounds from aqueous solution. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 17, p. 1319–1323, 1 set. 2005.

IZRAEL ŽIVKOVIĆ, L. T. et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase by adsorption onto biosafe meso/macroporous silica and zirconia. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 73–83, jan. 2015.

JELEŇ, H. H.; GRACKA, A. Analysis of black pepper volatiles by solid phase microextraction–gas chromatography: A comparison of terpenes profiles with hydrodistillation. **Journal of Chromatography A**, v. 1418, p. 200–209, out. 2015.

JEONG, C. Y. et al. Bioelectrocatalytic sensor for triglycerides in human skin sebum based on enzymatic cascade reaction of lipase, glycerol kinase and glycerophosphate oxidase. **Journal of Biotechnology**, v. 175, p. 7–14, abr. 2014.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, Abril 2012.

KHALAF, N. et al. Cross-Linked enzyme crystals as highly active catalysts in organic solvents. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 23, p. 5494–5495, 1996.

KHAN, N. R.; RATHOD, V. K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: a review. **Process Biochemistry**, jul. 2015.

KLAAS, M. R. GEN; WARWEL, S. Chemoenzymatic epoxidation of unsaturated fatty acid esters and plant oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 11, p. 1453–1457, 1 nov. 1996.

KLAOCHANPONG, N. et al. Physicochemical and structural properties of debranched waxy rice, waxy corn and waxy potato starches. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 218–226, mar. 2015.

KLEMM, D. et al. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 30 maio 2005.

KLIBANOV, A. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 14, n. 4, p. 141–144, abr. 1989.

KUBO, I. et al. Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. **Planta Medica**, v. 62, n. 05, p. 427–430, out. 1996.

KUMARAGURU, T.; FADNAVIS, N. W. Resolution of racemic 4-hydroxy-2-cyclopentenone with immobilized penicillin G acylase. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 23, n. 10, p. 775–779, 31 maio 2012.

KUO, C.-H. et al. Optimum conditions for lipase immobilization on chitosan-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 4, p. 2538–2545, 1 mar. 2012.

LAANE, C. et al. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 1, p. 81–87, 1987.

LAHAYE, M.; ROCHAS, C. Chemical structure and physico-chemical properties of agar. In: JUANES, J. A.; SANTELICES, B.; MCLACHLAN,

J. L. (Eds.). . **International Workshop on Gelidium**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1991. p. 137–148.

LANCASTER, M.; ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY (GREAT BRITAIN). **Green chemistry: an introductory text**. 2nd ed ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2010.

LAVOINE, N. et al. Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. **Carbohydrate Polymers**, 2012.

LEBLANC, R. et al. Synthesis and cytotoxicity of epoxide and pyrazole analogs of the combretastatins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 21, p. 6025–6034, 1 nov. 2005.

LEONHARDT, V. et al. Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* and its main constituent  $\beta$ -caryophyllene on rat isolated ileum: Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeflorus*. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 6, p. 749–758, dez. 2010.

LI, L. et al. Efficient mono-acylation of fructose by lipase-catalyzed esterification in ionic liquid co-solvents. **Carbohydrate Research**, v. 416, p. 51–58, out. 2015.

LINKO, Y.-Y. et al. Biodegradable products by lipase biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 66, n. 1, p. 41–50, nov. 1998.

LIU, K.-M.; LIU, K.-J. Lipase-catalyzed synthesis of palmitanilide: Kinetic model and antimicrobial activity study. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 82, p. 82–88, jan. 2016.

LI, X. et al. Evaluation of three traditional Chinese medicine (TCM) starches and potential application in health product industry. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 196–202, out. 2014.

LOUGHLIN, W. A. Biotransformations in organic synthesis. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 49–62, ago. 2000.

LUCHESE, C. L. et al. Synthesis and characterization of biofilms using native and modified pinhão starch. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 203–210, mar. 2015.

MADALOZZO, A. D. et al. Immobilization of LipC12, a new lipase obtained by metagenomics, and its application in the synthesis of biodiesel esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 116, p. 45–51, jun. 2015.

