

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

Pamela de Almeida Münsfelt

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS PARA A  
EPOXIDAÇÃO QUIMIO-ENZIMÁTICA DO  $\alpha$ -PINENO**

Florianópolis

Pamela de Almeida Münsfelt

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS PARA A  
EPOXIDAÇÃO QUIMIO-ENZIMÁTICA DO  $\alpha$ -PINENO**

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

Orientadora: Prof. Dra. Maria da  
Graça Nascimento

Florianópolis, julho de 2017.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Munsfelt, Pamela

Otimização das condições reacionais para a  
epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno / Pamela  
Munsfelt ; orientadora, Maria da Graça Nascimento,  
2017.

128 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e  
Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química,  
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Química. 2. epoxidos. 3. terpenos. 4. lipases.  
I. Nascimento, Maria da Graça . II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação  
em Química. III. Título.



## **AGRADECIMENTOS**

Inicio meus agradecimentos por DEUS, já que Ele colocou pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta.

E uma dessas pessoas especiais com certeza é a minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria da Graça Nascimento que além de orientadora, sempre foi uma pessoa conselheira e amiga. Obrigada pela amizade, paciência, incentivo, total orientação e pelas oportunidades que me proporcionou. Muito obrigada por todo conhecimento passado e por toda atenção que teve comigo. Minha gratidão será eterna. Sentirei saudades das nossas conversas.

Aos meus pais, João e Fátima, meu infinito agradecimento. Sempre acreditaram em minha capacidade e isso só me fortaleceu e me fez tentar, não ser A MELHOR, mas a fazer o melhor de mim. Obrigada pelo amor incondicional.

Ao meu querido esposo, Rodrigo, por ser tão importante na minha vida. Sempre a meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho.

Às minhas amigas, especialmente Viviane e Aline por só quererem o meu bem e me valorizarem tanto como pessoa. Obrigada pela amizade.

A todos os meus familiares, que sempre se orgulharam de mim, obrigada pela confiança.

Aos meus professores, especialmente os professores do Colégio Dom Jaime, que vibraram comigo, desde a aprovação na prova, e sempre fizeram “propaganda” positiva a meu respeito. Obrigada pela força.

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

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

Ao CNPq, CAPES, e INCT-Catálise pelo apoio financeiro e facilidades concedidas.

A Central de Análises, por tornar possível nosso trabalho, com suas análises.

A Amano e a Novozymes, pelo fornecimento das lipases.

A Profª Patricia O. Carvalho pela doação das lipases nativas (USF – Bragança paulista – SP)

Aos amigos e parceiros do Laboratório de Biocatálise, especialmente a Jaque pelo suporte no início, pelo carinho, amizade, bate-papos no laboratório, empréstimos e ajuda nos softwares.

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

*Aos meus pais e ao Rodrigo*

*Com amor e carinho.*

## RESUMO

Neste trabalho, foram avaliadas diversas condições reacionais que influenciam na epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno. As melhores condições reacionais foram usadas para a epoxidação do  $\beta$ -pineno, citrônella, 3-careno e eugenol.

Inicialmente, 18 lipases de diferentes fontes foram usadas como biocatalisadores na epoxidação do  $\alpha$ -pineno, usando o ácido hexanóico como doador acila e ureia-peróxido de hidrogênio (UPH) como agente oxidante em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Os maiores valores de conversão ao epóxido do  $\alpha$ -pineno (**33**) foram obtidas nas reações catalisadas pelas lipases B de *Candida antarctica* (CALB) e Lipozyme 435, sendo 60 e 75%, em 9 horas, respectivamente.

A seguir, a Lipozyme 435 foi selecionada para avaliar as condições experimentais que podem influenciar na epoxidação do  $\alpha$ -pineno, tais como tempo de reação (3-30h), massa da lipase (20-100mg), temperatura (20-45°C), solventes orgânicos (hexano, tolueno e acetona, entre outros) puros ou em misturas com alguns LIs ([BMIm][PF<sub>6</sub>] e [BMIm][BF<sub>4</sub>]) e o doador acila (ácidos carboxílicos lineares e/ou ramificados). Ao aumentar o tempo de reação, verificou-se um também um aumento na conversão a **33** (20-99%). Ao aumentar a massa da lipase, também foi verificado uma maior conversão ao produto (30-93%). Com relação à temperatura, verificou que após 25°C não houve uma mudança significativa na conversão em **33** (60-71%). No estudo do solvente orgânico, as maiores conversões em **33**, foram obtidas ao utilizar o  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (57%) e o acetato de etila (>99 %). Ao usar misturas de solventes orgânicos e



LIs( 9:1 v/v), não foi possível obter o epóxido **33**. O melhor doador acila foi o ácido hexanóico, sendo que a conversão em **33** foi de 57%. Ao usar ácidos carboxílicos substituídos na posição 2-, 3- e/ou 4- com um grupo retirador de elétron próximo ao centro reacional (Br), as conversões foram baixas( 0-12%).

A seguir, a lipase nativa de *Aspergillus niger* na forma livre (50mg) foi usada em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 25°C por 8-40h. O epóxido **33** foi obtido com conversões de 44-93%. Quando a lipase de *A.niger* foi imobilizada (gel de ágar ou bucha vegetal) (30-70mg/g suporte), o epóxido foi obtido com conversões de 13-21% e 14-73%. Não foi observada a formação do produto em estudos de reutilização dos suportes.

Utilizando as melhores condições experimentais para a epoxidação do  $\alpha$ -pineno (Lipozyme 435, ácido hexanóico, diclorometano, UPH, 25°C, 8h), fez-se a reação com  $\beta$ -pineno, citronelal, 3-careno e eugenol. Nestas condições, obtiveram-se os epóxidos derivados do 3-careno (46%) e do citronelal (59%). Outras condições experimentais podem ser testadas nestas reações.

Estes resultados mostraram que a epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno e de outros terpenos, com lipases, é uma alternativa interessante e viável para a obtenção de epóxidos com boas conversões. Salienta-se que estes compostos são considerados intermediários sintéticos de grande aplicabilidade.

Palavras-chave: epoxidação,  $\alpha$ -pineno e terpenos, lipases.

## ABSTRACT

In this study, several experimental conditions were evaluated in the chemo-enzymatic epoxidation of  $\alpha$ -pinene. The best reaction conditions were used in the epoxidation on  $\beta$ -pinene, citronelal, 3-carene and eugenol.

Firstly, 18 lipases from different sources were used as biocatalysts in the epoxidation of  $\alpha$ -pinene, using hexanoic acid as acyl donor and ureia-hydrogen peroxide (UHP) as an oxidizing agent in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The highest degrees of conversion to  $\alpha$ -pinene epoxide (**33**) were achieved by the use of lipases from *Candida antarctica* (CALB) and Lipozyme 435 (60.0 and 75.0% - 9h).

Then, Lipozyme 435 was selected to evaluate the experimental conditions which can influence in the epoxidation of  $\alpha$ -pinene, such as reaction time (3-30h), lipase loading (20-100mg), temperature (20-45°C), organic solvents (hexane, toluene and acetone or others) pure or in mixture with some ILs ([BMIm][PF<sub>6</sub>] and [BMIm][BF<sub>4</sub>]) and the acyl donor (linear or branched carboxylic acids). With an increase in the reaction time, an increase in the conversion to **33** was observed (20.0 >99%). As the lipase mass loading increased, an increase in the degree of conversion into the product (30.0-93.0%) was also observed. In relation to the temperature, no significative increase in the conversion of **33** was detected, after 25°C, these being of 60.0-70.9%. In the study of organic solvents, the highest degrees of conversion in **33** were obtained using  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (57.0%) and ethyl acetate (>99 %). When mixtures of organic solvents:ILs (9:1 v/v) were used, no product was

detected. The best acyl donor was the hexanoic acid, forming **33** in conversion of 57.0%. When substituted carboxylic acids in the 2-, 3- or 4-position with an withdraw group (Br) were used, the conversion degrees to **33** were low (0-12.0%).

The native lipase from *Aspergillus niger* in a free form (50mg), was used in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> at 25°C for 8-40h. The epoxide **33** was obtained in degrees of conversion of 44.0-93.0%. When the lipase from *A.niger* was immobilized (agar gel or loofa sponge) (30-70mg/g support), the epoxide was obtained in degrees of conversions of 13.0-21.0% and 14.0-73.0%. No product was detected in the reuse of the supports, under the same reaction conditions.

By the use of the best experimental conditions in the epoxidation of  $\alpha$ -pinene (Lipozyme 435, hexanoico ácid, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, UHP, 25°C, 8h), the reactions of  $\beta$ -pinene, citronelal, 3-carene and eugenol were studied. Only the epoxides derived from 3-carene (46.0%) and citronelal (59.0%) were formed. The results herein obtained showed that the chemo-enzymatic epoxidation of  $\alpha$ -pinene and others terpenes, is an interesting and feasible alternative to obtain epoxides in good degrees of conversion. It is worth of mentioning that these compounds are considered synthetic intermediates of high applicability.

Key-words: epoxidation,  $\alpha$ -pinene and terpenes, lipases

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1-Ligação de uma molécula de substrato no sítio ativo de uma enzima. <sup>4</sup> .....	4
Figura 2-Representação geral da formação da ligação peptídica. <sup>4-6</sup> ..	6
Figura 3-Representação esquemática das estruturas das proteínas. <sup>4</sup> .....	7
Figura 4- (a) – Representação da formação do complexo enzima-substrato pelo modelo “chave-fechadura”; (b) representação da ligação enzima-substrato por encaixe induzido. <sup>4</sup> .....	8
Figura 5– Utilização relativa das enzimas em biotransformação e/ou biocatálise. <sup>6,10</sup> .....	11
Figura 6– Mecanismo proposto para hidrólise enzimática de um éster. <sup>5,10</sup> .....	12
Figura 7– Resolução do (R,S)-1-feniletanol (1) com acetato de vinila (2) catalisada pela CALB. <sup>15</sup> .....	14
Figura 8– Modelo tridimensional da estrutura da lipase de <i>Candida antarctica B</i> . <sup>17</sup> .....	15
Figura 9 – Resolução cinética do (R,S)-iodofeniletanol (8) catalisada pela CALB. <sup>21</sup> .....	18
Figura 10– Esterificação enantiosseletiva do (R,S)- ibuprofeno (11) com 1-propanol catalisada pela lipase de <i>A.niger</i> . <sup>22,23</sup> .....	19
Figura 11 – Oxidação do 1,4-dihidronaftaleno (14) catalisada por LRM. <sup>26</sup> .....	20
Figura 12– Reuso da LRM na oxidação quimio-enzimática do 1,4-dihidronaftaleno <sup>(14)</sup> .....	21
Figura 13– Classificação dos métodos de imobilização. <sup>6</sup> .....	23
Figura 14– Estratégias mais utilizadas de imobilização (adaptado da ref.10). .....	25
Figura 15– Hidrocianação do o-clorobenzaldeído (16) catalisada pela R-oxinitrilase de <i>P. amygdalus</i> . <sup>32</sup> .....	26
Figura 16– Epoxidação quimio-enzimática do ácido linoleico (18) catalisada pela CALB. <sup>33</sup> .....	27
Figura 17– Bucha vegetal. <sup>41</sup> .....	28