MAGIATIS, P. et al. Chemical composition and in-vitro antimicrobial activity of the essential oils of three Greek *Achillea* species. v. 57 c, p. 287–290, 2002.

MAI, N. L.; AHN, K.; KOO, Y.-M. Methods for recovery of ionic liquids—A review. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 5, p. 872–881, maio 2014.

MARSAIOLI, A. J.; PORTO, A. L. M. **Biocatálise e Biotransformação - Fundamentos e Aplicações**. 1<sup>a</sup>. Ed. São Paulo: Schoba Editora, 2010. v. 1

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, Maio 2007.

MELEIGY, S. A.; KHALAF, M. A. Biosynthesis of gibberellic acid from milk permeate in repeated batch operation by a mutant *Fusarium moniliforme* cells immobilized on loofa sponge. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 374–379, jan. 2009.

MILNER, S. E.; MAGUIRE, A. R. Recent trends in whole cell and isolated enzymes in enantioselective synthesis. **ARKIVOC**, v. (i), p. 321–382, 2012.

MIYAURA, N.; KOCHI, J. K. Chromyl complexes in the direct epoxidation of alkenes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 105, n. 8, p. 2368–2378, Abril 1983.

MOHAMAD, N. R. et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220, 4 mar. 2015.

MONIRUZZAMAN, M. et al. Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 3, p. 295–314, 15 fev. 2010.



MONTEIRO, J. L. F.; VELOSO, C. O. Catalytic Conversion of Terpenes into Fine Chemicals. **Topics in Catalysis**, v. 27, p. 169–180, 2004.

MONZOTE, L. et al. Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 240, n. 3, p. 337–347, nov. 2009.

MOREIRA, M. A.; NASCIMENTO, M. G. Chemo-enzymatic epoxidation of (+)-3-carene. **Catalysis Communications**, v. 8, n. 12, p. 2043–2047, dez. 2007.

MORISSO, F. D. P.; COSTA, V. E. U. Kinetic resolution of ( $\pm$ )-5-bromo-12-oxa-pentacyclo-[6.2.1.16,9.02,7.02,10]dodeca-4-ene-3-endo-ol and ( $\pm$ )-5-bromo-13-oxa-pentacyclo[6.2.2.16,9.02,7.02,10]trideca-4-ene-3-endo-ol via *Pseudomonas*-mediated lipase-catalyzed transesterification. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 12, n. 19, p. 2641–2647, 30 out. 2001.

MORITA, T. **Manual de soluções, reagentes e solventes padronização, preparação, purificação, indicadores de segurança, descarte de produtos químicos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2007.

MORIWAKI, C. et al. Biosynthesis of CGTase by immobilized alkalophilic bacilli and crystallization of beta-cyclodextrin: Effective techniques to investigate cell immobilization and the production of cyclodextrins. **Biochemical Engineering Journal**, v. 83, p. 22–32, fev. 2014.

MOTHERWELL, W. B. et al. A study of some molecularly imprinted polymers as protic catalysts for the isomerisation of  $\alpha$ -pinene oxide to trans-carveol. **Tetrahedron**, v. 60, n. 14, p. 3231–3241, mar. 2004.

MULAGALAPALLI, S. et al. Immobilization of urease from pigeonpea (*Cajanus cajan*) on agar tablets and its application in urea assay. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 142, n. 3, p. 291–297, 17 abr. 2007.

MURPHREE, S. S.; PADWA, A. Epoxides and aziridines - a mini review. **ARKIVOC**, v. iii, p. 6–33, 2006.

NASCIMENTO, M. DA G. et al. The use of organic solvents/ionic liquids mixtures in reactions catalyzed by lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized in different supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 112, p. 1–8, fev. 2015.

NETTO, C. G. C. M.; TOMA, H. E.; ANDRADE, L. H. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85–86, p. 71–92, jan. 2013.

OBOH, I. O.; ALUYOR, E. O. *Luffa cylindrica* - an emerging cash crop. **African Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 8, p. 684–688, 2009.

OGBONNA, J. C. et al. Efficient production of ethanol by cells immobilized in Loofa (*Luffa cylindrica*) sponge. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 84, n. 3, p. 271–274, 1997.

OLIVEIRA, A. . et al. Enzymatic esterification of ethanol by an immobilised *Rhizomucor miehei* lipase in a perforated rotating disc bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 5-6, p. 446–450, mar. 2000.

OSTOVIC, D.; BRUICE, T. C. Mechanism of alkene epoxidation by iron, chromium, and manganese higher valent oxo-metalloporphyrins. **Accounts of Chemical Research**, v. 25, n. 7, p. 314–320, 1 jul. 1992.

PAGNO, C. H. et al. Development of active biofilms of quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 173, p. 755–762, abr. 2015.

PAN, S. et al. Esterification activity and conformation studies of *Burkholderia cepacia* lipase in conventional organic solvents, ionic liquids and their co-solvent mixture media. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 24, p. 9822–9824, dez. 2010.

PARK, K.-R. et al.  $\beta$ -Caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. **Cancer Letters**, v. 312, n. 2, p. 178–188, dez. 2011.

PARTAP, S. et al. *Luffa cylindrica*: An important medicinal plant. v. 1, n. 2, p. 127–134, 2012.

PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 174–187, dez. 2015.

PILISSÃO, C.; CARVALHO, P. DE O.; NASCIMENTO, M. DA G. Enantioselective acylation of (*R,S*)-phenylethylamine catalysed by lipases. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 12, p. 1352–1357, Dezembro 2009.

PILISSÃO, C.; CARVALHO, P. DE O.; NASCIMENTO, M. DA G. Potential application of native lipases in the resolution of (*R,S*) - phenylethylamine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 6, p. 973–977, 2010.

PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R. D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1-2, p. 67–80, jun. 1998.

POHLIT, A. M.; FERRAZ, H. M. C. Estudos de RMN de epóxidos: uma Visão Geral. **Química Nova**, v. 18, p. 160–170, 1995.

REHMAN, H. U. et al. Immobilization of pectin degrading enzyme from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21 using agar-agar as a support. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 622–626, fev. 2014.

SAHEB, D. N.; JOG, J. P. Natural fiber polymer composites: A review. **Advances in Polymer Technology**, v. 18, n. 4, p. 351–363, 1999.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z. Solvent tolerant lipases: A review. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 86–96, jan. 2015.

SATTARI, S.; VAHABZADEH, F.; AGHTAEI, H. K. Performance of loofa-immobilized *Rhizopus oryzae* in the enzymatic production of biodiesel with use of oleic acid in *n*-hexane medium. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 2, p. 367–376, jun. 2015.

SEBRÃO, D.; SÁ, M. M.; NASCIMENTO, M. DA G. Regioselective acylation of D-ribo-1,4-lactone catalyzed by lipases. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 551–556, fev. 2011.

SERDAKOWSKI, A. L.; DORDICK, J. S. Enzyme activation for organic solvents made easy. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 48–54, jan. 2008.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627–662, Dezembro 2001.

SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The quest for optimum performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 8-9, p. 1289–1307, 2007.

SHEN, J. et al. Water-responsive rapid recovery of natural cellular material. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 34, p. 283–293, jun. 2014.

SHIMOMURA, K. et al. Lipase-mediated dynamic kinetic resolution (DKR) of secondary alcohols in the presence of zeolite using an ionic liquid solvent system. **Catalysis Today**, v. 255, p. 41–48, out. 2015.

SIBBALD, B. Conditional okay for cannabis prescription drug. **Canadian Medical Association Journal**, v. 172, n. 13, p. 1672–1672, 21 jun. 2005.

SIENEL, G.; RIETH, R.; ROWBOTTOM, K. T. Epoxides. In: WILEY-VCH VERLAG GMBH & CO. KGAA (Ed.). . **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000.

SILVA, W. J. et al. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3251–3255, maio 2008.

SILVA, W. S. D. et al. Enzyme-mediated epoxidation of methyl oleate supported by imidazolium-based ionic liquids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 1, p. 98–103, jan. 2011.

SINGH, G. et al. Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* (Seed) essential oil, oleoresin, and their selected components . **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 174–181, jan. 2006.