Figura 18– Estrutura do polímero de celulose (21). <sup>44</sup>	29
Figura 19– Preparação do octanoato de n-pentila (24) catalisada por lipases	30
Figura 20- Estrutura dos monômeros do ágar e usos do ágar a partir da alga marinha. <sup>50</sup>	31
Figura 21– Epoxidação de alceno com perácido. <sup>53</sup>	37
Figura 22– Epoxidação de monoterpenos (32, 34, 36) usando perácidos de acordo com o método de Björkling. <sup>59</sup>	38
Figura 23– Epoxidação quimio-enzimática do $\beta$ -cariofileno (26) catalisada pela CALB. <sup>63</sup>	40
Figura 24– Estruturas dos monoterpenos 41- 43.	41
Figura 25– Estrutura de alguns terpenos. <sup>68</sup>	44
Figura 26– Epoxidação quimio-enzimática do citronelol catalisada pela CALB. <sup>74</sup>	46
Figura 27– Líquidos iônicos mais comuns de 1 <sup>a</sup> e 2 <sup>a</sup> geração usados em biocatálise. <sup>83</sup>	48
Figura 28– Epoxidação do $\alpha$ -pineno via química.	57
Figura 29– (A) Espectro de RMN <sup>1</sup> H do epóxido do $\alpha$ -pineno [CDCl <sub>3</sub> , 400MHz]. (B)Espectro de absorção no infravermelho do epóxido do $\alpha$ -pineno (filme).	60
Figura 30– Epoxidação quimio-enzimática do $\alpha$ -pineno. <sup>61</sup>	61
Figura 31–Imobilização da lipase de <i>A.niger</i> em gel de ágar.	63
Figura 32– Imobilização da lipase de <i>A.niger</i> em bucha vegetal.	64
Figura 33 – Epoxidação quimio-enzimática do $\alpha$ -pineno catalisada por lipases.	65
Figura 34– Influência do tempo na epoxidação quimio-enzimática do $\alpha$ -pineno	69
Figura 35– Influência do tempo na epoxidação quimio-enzimática do $\alpha$ -pineno	71
Figura 36– Espectros de RMN 1H (2,9 - 5,4 ppm) mostrando a influência do tempo na epoxidação quimio-enzimática do $\alpha$ -pineno (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz).	72
Figura 37– Influência da massa da Lipozyme 435 na epoxidação quimio-enzimática do $\alpha$ -pineno.	74

Figura 38– Influência da temperatura na formação do epóxido do $\alpha$ -pineno. ....	75
Figura 39– Influência do tamanho da cadeia alquílica do doador acila na epoxidação quimio-enzimática do $\alpha$ -pineno. ....	82
Figura 40– Estruturas dos ácidos carboxílicos usados na epoxidação quimio-enzimática do $\alpha$ -pineno.....	84
Figura 41– Espectro de RMN 1H (0,0 – 5,5 ppm) de uma alíquota da reação de epoxidação quimio-enzimática do 3-careno catalisada pela Lipozyme 435. (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz).....	90
Figura 42- Espectro de RMN 1H (0,0 –10,0 ppm) de uma alíquota da reação de epoxidação quimio-enzimática do citronelal catalisada pela Lipozyme 435. (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz).....	91
Figura 43– Influência do tempo na epoxidação quimio-enzimática do $\alpha$ -pineno. ....	93
Figura 44– Influência da massa da lipase de <i>A. niger</i> imobilizada em gel de ágar na epoxidação quimio-enzimática do $\alpha$ -pineno. ....	95
Figura 45– Aparência do gel de ágar antes e após a reação de epoxidação do $\alpha$ -pineno. ....	96
Figura 46– Influência da massa da lipase de <i>A. niger</i> imobilizada em bucha vegetal na epoxidação quimio-enzimática do $\alpha$ -pineno.. ....	97
Figura 47 – Aparência da bucha vegetal antes e depois da reação de epoxidação do $\alpha$ -pineno. ....	98

## INDICE DE TABELAS

Tabela 1- Valores do aumento da velocidade catalisada por enzimas. 4	5
Tabela 2– Classificação internacional das enzimas segundo a UIBBM. 4	10
Tabela 1- Valores do aumento da velocidade catalisada por enzimas. 4	5
Tabela 2– Classificação internacional das enzimas segundo a UIBBM. 4	10
Tabela 3– Resolução do (R,S)-mentol (5) com acetato de vinila (2) catalisada por diferentes lipases. 20	17
Tabela 4– Tipos de ágar disponíveis para uso comercial. 50	32
Tabela 5– Epoxidação quimio-enzimática do $\beta$ -cariofileno utilizando diferentes lipases. 35	34
Tabela 6– Epoxidação de alcenos catalisada pela CALB usando dimetil carbonato ou acetato de etila. 62	39
Tabela 7– Classificação dos terpenóides. 68	43
Tabela 8– Epoxidação do D-limoneno e (S)-carvona com a LRM. 64	45
Tabela 9– Epoxidação de alcenos na presença de CALB em líquido iônico. 83	49
Tabela 10 - Epoxidação do ciclohexeno com a CALB em líquido iônico a 50°C. 83	50
Tabela 11– Avaliação do uso de diferentes lipases na epoxidação quimio-enzimática do $\alpha$ -pineno.....	67
Tabela 12- Efeito do solvente orgânico na epoxidação quimio- enzimática do $\alpha$ -pineno. ....	78
Tabela 13– Influência do uso de diferentes doadores acilas (61-77) na epoxidação quimio-enzimática do $\alpha$ -pineno. ....	85
Tabela 14– Valores de conversão ao epóxido do $\alpha$ -pineno catalisada pela lipase de <i>A. niger</i> livre e imobilizada. ....	99

## SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

BV = bucha vegetal

C.E. = comissão de enzima

c/ conv. = conversão

CALB = lipase B de *Candida Antarctica*

$\text{CDCl}_3$  = clorofórmio deuterado

CG = cromatografia gasosa

Col. = colaboradores

E = razão enantiomérica

ee = excesso enantiomérico

Equiv. = equivalente

ESBO = óleo de soja epoxidado

h = horas

IV = infravermelho



L. = *Luffa*

LIs = Líquidos iônicos

Log *P* = logaritmo do coeficiente de partição octanol/água

mCPBA = ácido metacloroperbenzóico

MTBE = éter t-butil metílico

N° = número

o- = orto

p.ex. = por exemplo

pH = potencial hidrogeniônico

PVC = policloreto de vinila

RMN <sup>1</sup>H = ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RNA = ácido ribonucleico

RPM = rotação por minuto

UIBBM = União internacional de bioquímica e biologia molecular

UPH = ureia peróxido de hidrogênio

σ = sigma

# ÍNDICE GERAL

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	1
1.2 ENZIMAS.....	2
1.3 LIPASES.....	11
1.4 IMOBILIZAÇÕES DE ENZIMAS.....	21
1.5 SUPORTES .....	27
1.6 EPÓXIDOS .....	35
1.7 TERPENOS.....	42
1.8 LÍQUIDO IÔNICO .....	47
2 OBJETIVOS.....	51
2.1 OBJETIVO GERAL.....	51
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	51
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	53
3.1 MATERIAIS .....	53
3.2 EQUIPAMENTOS.....	56
3.3 PREPARAÇÃO DO EPÓXIDO DO $\alpha$ -PINENO VIA NÃO ENZIMÁTICA.....	56
3.4 PREPARAÇÃO QUIMIO-ENZIMÁTICA DO DERIVADO DO $\alpha$ -PINENO.....	61
3.5 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE <i>Aspergillus niger</i> .....	62
3.5.1 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE EM GEL DE ÁGAR .....	62
3.5.2 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE EM BUCHA VEGETAL.....	63

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
4.1 EPOXIDAÇÃO QUIMIO-ENZIMÁTICA DO $\alpha$ -PINENO.....	65
4.1.1 AVALIAÇÃO DO USO DE DIFERENTES LIPASES.....	66
4.2. EPOXIDAÇÃO QUIMIO-ENZIMÁTICA DO $\alpha$ -PINENO COM A CALB.....	68
4.2.1 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE REAÇÃO.....	68
4.3 EPOXIDAÇÃO QUIMIO-ENZIMÁTICA DO $\alpha$ -PINENO COM A LIPOZYME 435.....	70
4.3.2 INFLUÊNCIA DA MASSA DA LIPOZYME 435.....	73
4.3.3 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA.....	75
4.3.4 EFEITO DO SOLVENTE ORGÂNICO.....	76
4.3.5 INFLUÊNCIA DO DOADOR ACILA.....	81
4.4 EPOXIDAÇÃO QUIMI-ENZIMÁTICA DE OUTROS TERPENOS.....	88
4.5 EPOXIDAÇÃO QUIMIO-ENZIMÁTICA DO $\alpha$ -PINENO COM A LIPASE DE <i>A. niger</i> .....	92
5 CONCLUSÕES.....	101
6 PERSPECTIVAS.....	103
7 REFERÊNCIAS.....	104

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A pesquisa em catálise é multidisciplinar e envolve diversas áreas, tais como materiais, cinética química, química de sólidos e de superfícies, e a biotecnologia. A sua aplicação na indústria química é bastante diversificada, sendo intensamente utilizada nos setores petroquímicos, de plásticos e no controle ambiental, entre outros. A utilização na síntese orgânica de moléculas complexas tem crescido intensamente e, em consequência, os catalisadores ocupam um lugar de destaque nos setores de química fina e de fármacos. Apesar de ser uma área de pesquisa já consolidada, a importância da catálise se renova constantemente na indústria e academia.<sup>1</sup>

A área de catalise irá, sem dúvida, contribuir para os novos desafios do mundo moderno, tais como a obtenção de combustíveis limpos e de fontes renováveis, síntese de produtos naturais, obtenção de novos fármacos e defensivos agrícolas. A catálise tem contribuído significativamente em processos que cessam o desenvolvimento sustentável e a proteção ambiental, dentro do conceito da Química verde.<sup>1</sup>

Os pesquisadores, e em particular os químicos, tem confrontado diariamente por razões econômicas e ambientais com a obrigação da otimização dos processos sintéticos e analíticos, objetivando sempre a maximização da eficiência de um determinado processo e a consequente diminuição dos custos e poluição.

Portanto, estes são desafios constantes para as mais variadas linhas de pesquisa.<sup>2</sup>

O uso de microrganismos e de enzimas isoladas, como catalisadores, em reações orgânicas vem ao encontro deste desafio. Estes por sua vez, possuem uma grande importância dentro da indústria quimio-farmacêutica, devido aos mais variados tipos de reações que catalisam com uma eficiência extraordinária em comparação com os catalisadores convencionais.<sup>3</sup>

A versatilidade do uso destes biocatalisadores tem sido recentemente explorada em síntese orgânica, e, portanto neste trabalho foi explorado o uso e aplicações de lipases em reação de epoxidação quimio-enzimática de sistemas insaturados. Foram utilizados derivados de monoterpênos tais como os  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno, citronelal, 3-careno e eugenol.