SIÓDMIĄK, T.; ZIEGLER-BOROWSKA, M.; MARSZAŁŁ, M. P. Lipase-immobilized magnetic chitosan nanoparticles for kinetic resolution of (*R,S*)-ibuprofen. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 94, p. 7–14, Outubro 2013.

SJÖSTRÖM, E. **Wood chemistry : Fundamentals and applications**. San Diego, Calif.: Academic, 1993.

SKÖLD, M. et al. The fragrance chemical  $\beta$ -caryophyllene—air oxidation and skin sensitization. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 4, p. 538–545, Abril 2006.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; WHEI, O. L. **Química orgânica**. Rio de Janeiro: LTC, 2002.

SPERANZA, P.; RIBEIRO, A. P. B.; MACEDO, G. A. Application of lipases to regiospecific interesterification of exotic oils from an Amazonian area. **Journal of Biotechnology**, v. 218, p. 13–20, jan. 2016.

SUBILEAU, M. et al. The 3D model of the lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis*, a tool for the elucidation of structural determinants in CAL-A lipase superfamily. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1854, n. 10, p. 1400–1411, out. 2015.

SURBURG, H. et al. **Common fragrance and flavor materials preparation, properties and uses**. Weinheim: Wiley-VCH, 2006.

SWEERS, H. M.; WONG, C. H. Enzyme-catalyzed regioselective deacylation of protected sugars in carbohydrate synthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 108, n. 20, p. 6421–6422, 1986.

ŚWIDEREK, K.; MARTÍ, S.; MOLINER, V. Theoretical study of primary reaction of *Pseudozyma antarctica* Lipase B as the starting point to understand Its promiscuity. **ACS Catalysis**, v. 4, n. 2, p. 426–434, 7 fev. 2014.

TALJA, R. A. et al. Effect of various polyols and polyol contents on physical and mechanical properties of potato starch-based films. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 3, p. 288–295, fev. 2007.

TEIXEIRA, M. F. S. et al. **Fungos da Amazônia: Uma Riqueza Inexplorada**. Manaus: Editora da Universidade Federal do Amazonas, 2011.

TEMPLETON, W. **An introduction to the Chemistry of the Terpenoids and steroids**. London: Butterworths, 1969.

TÖRNVALL, U. et al. ORIGINAL RESEARCH: Biocatalytic production of fatty epoxides from rapeseed & tall oil derivatives: Process &

environmental evaluation. **Industrial Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 184–192, set. 2009.

TUNDO, P.; ESPOSITO, V. **Green chemical reactions**. Dordrecht: Springer, 2008.

VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Biocatalysis in ionic liquids. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 6, p. 2757–2785, jun. 2007.

VOET, D. **Bioquímica**. Porto Alegre, Artemed: [s.n.].

WANG, X. et al. A mechanistic study into the epoxidation of carboxylic acid and alkene in a mono, di-acylglycerol lipase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 460, n. 2, p. 392–396, maio 2015.

WOHLGEMUTH, R. The locks and keys to industrial biotechnology. **New Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 204–213, abr. 2009.

WU, R. et al. Immobilization of pectinase on oxidized pulp fiber and its application in whitewater treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 2, p. 523–529, Setembro 2013.

XIAO, P. et al. Stereoselective synthesis of caffeic acid amides via enzyme-catalyzed asymmetric aminolysis reaction. **Journal of Biotechnology**, v. 168, n. 4, p. 552–559, dez. 2013.

XU, Y.; KHAW, N. R. B. J.; LI, Z. Efficient epoxidation of alkenes with hydrogen peroxide, lactone, and lipase. **Green Chemistry**, v. 11, n. 12, p. 2047, 2009.

ZANOTTO, S. P. et al. Potential application in biocatalysis of mycelium-bound lipases from Amazonian fungi. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1046–1059, 2009.

ZHU, X. et al. Covalent immobilization of enzymes within micro-aqueous organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 3–4, p. 145–149, nov. 2011.

## 7. PRODUÇÃO ACADÊMICA 2012-2015

### 7.1. Artigos completos publicados em periódicos

1. COLARES, LIGIA, PEREIRA, EDERSON R, MERIB, JOSIAS, SILVA, JULYETTY C, **SILVA, Jaqueline M**, WELZ, BERNHARD, CARASEK, EDUARDO, BORGES, DANIEL LAZARO GALLINDO Application of disposable starch-based platforms for sample introduction and determination of refractory elements using graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis. Journal of Analytical Atomic Spectrometry (Print). , v.30, p.381 - , 2014.
2. **SILVA, JAQUELINE M. R. DA**, NASCIMENTO, MARIA DA GRAÇA CHEMO-ENZYMATIC EPOXIDATION OF  $\beta$ -CARYOPHYLLENE USING LIPASES IMMOBILIZED IN AGAR GEL. Química Nova (Impresso). , v.37, p.1022 - 1027, 2014.
3. NASCIMENTO, MARIA DA GRAÇA, **SILVA, JAQUELINE MARIA RAMOS DA**, SILVA, JULYETTY CRYSTYNE DA, ALVES, MANUELLA MIRANDA The use of organic solvents/ionic liquids mixtures in reactions catalyzed by lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized in different supports. Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic (Print). v.112, p.1 - 8, 2014.
4. **DA SILVA, JAQUELINE MARIA RAMOS**, BITENCOURT, THIAGO BERGLER, MOREIRA, MARCELO ALVES, NASCIMENTO, MARIA DA GRAÇA Enzymatic epoxidation of  $\beta$ -caryophyllene using free or immobilized lipases or mycelia from the Amazon region. Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic (Print). , v.95, p.48 - 54, 2013.
5. **SILVA, J. M. R.**, NASCIMENTO, M. G. Chemoenzymatic epoxidation of citronellol catalyzed by lipases. Process Biochemistry (1991). , v.47, p.517 - 522, 2012.

### 7.2. Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

- 1- ALVES, M. M., **SILVA, J. M. R.**, NASCIMENTO, M. G. Avaliação do uso de diferentes lipases, do tempo e da temperatura na preparação do octanoato de *n*-pentila In: XXII Encontro de Química

da Região Sul, 2015, Joinville. **Inovação na Indústria Química.** , 2015.

2- SILVA, J. C., SILVA, J. M. R., ALVES, M. M., NASCIMENTO, M.G. Avaliação do método de imobilização e efeito do uso de líquidos iônicos na preparação do acetato de 1-octila catalisada por LBC In: XXI Encontro regional de química da região sul, 2014, Maringá. **Química sem fronteiras: Internacionalização e difusão do conhecimento.** , 2014.

3- SILVA, J. M. R., SILVA, J. C., ALVES, M. M., NASCIMENTO, M.G. Efeito do solvente na epoxidação quimioenzimática do  $\beta$ -cariofileno catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacea* imobilizada em diferentes suportes In: XXI Encontro de Química da Região Sul, 2014, Maringá. **Química sem fronteiras: Internacionalização e difusão do conhecimento.** , 2014.

4- SILVA, J. M. R., ALVES, M. M., NASCIMENTO, M. G. Preparação do octanoato de 1-pentila com a lipase F-AP15 imobilizada em bucha vegetal In: XI Seminário Brasileiro de tecnologia enzimática, 2014, Rio de Janeiro. **Para um mundo sustentável.** , 2014.

5- SILVA, J. M. R., NASCIMENTO, M. G., ZANOTTO, S. Epoxidation of B-caryophyllene mediated by mycelia from the amazon region - influence of the time and temperature In: 12<sup>a</sup> Conferência Latino-Americana de Físico-Química Orgânica, 2013, Foz do Iguaçu. **CLAFQO-12.** , 2013.

6- SILVA, J. M. R., NASCIMENTO, M. G. Influência do tempo e da temperatura na epoxidação do  $\beta$ -cariofileno catalisada pela lipase FAP15 imobilizada em gel de ágar In: XX Encontro de Química da Região Sul, 2013, Lajeado RS. **Química e Biotecnologia: do Ambiente à Produção de Alimentos.** , 2013.