## 1.2 ENZIMAS

A catálise biológica foi inicialmente reconhecida e descrita no final de 1700, em estudos sobre a digestão da carne por secreções do estômago. Em 1800 as pesquisas continuaram com o estudo da conversão do amido em açúcares simples pela saliva e por vários extratos vegetais. Em 1850, Louis Pasteur concluiu que a fermentação do açúcar em álcool pela levedura é catalisada por “fermentos”. Ele postulou que esses fermentos eram inseparáveis da estrutura das células vivas da levedura, uma hipótese chamada de vitalismo, que prevaleceu por muitos anos. Em 1897, Eduard Buchner

descobriu que os extratos de levedura podiam fermentar o açúcar até álcool, provando que a fermentação era promovida por moléculas que continuavam atuando mesmo quando removidas das células. Frederick W. Kuhne denominou tais moléculas de enzimas. À medida que as noções do vitalismo da vida foram refutadas, o isolamento de novas enzimas e a investigação das suas propriedades propiciou o progresso da ciência da bioquímica.<sup>4</sup>

O isolamento e a cristalização da urease, em 1926, por James Summer, propiciou um avanço significativo nos estudos iniciais com relação às enzimas. Summer demonstrou que os cristais da urease consistiam inteiramente de proteína e postulou que todas as enzimas são proteínas. Devido à falta de outros exemplos, essa premissa permaneceu controversa por algum tempo. Somente em 1930, após John Northrop e Moses Kunitz terem cristalizado a pepsina, tripsina e outras enzimas digestivas e concluído que elas também eram proteínas, é que a teoria de Summer foi completamente aceita.<sup>4</sup>

A maioria das reações de interesse biológico deveria ser muito lenta ou nem ocorrer devido a sua complexidade. Entretanto, essas reações são muito rápidas, o que leva à conclusão que existem moléculas que aumentam muito as velocidades das reações nas quais participam. Esses catalisadores naturais são chamados de enzimas.<sup>5</sup>

Sem a catálise, as reações necessárias para digerir os alimentos, enviar sinais através dos nervos ou contrair um músculo simplesmente não ocorreriam com uma velocidade adequada. As

enzimas contornam esses problemas fornecendo um ambiente específico onde uma determinada reação é energeticamente mais favorável. A característica que distingue uma reação catalisada por enzima é que ela ocorre em uma cavidade chamada de sítio ativo, como representado na **Figura 1**.<sup>4</sup>



Figura 1-Ligação de uma molécula de substrato no sítio ativo de uma enzima.<sup>4</sup>

As enzimas representam as substâncias encarregadas de aumentar a velocidade de determinadas reações no interior das células. Como nas diversas células ocorrem muitas reações, deduz-se que também exista um número grande de enzimas.<sup>6</sup>

Os aumentos da velocidade provocados pelas enzimas variam entre 5 e 17 ordens de magnitude, como pode ser observado na **Tabela 1**.

Tabela 1- Valores do aumento da velocidade catalisada por enzimas. <sup>4</sup>

Ciclofilina	$10^5$
Anidrase carbônica	$10^7$
Triose fosfato isomerase	$10^9$
Carboxipeptidase A	$10^{11}$
Fosfoglicomutase	$10^{12}$
Succinil-CoA transferase	$10^{13}$
Urease	$10^{14}$
Orotidina monofosfato descarboxilase	$10^{17}$

As enzimas são biocatalisadores versáteis, que atuam em condições suaves de temperatura, pH e pressão, atingindo velocidades de reação bastante superiores as obtidas na presença de catalisadores químicos convencionais.<sup>6</sup> Estes biocatalisadores são bastante úteis para a realização de reações químicas importantes na indústria devido ao fato de não serem tóxicas, e apresentarem alta seletividade (químio-, régio- e enantiosseletividade).<sup>7</sup>

Como citado, as enzimas realizam várias reações com maior eficiência comparadas aos catalisadores convencionais, e têm sido utilizadas na produção de alimentos, produtos químicos, farmacêuticos e detergentes industriais. Com o desenvolvimento de metodologias mais limpas e de baixo custo, estes catalisadores tornaram-se indispensáveis para a preparação de muitos compostos.

<sup>8,9</sup>

Como citado, as enzimas são proteínas, com exceção de um pequeno grupo de moléculas de ácido ribonucleico (RNA). São



constituídas por uma série de compostos orgânicos simples, os  $\alpha$ -aminoácidos, que se unem por ligações peptídicas. Na **Figura 2**, está representada a formação da ligação peptídica, na qual o grupo amino de um aminoácido se liga ao grupo carboxila do outro aminoácido liberando uma molécula de água. <sup>4-6</sup>

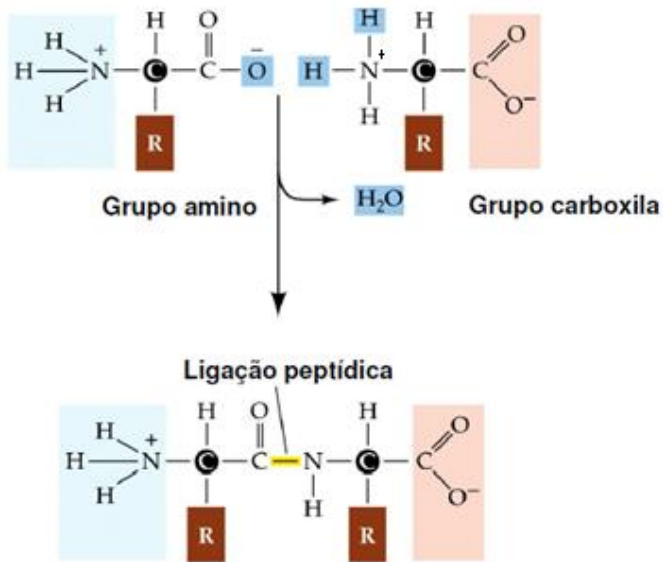


Figura 2-Representação geral da formação da ligação peptídica. <sup>4-6</sup>

A sequência exata de aminoácidos da cadeia proteica é denominada estrutura primária (**Figura 3.1**). O arranjo espacial dessa sequência é chamado de estrutura secundária (**Figura 3.2-3.3**), o tridimensional é conhecido como estrutura terciária (**Figura 3.4**), e as

associações de proteínas para formação de dímeros ou oligômeros formam as estruturas chamadas quaternárias (**Figura 3.5**).<sup>4,5</sup>

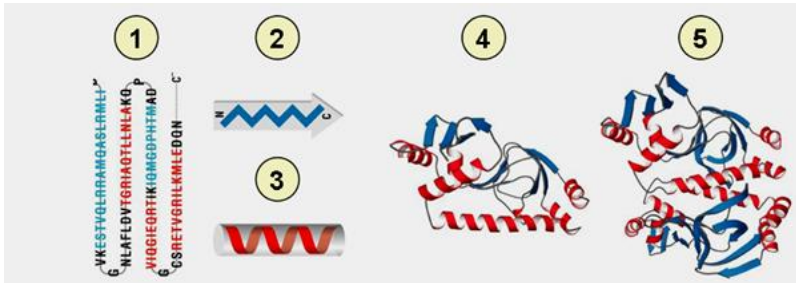


Figura 3-Representação esquemática das estruturas das proteínas.<sup>4</sup>

A primeira proposta do mecanismo geral de ação enzimática foi desenvolvida por E. Fischer em 1894. Ele assumiu que uma enzima e seu substrato interagem mecanicamente como uma chave e fechadura (**Figura 4a**). Embora esta suposição fosse bastante sofisticada, nesse momento, a enzima assume uma estrutura completamente rígida. Além disso, não é possível explicar porque as enzimas atuam em vários substratos e porque podem converter não somente seu substrato natural, mas também compostos não naturais que possuem características estruturais diferentes.<sup>10</sup>

Em 1960, Koshland Jr. assumiu que ao aproximar do substrato durante a formação do "complexo enzima-substrato", a enzima pode alterar a sua conformação sob a influência da estrutura

do substrato, de modo a enrolar-se em torno dele. **(Figura 4b)** A indução mais típica por ajuste são realizadas pelas lipases.<sup>4,10</sup>

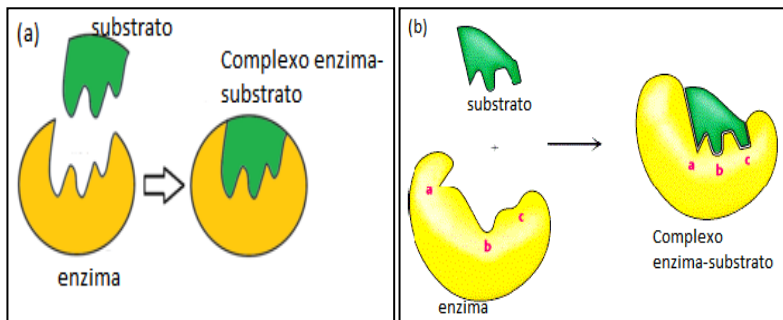


Figura 4- (a) – Representação da formação do complexo enzima-substrato pelo modelo “chave-fechadura”; (b) representação da ligação enzima-substrato por encaixe induzido.<sup>4</sup>

Para a sua identificação, cada enzima tem um número de 4 dígitos CE A.B.C.D. onde CE significa comissão de enzima com as seguintes propriedades codificada:

- A - Denota o principal tipo de reação;
- B - Significa o subtipo, indicando o tipo do substrato ou tipo da molécula transferida;
- C - indica a natureza do co-substrato;
- D - é o número individual da enzima.<sup>10</sup>

O sistema de unidades padrão é a Unidade Internacional (1I.U. = 1umol de substrato transformado por minuto), mas outras unidades, tais como nmols / min ou nmol / hora são também usados .

Outros sistemas de unidades estão baseados em katal =1MO/s de substrato transformado, mas ainda não são amplamente aceitos.<sup>10</sup>

Devido a especificidade, a maioria delas é nomeada pelo seu substrato ou pela reação que catalisa seguido da palavra “ase”. Segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM), as enzimas são classificadas em seis grandes grupos, de acordo com o tipo de reação envolvida, sendo as oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. Nestes grupos, estão incluídas as subclasses de acordo com o tipo de reação catalisada. <sup>4</sup> A **Tabela 2** descreve o tipo de reação catalisada por cada classe de enzimas.

Tabela 2– Classificação internacional das enzimas segundo a UIBBM.<sup>4</sup>

Classe	Tipo de reação catalisada
Oxidoredutases	Transferência de elétrons (oxidação de ligações C-H, C-C, C=C).
Transferases	Reações de transferência de grupos, aldeído, cetonas, acilas.
Hidrolases	Reações de hidrólise (ésteres, amida, epóxidos).
Liasas	Adição e eliminação de pequenas moléculas em ligações C=C, C=O, C=N.
Isomerases	Transferências de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros (racemização e epimerização).
Ligases	Formação de ligação do tipo C-C, C-S, C-O e C-N através de reações de condensação acopladas á quebra de ATP.

As enzimas hidrolíticas são os biocatalisadores mais comumente usados em síntese orgânica. Nesta classe, estão incluídas as amidases, proteases, nitrilases, fosfatases e epoxidases.

Como pode ser observado na **Figura 5**, há uma maior utilização das lipases, sendo elas de grande interesse neste trabalho.<sup>6,10</sup>

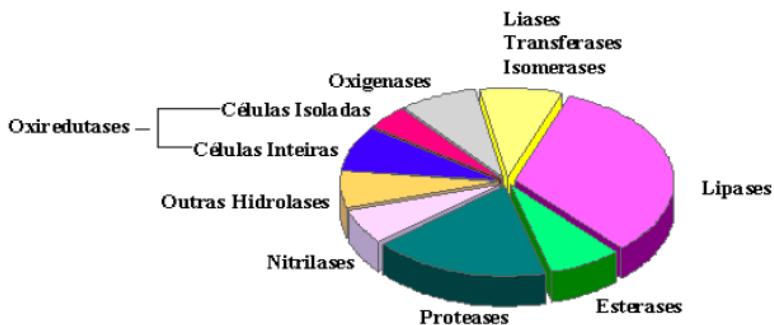


Figura 5– Utilização relativa das enzimas em biotransformação e/ou biocatálise.<sup>6,10</sup>

### 1.3 LIPASES

Como as enzimas são nomeadas pelas reações que catalisam, as lipases (E.C.3.1.1.3) nos organismos vivos são responsáveis pela hidrólise de ésteres, principalmente os triacilgliceróis em ácidos graxos livres, di e monoacilglicerol e glicerol.<sup>11,12</sup>

As lipases são enzimas da família das hidrolases presentes em diversos organismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias.<sup>10,12</sup>

Todos os membros da família de estruturas  $\alpha/\beta$ -hidrolases possuem um mecanismo comum de hidrólise de ésteres, como exemplificado na **Figura 6**. Este consiste em cinco etapas, ligação ao

substrato éster (a); formação do primeiro intermediário tetraédrico por ataque nucleofílico da serina catalítica com o oxianion estabilizado por duas ou três ligações de hidrogênio (b); quebra da ligação éster e saída da porção alcoólica (c); hidrólise (d,e), regeneração do catalisador e formação do produto (f).<sup>5,10</sup>

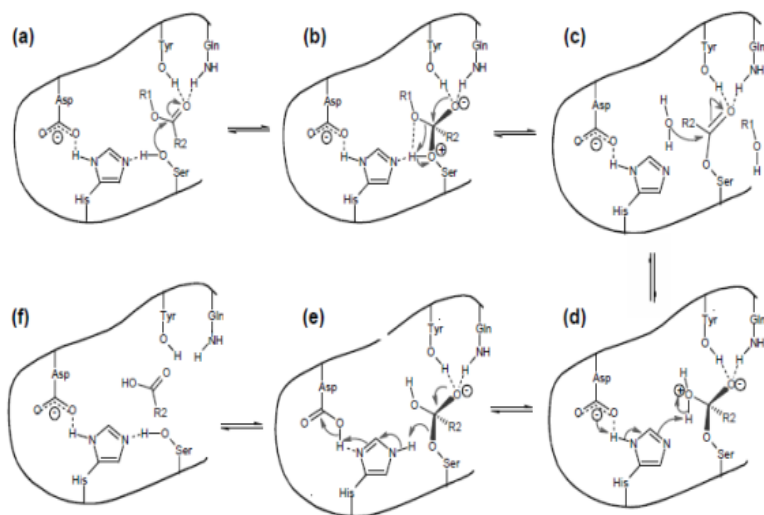


Figura 6– Mecanismo proposto para hidrólise enzimática de um éster. 5,10

As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica devido a sua grande disponibilidade, baixo custo, não requerem cofatores, atuam em uma faixa de pH relativamente grande e são muito estáveis.<sup>6,7</sup>

Além de sua importância biológica, elas desempenham uma função importante na biotecnologia, não somente para alimentos e

processamentos de óleos, mas também para a preparação de intermediários quirais. De fato, cerca de 30% de toda biotransformação relatada até hoje tem sido realizada com lipases.<sup>7,10</sup>

Além da indústria de processamento de couro, indústrias de papel e celulose, indústria de detergentes e indústria de alimentos, as lipases são excelentes catalisadores para as indústrias farmacêuticas onde suas propriedades enantiosseletivas foram usadas para a preparação de ingredientes farmacêuticos ativos (API). Estas aplicações incluem a resolução clínica de alcoóis racêmicos, ácidos, ésteres e aminas, ou a dessimetriação de compostos proquirais.<sup>13</sup>

As lipases (E.C. 3.1.1.3) também são utilizadas em vários setores industriais. Não é de surpreender, portanto, que uma variedade de lipases foram isoladas e utilizadas como catalisadores robustos e recicláveis em síntese orgânica.<sup>7,14</sup> Por exemplo, a lipase de *Candida antarctica B* (CALB, Novozyme 435) vem sendo amplamente utilizada em sínteses, e tem-se demonstrado bastante estável em relação à lixiviação em meio aquoso. Além disso, a CALB apresentou boa atividade em solventes orgânicos e em dióxido de carbono supercrítico na resolução do (*R,S*)-1-feniletanol (**1**) com acetato de vinila (**2**). A CALB catalisou seletivamente a acetilação do *S*-1, obtendo conversão de 50% ao usar hexano, e 17% em dióxido de carbono (**Figura 7**).<sup>15</sup>



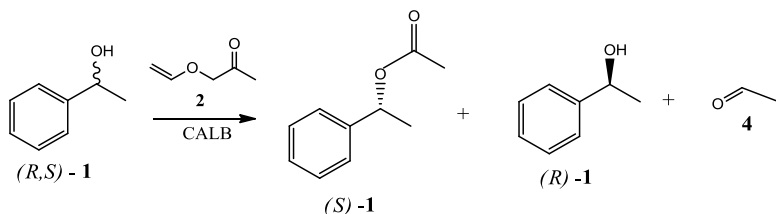


Figura 7– Resolução do (R,S)-1-feniletanol (1) com acetato de vinila (2) catalisada pela CALB. <sup>15</sup>

Além da alta seletividade, a CALB foi utilizada com sucesso em diversas aplicações que incluem processamento de gorduras e óleos para reações de polimerização e de esterificação ou transesterificação. <sup>7,16</sup>

A grande versatilidade da CALB decorre da sua estrutura tridimensional que foi primeiramente elucidada por Uppenberg e colaboradores usando estudos de cristalografia de raios-X ( **Figura 8**). <sup>17</sup>

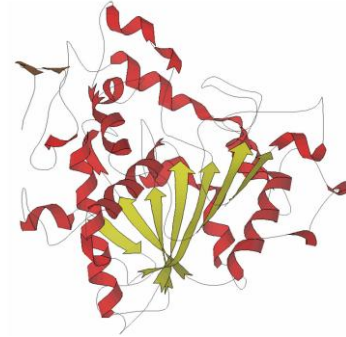


Figura 8– Modelo tridimensional da estrutura da lipase de *Candida antarctica B.*<sup>17</sup>

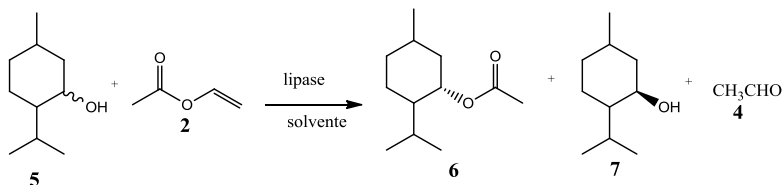
O sítio ativo na CALB situa-se a uma profundidade de aproximadamente 12 Å da superfície da enzima, relativamente profunda quando comparada com outras lipases. O sítio ativo em si tem dois canais; um para a porção acila e o outro para o nucleófilo. A profundidade e a largura destes canais contribuem para a seletividade e especificidade de CALB.<sup>17,18</sup>

Especialmente para nucleófilos, a CALB aceita apenas moléculas de tamanho pequeno. Exemplos destes incluem álcoois (para síntese de ésteres), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (para síntese de peroxiácidos) e aminas (para síntese de amidas). O canal da cadeia acila reconhece além de substratos naturais tais como ácidos graxos, água e glicerol, álcoois primários (cadeia linear) e alguns secundários. Álcoois terciários não são reconhecidos pela CALB.<sup>19</sup>

Como mencionado anteriormente as lipases estão entre os biocatalisadores mais utilizados na resolução enzimática. A CALB e outras lipases foram usadas não imobilizadas na resolução

enantiosseletiva do (*R,S*)-mentol (**5**) com acetato de vinila (**2**) como doador acila. Usando as lipases não comerciais de *Rhizopus oligosporus* (LRO), *Aspergillus niger* (LAN) e a de *Burkholderia cepacia* PS-SD (LSD) comercial, o produto não foi detectado até 168 h de reação. Usando CALB e a lipase de *Mucor javanicus* (LMJ), o éster **6**, foi detectado somente após 96 h de reação, com graus de conversão de 19,8 e 19,6% e valores de  $ee_s$  de 24,7 e 24,4%, respectivamente. Usando as lipases de *Candida rugosa* (LAY), de *Pseudomonas fluorescens* (LAK) e a de *Candida rugosa* (LCR), observou-se a formação do (*R*)-éster (**6**) após 24h de reação (resultados não apresentados na **Tabela 3**). Em todas as reações, e independentemente da lipase e do tempo de reação, o (*R*)-éster (**6**) foi obtido com valores de  $ee_p$  e  $E$  de > 99% e > 200, respectivamente, o que é considerado ideal para resolução enzimática (**Tabela 3**).<sup>20</sup>

Tabela 3– Resolução do (R,S)-mentol (5) com acetato de vinila (2) catalisada por diferentes lipases.<sup>20</sup>



Lipase	48h			96h			168h		
	c(%)	ee <sub>s</sub> (%)	E	c(%)	ee <sub>s</sub> (%)	E	c(%)	ee <sub>s</sub> (%)	E
LAY	18,9	20,5	>2	19,1	23,6	>200	22,3	28,6	>200
LAK	16,3	19,2	>200	19,7	21,7	>200	18,9	23,2	>200
LMJ	-	20,6	-	19,6	24,4	>200	22,4	28,8	>200
LCR	14,2	16,4	>200	19,3	23,7	>200	18,8	23	>200
CALB	-	15	-	19,8	24,7	>200	21,7	27,6	>200

Condições de reação: (R,S)-mentol (3mmol), acetato de vinila (6mmol), 40mg lipase, 20mL de tolueno, 30°C. Determinado por CG-quiral. LMJ=lipase de *Mucor javanicus*; LAY= lipase de *Candida rugosa*; LAK= lipase de *Pseudomonas fluorescens* ; LCR= lipase de *Candida rugosa* e CALB= lipase de *Candida Antarctica B*.

Em outro trabalho, Rocha e col. usaram a lipase de *Candida antarctica B* como biocatalisador na resolução cinética do (R,S)-iodofeniletanóis (8) obtendo excessos enantioméricos elevados (ee>98%) para os (R)-acetatos (10) e (S)-alcoois (9) (Figura 9).<sup>21</sup>

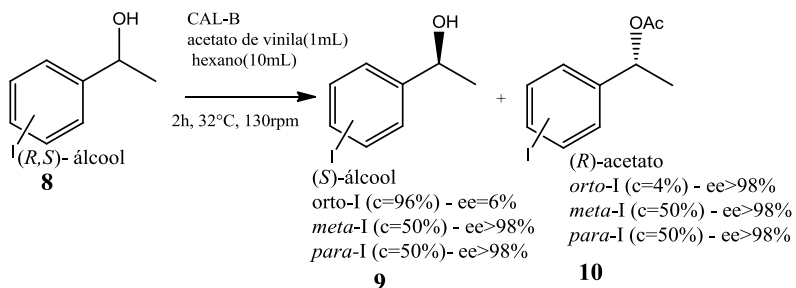


Figura 9 – Resolução cinética do (R,S)-iodofeniletanol (8) catalisada pela CALB. 21

Outro exemplo da aplicação de enzimas em resolução, é o uso da lipase de *Aspergillus niger* AC-54 que foi utilizada na esterificação do (R,S)-ibuprofeno (**11**) com *n*-propanol, sendo que foi obtido preferencialmente o (R)-éster (ee<sub>p</sub>=25% e c=19,8%). Os resultados de enantiosseletividade e termoestabilidade foram melhores em comparação com outras lipases nativas. Por exemplo, ao usar a lipase de *Penicillium solitum*, o éster (**12**) não foi obtido, e ao usar a lipase de *Geotrichum candidum*, a conversão ao R-(**12**) foi de 12% (Figura 10).<sup>22,23</sup>

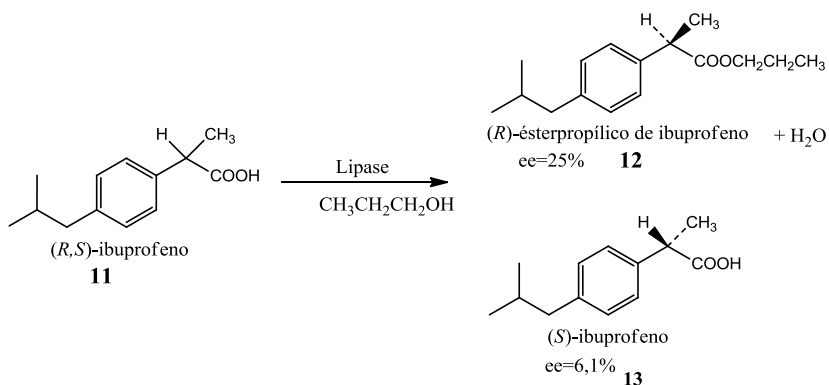


Figura 10– Esterificação enantiosseletiva do (R,S)- ibuprofeno (11) com 1-propanol catalisada pela lipase de *A.niger*.<sup>22,23</sup>

Apesar de todas as vantagens, as enzimas apresentam alguns inconvenientes que têm limitado a sua aplicação generalizada. Como citado, são moléculas complexas, altamente sensíveis com estruturas tridimensionais únicas que são essenciais para suas atividades. A exposição a certas condições, temperaturas elevadas ou solventes orgânicos, pode levar a desnaturação (desdobramento) e perda da atividade.<sup>24</sup>

Sabe-se, por exemplo que a Novozyme 435 é estável até 130 °C, mas o fornecedor recomenda o uso entre 40-60° C para obter um desempenho ótimo. A temperatura deve ser alta o suficiente para que a reação ocorra e evite a decomposição do substrato, mas não deve comprometer a estabilidade da enzima e levar a custos altos de energia.<sup>25</sup>

Além disso, as enzimas são geralmente utilizadas em soluções aquosas, e neste meio a recuperação e reutilização tornam-

se problemáticos, e também pode resultar em contaminação do produto.<sup>24</sup>

Por exemplo, a lipase de *Rizomucor miehei* (LRM), não imobilizada, foi usada na oxidação quimio-enzimática do 1,4-dihidronaftaleno (**14**) com ureia peróxido de hidrogênio (UPH) em 3 ciclos consecutivos. (**Figura 11**).<sup>26</sup>

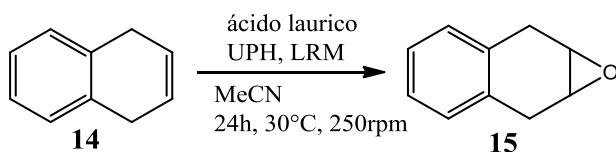


Figura 11 – Oxidação do 1,4-dihidronaftaleno (**14**) catalisada por LRM.<sup>26</sup>

O epóxido (**15**) foi obtido inicialmente com conversão de 82%, e 68% após o 1ºreuso. Porém, observou-se uma grande diminuição na atividade após o 2ºciclo (conversão de 18%), e no 3º reuso não foi observada a formação do produto (**Figura 12**).<sup>26</sup>

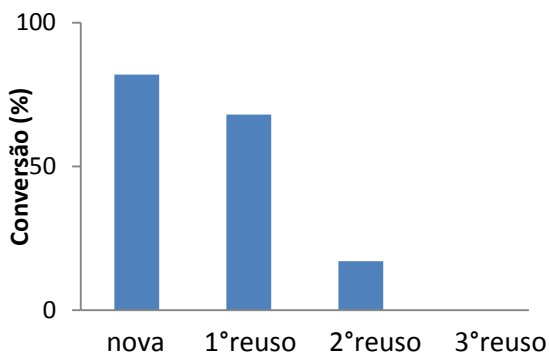


Figura 12– Reuso da LRM na oxidação quimio-enzimática do 1,4-di-hidronafaleno <sup>(14)</sup>. Condições de reação: 1,4-di-hidronafaleno (10mmol), ácido láurico (2equiv.), UPH (1,1 equiv.), 30°C, 24h, 250rpm. <sup>26</sup>

Estes obstáculos podem geralmente ser superados pela imobilização da enzima, proporcionando melhor armazenamento, estabilidade e além da fácil separação e reutilização. <sup>24,27</sup>

## 1.4 IMOBILIZAÇÕES DE ENZIMAS

A engenharia enzimática surgiu como uma área de investigação e de aplicação da biocatálise em larga escala e para fins analíticos durante a década de 60 do século XX, com a imobilização de enzimas. <sup>6</sup>



Existem muitas técnicas disponíveis que permitem melhorar as características das enzimas, envolvendo muitas áreas da ciência que se desenvolveram nos últimos anos tais como a microbiologia, engenharia protéica e química das proteínas. No entanto, a imobilização, têm sido revelada nos últimos tempos como uma ferramenta muito útil para melhorar quase todas as enzimas, no que se refere a estabilidade, atividade, especificidade seletividade e redução da inibição. <sup>27-29</sup>

A imobilização de biocatalisadores consiste na sua confinamento em uma região restrita, garantindo a retenção da atividade catalítica, e assegurando a possibilidade da sua utilização de forma repetida ou contínua. A **Figura 13** mostra a classificação de métodos de imobilização de biocatalisadores. <sup>6</sup>

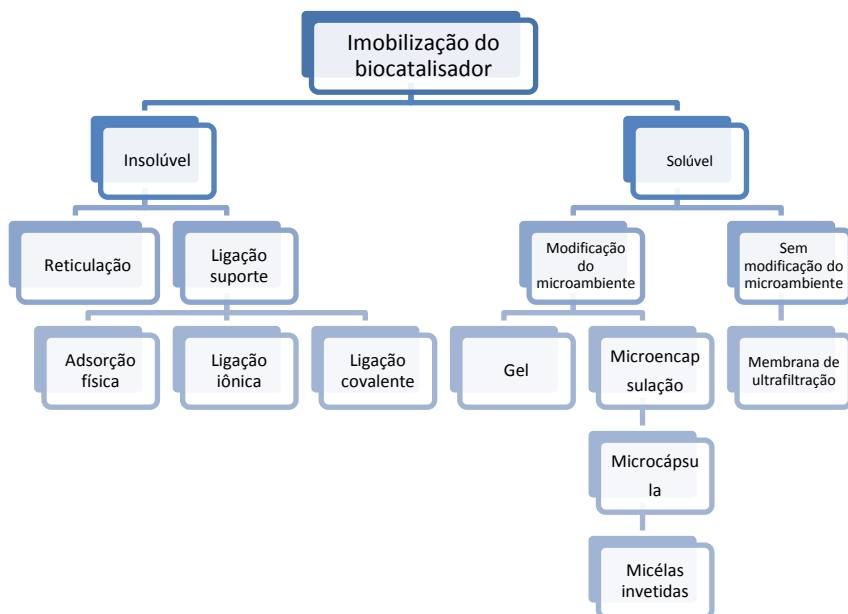


Figura 13– Classificação dos métodos de imobilização. <sup>6</sup>

Basicamente, podem ser distinguidos três métodos tradicionais de imobilização, tais como ligação em um suporte (transportador), aprisionamento (encapsulamento) e reticulação. <sup>29</sup>

A ligação ao suporte pode ser física (tal como interações hidrofóbicas de van der Waals), iônica ou de natureza covalente. Contudo, a ligação física é geralmente fraca para manter a enzima fixa ao suporte. A ligação iônica é geralmente mais forte e a ligação covalente da enzima no suporte, é ainda mais, o que tem a vantagem de que a enzima não pode ser lixiviada na superfície. No entanto, esse método tem uma desvantagem, se a enzima for

irreversivelmente desativada tanto o biocatalisador bem como o suporte (muitas vezes caro), podem ser inutilizados. O suporte pode ser uma resina sintética (Epergite® C – copolímero de metacrilamida), biopolímero (celulose, agarose e quitosana) ou polímero inorgânico (silica, alumina).<sup>29</sup>

O aprisionamento pode ser por inclusão da enzima em um polímero (rede de gel) tal como um polímero orgânico, em sol-gel de sílica, ou em dispositivo de membrana tal como uma fibra oca ou microcápsula.<sup>29</sup>

A **Figura 14** representa esquematicamente de que forma a enzima se liga ao suporte usando as diferentes estratégias de imobilização.

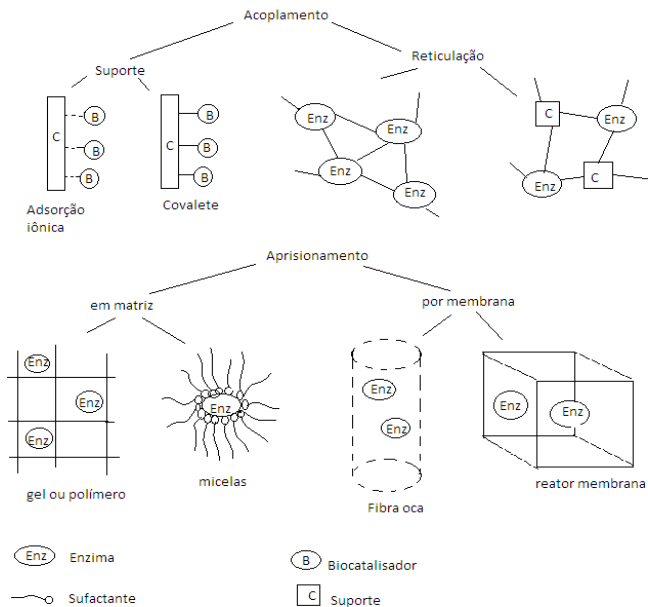


Figura 14– Estratégias mais utilizadas de imobilização (adaptado da ref.10).

Existem várias razões para usar uma enzima na forma imobilizada. Além do manuseio ser mais conveniente, a separação do produto é facilitada, minimizando ou eliminando a contaminação.<sup>10,30</sup>

A principal razão para imobilizar uma enzima é o aumento significativo da estabilidade operacional para o uso em altas temperaturas e em solventes orgânicos. A diminuição da atividade em altas temperaturas é devido a maior flexibilidade e alteração da estrutura terciária, que é necessária para a manutenção da atividade.

Como citado, outra razão importante para imobilizar uma enzima é a sua recuperação a partir do meio reacional e reutilização, resultando na simplificação do processo e redução dos custos. Van Langen e col. estudaram o efeito do reuso sobre o desempenho da (*R*)-oxinitrilase-CLEA de *Prunus amygdalus* na hidrocianação de *o*-clorobenzaldeído (**16**) (**Figura 15**). A enzima foi reutilizada dez vezes sem perda da atividade (conversão >99% em todos os reusos).<sup>32</sup>

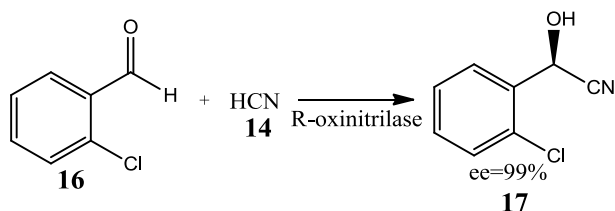


Figura 15– Hidrocianação do *o*-clorobenzaldeído (**16**) catalisada pela R-oxinitrilase de *P. amygdalus*.<sup>32</sup>

Na epoxidação quimio-enzimática do ácido linoleico (**18**) catalisada pela CALB imobilizada em organogel na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o biocatalisador foi reutilizado por 7 vezes formando o produto com excelentes conversões durante as primeiras 4 reutilizações (**56-53%**). Após o 5° e 6° reuso a conversão diminuiu para ~**33%** e no último reuso foi de 14%.<sup>33</sup> (**Figura 16**). E o diepóxido foi obtido com 28% de conversão.

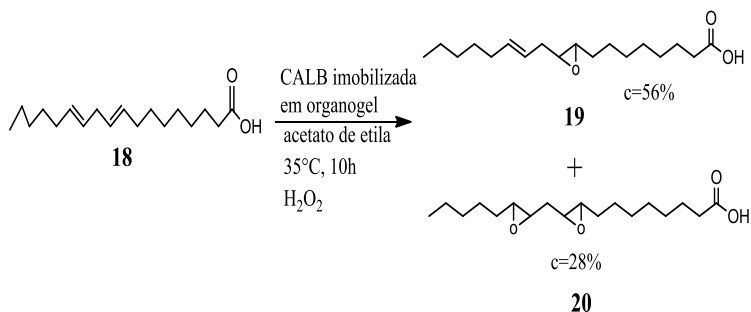


Figura 16– Epoxidação quimio-enzimática do ácido linoleico (18) catalisada pela CALB.

33

Vários biopolímeros, principalmente os polissacárideos (celulose, amido, agarose, quitina, quitosana) e proteínas (gelatina e albumina) têm sido amplamente utilizados como suportes para enzimas.<sup>34-36</sup>

Neste trabalho foram usados como suportes a bucha vegetal e o ágar na forma de gel. No gel de ágar o biocatalisador é imobilizado por aprisionamento, e na esponja ou bucha vegetal por adsorção.<sup>37</sup>

## 1.5 SUPORTES

O método de imobilização por adsorção na superfície é simples e tem grande potencial para aplicação. Além disso, os custos para utilização desses suportes são baixos. Cita-se por exemplo o uso da esponja vegetal (*Luffa cylindrica*).<sup>38</sup>

A bucha vegetal é um material obtido da fruta madura e seca da *L. cylindrica*. É comumente chamada de esponja vegetal ou esponja de banho, e é membro da família *Cucurbitaceae*. É usada para a higiene pessoal e limpeza doméstica, sendo comum em muitos países. O uso mundial da bucha vegetal na agricultura, medicina e engenharia é devido ao alto grau de porosidade, não toxicidade, apresenta propriedades físicas estáveis e consiste em uma rede de fibras biodegradáveis (**Figura 17**).<sup>39,40</sup>



Figura 17– Bucha vegetal.<sup>41</sup>

As fibras de *L. cylindrica* podem apresentar composição química variada, tais como, celulose em uma quantidade entre 55 e 90%, lignina entre 10 e 23%, hemicelulose entre 8 e 22%.<sup>42</sup> As fibras lignocelulósicas são hidrofílicas e suas características polares são devidas a grupos hidroxilas da celulose, hemicelulose e lignina. A diferença na composição química das fibras de *L. cylindrica* está

relacionada com a natureza do solo, origem vegetal e condições atmosféricas.<sup>42, 43</sup>

A elucidação da estrutura polimérica da celulose (**21**) foi descoberta em 1920 com o trabalho pioneiro de Hermann Staudinger (**Figura 18**).<sup>44</sup>

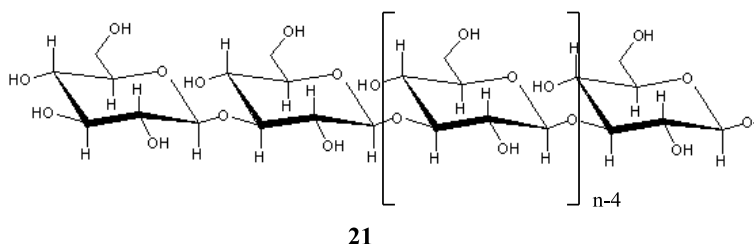


Figura 18– Estrutura do polímero de celulose (21).<sup>44</sup>

A estrutura molecular confere a celulose propriedades tais como hidrofiliçidade, quiralidade, degradabilidade e ampla variabilidade química devido à alta reatividade dos grupos OH. É também a base para redes de ligações de hidrogênio extensas.<sup>45</sup>

Como matéria-prima química, a celulose tem sido utilizada por 150 anos. A formação de nitrato de celulose por reação com ácido nítrico<sup>46</sup> e a correspondente síntese do primeiro material polimérico termoplástico chamado celuloide (cânfora usada como plastificante) pela Empresa Hyatt Manufacturing em 1870, demonstraram que novos materiais podem ser obtidos em escala industrial pela modificação química da celulose.<sup>46,47</sup>



Outras aplicações da celulose, por exemplo, usam de sua biocompatibilidade para a imobilização de proteínas.<sup>48,49</sup>

Recentemente, diversas lipases foram imobilizadas em bucha vegetal (BV) e estes sistemas usados como biocatalisador na preparação do octanoato de *n*-pentila (**24**) (Figura 19).<sup>36</sup>

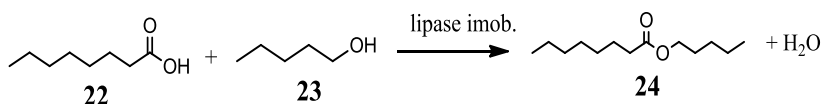


Figura 19– Preparação do octanoato de *n*-pentila (**24**) catalisada por lipases.

Condições de reação: *n*-pentanol (10mmol), ácido octanóico (10mmol), 20mg lipase, *n*-hexano (25mL), 25°C, 24h.<sup>36</sup>

Observou-se que ao utilizar as lipases de *Candida rugosa* (AYS), de *Mucor javanicus* (M10), de *A.niger* (A12) e de *Candida rugosa* (AY30) imobilizada em BV como catalisadores, a conversão ao éster (**24**) foi inferior ou igual a 10%. Ao utilizar a lipase de *Burkholderia cepacia* (PS-SD), o éster (**24**) foi obtido com 52% de conversão, e com a lipase de *Pseudomonas fluorescens* (AK 20) a conversão foi de 65%. Ao usar as lipases de *Burkholderia cepacia* (PS-IM e PS-SD), as conversões ao produto **24** foram de 82 e 94%%, respectivamente. Bons resultados também foram obtidos ao usar a lipase de *Rhizopus oryzae* (F-AP15), sendo de 94%. Portanto, pode-se observar que as lipases mais eficientes foram as PS-SD e F-AP15.<sup>36</sup>

Outro suporte que foi utilizado neste trabalho, foi o ágar e este também possui várias hidroxilas em sua estrutura.

O ágar (mais corretamente nomeado de ágar-ágar) é um colóide hidrófilo extraído a partir da parede celular de certas algas da classe das *Rhodophyceae*. O seu esqueleto é formado por unidades de  $\beta$ -1,3 D-galactose,  $\alpha$ -1,4 3,6-anidro-L-galactose e a agarpectina, que é a forma 3,6-anidro neutro (fração de agarose) e que confere ao ágar o poder de gelificação elevado.<sup>50</sup> A estrutura dos monômeros do ágar (25) e dos usos do ágar a partir de uma alga estão representados na **Figura 20**.

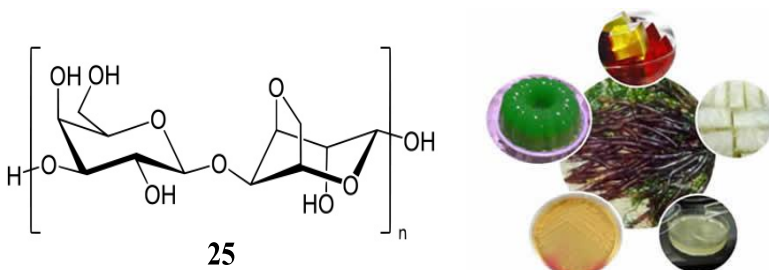


Figura 20- Estrutura dos monômeros do ágar e usos do ágar a partir da alga marinha.<sup>50</sup>

As algas pertencentes ao género *Gracilaria* são cada vez mais empregados na produção de ágar. A disponibilidade desta matéria-prima importante aumentou muito, principalmente através do desenvolvimento das técnicas de cultivo.<sup>50</sup>

Com o objetivo de esclarecer quais tipos de ágar estão disponíveis em diferentes mercados mundiais, a **Tabela 4** apresenta as classes e suas origens, em dois grupos.<sup>50</sup>

Tabela 4– Tipos de ágar disponíveis para uso comercial.<sup>50</sup>

	Tipo de Agar	Fonte
Ágar natural	Faixa/Tira	Somente <i>Gelidium</i>
	Quadrado	
Ágar industrial	Alimentar	<i>Gelidium</i> , <i>Gracilaria</i> , <i>Pterocladia</i> , <i>Gelidiela</i> e <i>Anfelia</i>
	Farmacológica	Somente <i>gelidium</i>
	Produção de clones de plantas	<i>Gelidium</i> e <i>Pterocladia</i>
	Ágar bacterológico	Somente <i>Gelidium</i>
	Ágar purificado	<i>Gelidium</i>

O ágar natural é consumido principalmente na Ásia em culinária tradicional e é comercializado em formas convencionais de tiras e quadrados obtidos apenas de *Gelidium* (a melhor qualidade) ou a partir de misturas onde o *Gelidium* predomina.<sup>50</sup>

O ágar industrial é produzido em instalações industriais de diferentes tamanhos. Os grãos industriais são comercializados em flocos, e principalmente em forma de pó quando são triturados, que é o mais comumente usado. O ágar possui aplicação como agente de

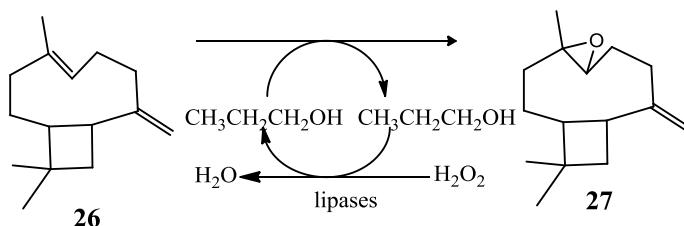
gelificação em alimentos e na indústria farmacêutica. É razoavelmente estável a ácidos, comparado com outros polissacarídeos e não apresenta qualquer reatividade com proteínas.

50

O custo deste material, em comparação com os outros usados para a imobilização de enzimas, também é baixo.<sup>51</sup>

A epoxidação quimio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno, foi estudada usando diversas lipases livres e imobilizadas em gel de ágar (**Tabela 5**).<sup>35</sup>

Tabela 5– Epoxidação quimio-enzimática do β-cariofileno utilizando diferentes lipases.  
35



Lipases	Atividade	Conversão(%) <sup>a</sup>	
		Livre	Imobilizada
F-AP15	150u/mg	16	15
PS Amano	30.000U/g	16	8
AK Amano 20	25.000U/g	25	6
M Amano 10	10.000u/g	23	6
AY Amano 30	30.000u/g	23	2
AS Amano	15.000u/g	3	3
AYS Amano	30.000u/g	3	2

Condições de reação: β-cariofileno(2,5mmol), ácido octanóico (1mmol) UPH (5mmol), lipase (50mg) imobilizada em gel de ágar (0,4g de ágar/ 10mL de água), diclorometano (10mL), temperatura ambiente, 24h, 150rpm. (a) Determinado por CG.

Em geral, as conversões ao epóxido (**27**) foram menores ao usar as lipases imobilizadas (2-15%) em comparação com a forma

livre (3-25%). Isso se deve, provavelmente, ao fato que após imobilização o catalisador pode não assumir as modificações estruturais adequadas e necessárias, que favoreçam o encaixe adequado do substrato no sítio ativo, bem como a limitações na difusão do substrato ao sítio ativo. Não existem regras específicas para prever a atividade e estabilidade de uma enzima mediante à imobilização, podendo este processo inibir ou ativar a atividade. O que se pode afirmar é que a maioria das lipases imobilizadas apresenta maior resistência à temperatura e a diferentes solventes que as livres, além de permitir a reutilização. Esta observação é atribuída ao fato de que as enzimas imobilizadas são menos sensíveis à desativação, pois a estrutura se torna mais rígida.<sup>10,35</sup>

Devido ao seu baixo custo, ambos o ágar e a bucha vegetal foram escolhidos como suportes na imobilização da lipase de *A. niger* para ser usada como biocatalisador na reação de epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ - pineno. Salienta-se que estes suportes são resistentes ao agente oxidante, e foi usado com sucesso em outras reações.<sup>35,36</sup>

## 1.6 EPÓXIDOS

Os epóxidos são uma subclasse de éteres, pois possui a unidade C-O-C. Contudo, o termo epóxido ou oxirano, é usado para descrever o sistema heterocíclico de três membros, contendo dois

carbonos e um oxigênio. Estes átomos estão ligados através de ligações  $\sigma$ . As ligações C-O são polares devido à alta eletronegatividade do átomo de oxigênio.<sup>52,53</sup>

Devido à polaridade e a tensão do anel de três membros, os epóxidos são suscetíveis a reações com um grande número de nucleófilos, eletrófilos, ácidos, bases, com agentes redutores e alguns agentes oxidantes.<sup>52,53</sup>

Estes representam uma classe importante de heterociclos oxigenados com múltiplas aplicações na indústria química fina para a preparação de adesivos, revestimento, tintas e polímeros. Além disso, eles são considerados como intermediários sintéticos versáteis de álcoois, dióis e outras famílias de compostos orgânicos. Tradicionalmente, os epóxidos tem sido preparados em condições suaves, através de alcenos, utilizando catalisadores metálicos, peróxidos orgânicos ou perácidos para transformações não enzimáticas.<sup>54,55</sup>

Os reagentes usados para epoxidação são as substâncias químicas responsáveis pela inserção do oxigênio em uma ligação dupla carbono-carbono formando o epóxido. Desde o início dos anos 1990, estes compostos também têm sido obtidos pela ação de sistemas enzimáticos, os quais são capazes de epoxidar enantiosseletivamente olefinas não funcionalizadas.<sup>56</sup>

Uma das estratégias mais comuns para a síntese de epóxidos é baseada na formação de perácidos *in situ* (per-hidrólise), que pode ser obtido pela reação de um ácido ou éster carboxílico com peróxido de hidrogênio ou seus derivados como oxidantes. O

peróxido de hidrogênio é um oxidante preferido, pois a transformação só resulta em água como subproduto. Neste contexto, a epoxidação de alcenos catalisada por enzimas tem sido estudada utilizando hidrolases tais como perhidrolases, lipases, esterases, e aciltransferases.<sup>57,58</sup>

O peróxido de hidrogênio tem sido o reagente mais utilizado. Porém, devido a sua baixa eletrofilicidade, necessita ser ativado para reagir com uma olefina. Contudo, os perácidos orgânicos onde a ativação do peróxido de hidrogênio ocorre pela conjugação com um grupo acila de um ácido carboxílico, ainda são os reagentes clássicos para a epoxidação de olefinas não funcionalizadas.<sup>53</sup>

Os perácidos (**28**) são reagentes orgânicos capazes de transformar olefinas (**29**) em epóxidos (**30**), através da reação descrita na **Figura 21**, conhecida desde 1908 e denominada de "Reação de Prilaschajew".<sup>53</sup>

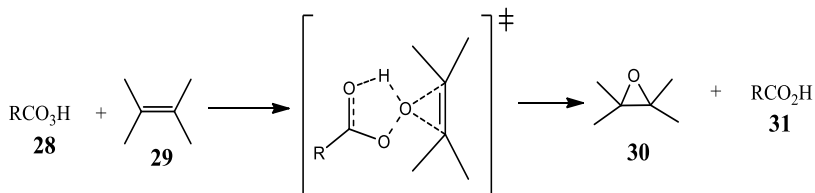


Figura 21– Epoxidação de alceno com perácido.<sup>53</sup>

O perácido mais utilizado e disponível comercialmente é o ácido *m*-cloroperbenzóico (MCPBA), um reagente potencialmente explosivo, o que dificulta o seu transporte e utilização em reações de



larga escala. A epoxidação de olefinas com perácidos é usualmente realizada em solventes apróticos de baixa polaridade, tais como diclorometano, clorofórmio e benzeno.<sup>53</sup>

Devido aos riscos operacionais acima mencionados de utilizar quantidades elevadas desta substância e as subseqüentes etapas de limpeza envolvidas, a preparação quimio-enzimática *in-situ* de perácidos foi desenvolvida por F. Björkling no início da década de 1990 utilizando lipases (EC 3.1.1.3) na epoxidação dos monoterpenos  $\alpha$ -pineno (**32**), 3-careno (**34**) e D-limoneno (**36**). Este processo foi o primeiro relato, e trabalhos subseqüentes foram realizados usando este protocolo (**Figura 22**).<sup>59</sup>

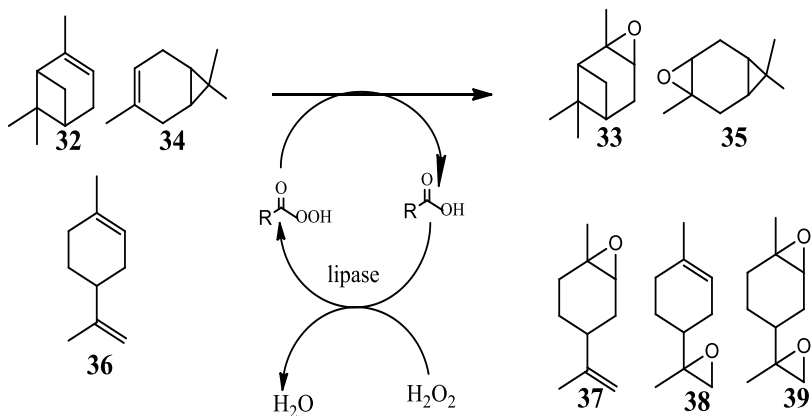


Figura 22– Epoxidação de monoterpenos (32, 34, 36) usando perácidos de acordo com o método de Björkling.<sup>59</sup>

A epoxidação quimio-enzimática é uma metodologia importante nesta área, considerando que a utilização de lipases, como catalisadores nas reações de per-hidrólise pode formar perácidos com diferentes seletividade e capacidade de oxidação.<sup>54, 60,</sup>  
61

A epoxidação quimio-enzimática de vários alcenos com acetato de etila e peróxido de hidrogênio, catalisada pela CALB foi estudada por Klass e col. Os correspondentes epóxidos foram obtidos com conversões de 67-100%, e com seletividade de 98% (nenhum subproduto foi observado em análises por cromatografia gasosa). Os resultados estão apresentados na **Tabela 6**.<sup>62</sup>

Tabela 6– Epoxidação de alcenos catalisada pela CALB usando dimetil carbonato ou acetato de etila.<sup>62</sup>

	Conversão aos epóxidos (%)	
	Dimetil carbonato	Acetato de etila
1-octeno	67	61-81
4-octeno	92	94
1-tetradecano	69	71
7-tetradecano	100	90
Estireno	78	73-92
Norborneno	83	92
α-pineno	85	72
β-pineno	77	3

Condições de reação: 0,1mol alceno; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (60%)=1:5; 5mmol alceno/g Novozyme 435; 16h; 20°C para dupla interna; 40°C para dupla terminal.

Em outro estudo, Silva e col. relataram a regioseletividade na epoxidação do  $\beta$ -cariofileno (**26**) catalisada pela CALB na presença dos agentes oxidantes água oxigenada 30% e ureia-peróxido de hidrogênio (UPH). A reação formou os mono- (**27**) e di-epóxidos (**40**) em conversões elevadas, dependendo das condições experimentais. Quando *n*-hexano foi usado como solvente, o mono-epóxido (**27**) foi obtido com conversão de 99%, em acetato de etila ou em tolueno, o di-epóxido (**40**) foi obtido com conversão de 99% (**Figura 23**).<sup>63</sup>

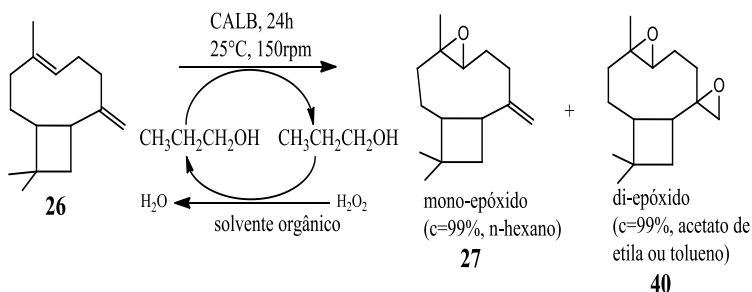


Figura 23– Epoxidação quimio-enzimática do  $\beta$ -cariofileno (**26**) catalisada pela CALB.<sup>63</sup>

Uma das aplicações importantes de óleos vegetais epoxidados e ésteres de ácidos graxos, é como plastificante para

serem usados junto com poli-cloreto de vinila (PVC) ou outros materiais plásticos. Os plastificantes são substâncias que aumentam a flexibilidade dos plásticos, tornando-os assim adequados para diversas aplicações.<sup>64</sup>

O óleo de soja epoxidado (ESBO), é comercialmente o aditivo plástico mais importante e tem um mercado relativamente estável de aproximadamente 100.000 toneladas / ano.<sup>64</sup> Este oferece mais capacidade de alongamento do que à base de petróleo e é também capaz de proporcionar alta estabilidade térmica.<sup>65</sup> O ESBO é um plastificante secundário e não possui compatibilidade para uso em plásticos típicos de PVC. Portanto, é usado principalmente como um estabilizador devido à sua capacidade de eliminar o ácido clorídrico (HCl) durante a decomposição do PVC quando exposto a calor e luz.

<sup>67</sup>

Devido a importância e usos de epóxidos, neste trabalho, serão estudadas as reações de epoxidação dos monoterpenos  $\alpha$ -pineno (**32**), 3-careno (**34**),  $\beta$ -pineno (**41**), citronelal (**42**) e eugenol (**43**). As estruturas de (**41**), (**42**) e (**43**) estão representadas na **Figura 24**.

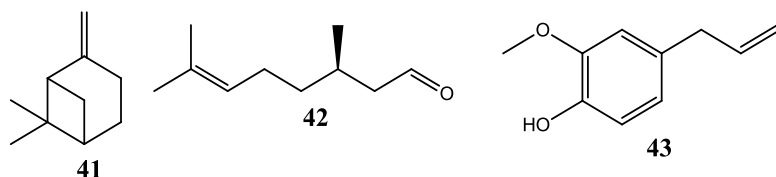


Figura 24– Estruturas dos monoterpenos 41- 43.

## 1.7 TERPENOS

Os terpenóides são definidos como materiais com estruturas moleculares contendo unidades de isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno). O isopreno contém cinco átomos de carbono e, portanto, o número de átomos de carbono em qualquer terpenóide é um múltiplo de cinco. Os produtos de degradação de terpenóides em que os átomos de carbono foram perdidos através de processos químicos ou bioquímicos podem conter números diferentes de átomos de carbono, mas a sua estrutura global indicará a sua origem terpenóide, e eles ainda serão considerados como terpenóides. <sup>68</sup>

O nome genérico “terpeno” foi originalmente aplicado aos hidrocarbonetos encontrados na terebintina, o sufixo eno indica a presença de ligação olefínica. A **Tabela 7** ilustra a classificação dos terpenos. <sup>68</sup>

Tabela 7– Classificação dos terpenóides. <sup>68</sup>

Nome	Nº de unidades de isopreno	Nº de átomos de carbono
Hemiterpenóides	1	5
Monoterpenóides	2	10
Sesquiterpenóides	3	15
Diterpenóides	4	20
Sesterpenóides	5	25
Triterpenóides	6	30
Tetraterpenóides	8	40
Poliisoprenóides	>8	>40
Carotenóides	8	40

Os terpenos pertencem ao grupo maior e mais diversificado de compostos de plantas secundárias. As principais fontes de terpenos são os óleos essenciais de coníferas, frutas cítricas e terebinto. <sup>69,70</sup> Eles são utilizados como aromas, fragrâncias, inseticidas naturais, solventes e compostos farmacêuticos. <sup>69</sup> A **Figura 25**, mostra alguns exemplos de terpenos. <sup>68</sup>

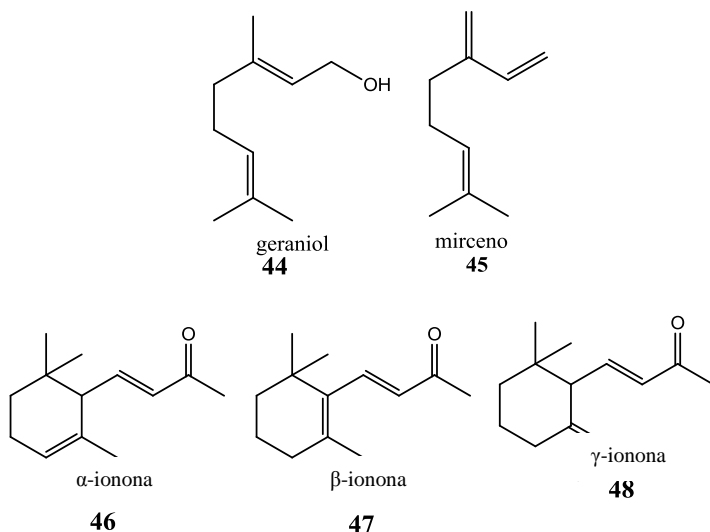


Figura 25– Estrutura de alguns terpenos. <sup>68</sup>

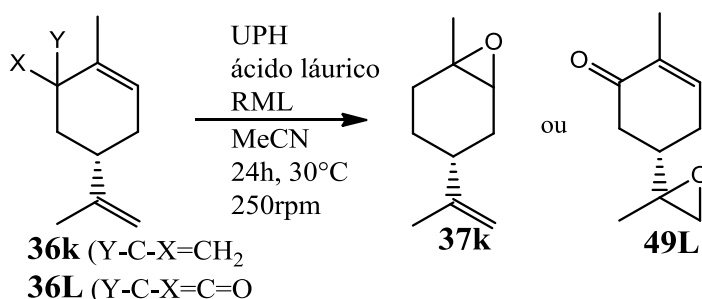
Os terpenos e outros produtos naturais podem ser usados sem modificação ou podem ser quimica e / ou biotecnologicamente convertidos em novas moléculas . Especialmente a oxidação de produtos naturais é uma reação importante que pode ser realizada por catalisadores metálicos ou enzimas. <sup>71-73</sup>

Os epóxidos derivados de monoterpénos e os correspondentes dióis são intermediários sintéticos importantes. <sup>62</sup>

O D-limoneno e a (S)-carvona, por exemplo, foram oxidados utilizando a lipase de *Rhizomucor miehei* (LRM) necessária para a formação de perácidos. Os epóxidos do D-limoneno e da (S)-carvona foram obtidos com conversões de 18% e 78%, respectivamente (Entradas 1 e 2). As reações de epoxidação do D-

limoneno e da (S)-carvona catalisadas pela CALB também foram realizadas para fins comparativos, e os resultados foram semelhantes, formando os epóxidos com conversões de 20 e 80% (Entradas 3 e 4) (**Tabela 8**).<sup>64</sup>

Tabela 8– Epoxidação do D-limoneno e (S)-carvona com a LRM.<sup>64</sup>



Entrada	Substrato	Enzima	c (%) <sup>a</sup>
1	D-Limoneno ( <b>36k</b> )	LRM	18 ( <b>37k</b> )
2	(S)-carvona ( <b>36L</b> )	LRM	78 ( <b>49L</b> )
3	D-Limoneno ( <b>36K</b> )	CALB	20 ( <b>37k</b> )
4	(S)-carvona ( <b>36L</b> )	CALB	80 ( <b>49L</b> )

Condições de reação: Substratos (0,66M); ácido láurico (2equiv); UPH (1,1equiv.), LRM ou CALB (50mg), MeCN, 30°C, 24h, 250rpm. (a)-Conversão determinada por CG.

A epoxidação quimio-enzimática de citronelol seguida da reação de esterificação foi relatado por Silva e col. Dependendo das condições experimentais, foram obtidos rendimentos altos dos



epóxidos e do éster (>99%). A CALB foi o catalisador mais efetivo nesta reação. O epóxido, foi obtido com boas conversões de 80% e 77% a 20° e 25°C, respectivamente, utilizando uréia peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-UPH) como um agente oxidante e ácido octanóico como um dador de acila (**Figura 26**).<sup>74</sup>

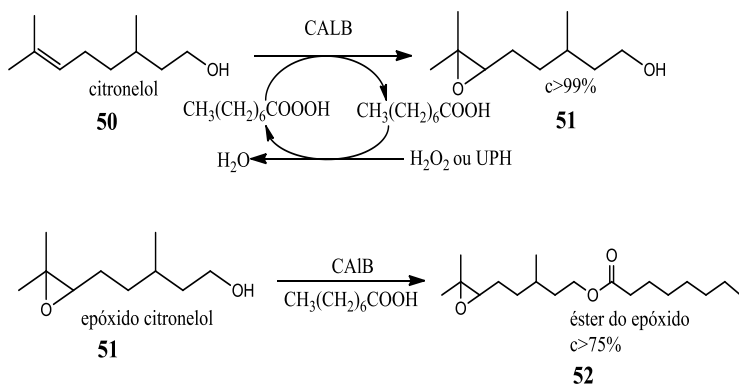


Figura 26– Epoxidação quimio-enzimática do citronelol catalisada pela CALB.<sup>74</sup>

Uma maneira de aumentar a atividade catalítica dos biocatalisadores é através da utilização de aditivos. Estes, incluem os líquidos iônicos (LIs), que foram recentemente descritos como agentes que podem estabilizar a enzima ou causar alterações conformacionais que conduzem a ativação dela.<sup>75</sup>

## 1.8 LÍQUIDO IÔNICO

Os líquidos iônicos (LIs) foram descobertos no início do século XX, mas seu potencial como meios de reação e extração de solventes permaneceram inexplorados por muito tempo.<sup>76</sup>

Os LIs são compostos inteiramente formados por íons, sendo a maioria líquidos à temperatura ambiente ou muito abaixo desta. São formados por um cátion, geralmente orgânico e um ânion.<sup>75</sup>

Os líquidos iônicos possuem propriedades físicas vantajosas em comparação a solventes orgânicos usados, tais como baixa inflamabilidade, reciclabilidade, alta estabilidade térmica e excelente solubilização.<sup>77-81</sup>

Além disso, a polaridade, miscibilidade e hidrofobicidade ou hidrofobicidade, pode ser projetado para necessidades individuais. Combinação das propriedades físicas e químicas dos LIs oferece oportunidades para o processamento verde.<sup>80,81</sup>

Pode-se distinguir atualmente três gerações de líquidos iônicos. Os líquidos iônicos à base de piridínio, pirrolidínio, ou cátions de amônio são conhecidos como os de primeira geração. A segunda geração é formada por fosfônio, imidazólio e guanidínio. A terceira geração compreende os líquidos iônicos específicos (**Figura 27**).<sup>82</sup>

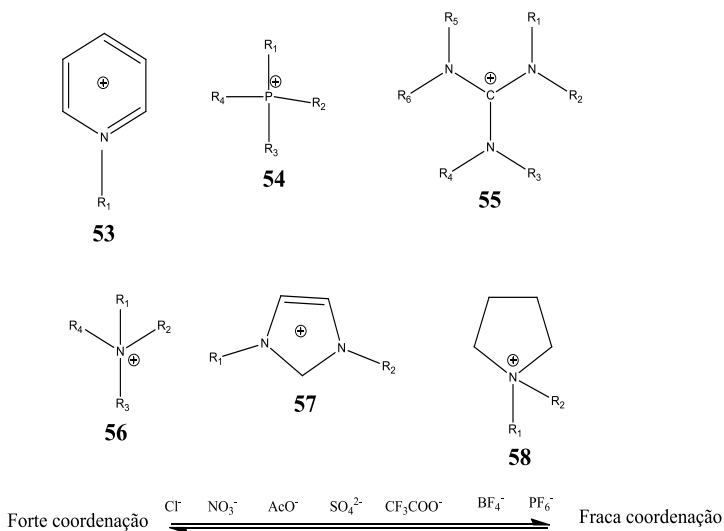


Figura 27– Líquidos iônicos mais comuns de 1ª e 2ª geração usados em biocatálise. <sup>83</sup>

Na epoxidação do ciclohexeno e cicloocteno foi possível observar diferenças claras na conversão ao epóxido, na presença de diferentes líquidos iônicos. Na reação do ciclohexeno, a conversão ao epóxido foi de 71% ao usar o 1-(3-hidroxi-propil)-3-metilimidazol nitrato [HOPMIm][NO<sub>3</sub>], que é 9% maior do que ao usar 1-butil-3-metilimidazol tetrafluorborato [BMIm][BF<sub>4</sub>] (62%). Na epoxidação do cicloocteno, a diferença entre os mesmo LIs foi ainda maior, sendo de 23%. Ao usar o [HOPMIm][NO<sub>3</sub>], a conversão ao epóxido foi de 69% e com o [BMIm][BF<sub>4</sub>] foi 46%. Em meio mais hidrófobico tal como 1-butil-3-metilimidazol hexafluorofosfato [BMIm][PF<sub>6</sub>], um sistema

bifásico é formado durante a epoxidação, e devido às limitações de transferência de massa, a conversão ao epóxido diminuiu sendo de 38% (**Tabela 9**).<sup>83</sup>

Tabela 9– Epoxidação de alcenos na presença de CALB em líquido iônico.<sup>83</sup>

Conversão ao epóxido (%)			
	[HOPMIm][NO <sub>3</sub> ]	[Bmim][BF <sub>4</sub> ]	[Bmim][PF <sub>6</sub> ]
Ciclohexeno	71	62	56
Cicloocteno	69	46	38
Estireno	