7- SILVA, J. M. R., NASCIMENTO, M. G. The Influence of Organic Solvent on the chemo-enzymatic epoxidation of  $\beta$ -caryophyllene catalyzed by lipases immobilized in agar gel In: 12<sup>a</sup> Conferência Latino-Americana de Físico-Química Orgânica, 2013, Foz do Iguaçu. **CLAFQO-12.** , 2013.



8- **SILVA, J. M. R.**, NASCIMENTO, M. G. Variação da quantidade de agente oxidante e doador acila na epoxidação quimio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno catalisada por micélios da região amazônica In: XX Encontro de Química da Região Sul, 2013, Lajeado RS. **Química e Biotecnologia: do Ambiente à Produção de Alimentos.** , 2013.

9- **SILVA, J. M. R.**, NASCIMENTO, M. G., SILVA, V. D. Cultivo e Utilização do micélio UEA\_06 da Região Amazônica na epoxidação Químio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno In: XIX Encontro de Química da Região Sul, 2012, Tubarão. **“A Contribuição da Química para o Desenvolvimento Tecnológico e Sustentável”.** , 2012.

10- NIEBISCH, F., **SILVA, J. M. R.**, NASCIMENTO, M. G. Extração do Amido de Pinhão e Preparação de biofilmes In: XIX Encontro de Química da Região Sul, 2012, Tubarão. **“A Contribuição da Química para o Desenvolvimento Tecnológico e Sustentável”.** , 2012.

11- **SILVA, J. M. R.**, NASCIMENTO, M. G. Influência da agitação na Epoxidação do B-cariofileno catalisada por lipases imobilizadas em gel de ágar In: XIX Encontro de Química da Região Sul, 2012, Tubarão. **“A Contribuição da Química para o Desenvolvimento Tecnológico e Sustentável”.** , 2012.

12- **SILVA, J. M. R.**, NASCIMENTO, M. G., SILVA, R., CARAMORI, G. F. Influência do solvente na epoxidação quimio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno In: VI Workshop de Biocatálise e Biotransformação, 2012, Fortaleza. **VI Workshop de Biocatálise e Biotransformação.** , 2012.

### 7.3. Apresentação de trabalho e palestra

1- SILVA, J. M. R., SILVA, J. C., ALVES, M. M., NASCIMENTO, M. G. Efeito do uso de líquidos iônicos e da imobilização da lipase de *Burkholderia cepacea* na epoxidação do  $\beta$ -cariofileno, 2015. (Outra, Apresentação de Trabalho)

2- SILVA, J. M. R., NASCIMENTO, M. G. Aplicações Sintéticas de Enzimas e Micro-organismos em Síntese Orgânica, 2013. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

#### 7.4. Participação em eventos

1- **XXII Encontro de Química da Região Sul**, 2015. (Encontro) Efeito do uso de líquidos iônicos e da imobilização da lipase de *Burkholderia cepacea* na epoxidação do  $\beta$ -cariofileno.

2- Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XXI Encontro Regional de Química da Região Sul**, 2014.(Encontro) Efeito do solvente na epoxidação quimio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacea* imobilizada em diferentes suportes.

3- Apresentação de Poster / Paineis no(a) **Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**, 2014. (Seminário) Preparação do octanoato de 1-pentila com a lipase F-AP15 imobilizada em bucha vegetal.

4- Apresentação de Poster / Paineis no(a) **12ª Conferência Latino-Americana de Físico-Química Orgânica**, 2013. (Congresso) Epoxidation of  $\beta$ -caryophyllene mediated by mycelia from the amazon region - influence of the time and temperature.

5- Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XX Encontro de Química da Região Sul**, 2013. (Congresso) Variação da quantidade de agente oxidante e doador acila na epoxidação quimio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno catalisada por micélios da região amazônica.

6- Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XIX Encontro de Química da Região Sul**, 2012. (Encontro) Cultivo e utilização do micélio UEA\_06 da Região Amazônica na epoxidação quimio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno.

7- Apresentação de Poster / Paineis no(a) **VI Workshop de Biocatálise e Biotransformação**, 2012. (Outra) Influência do solvente na epoxidação quimio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno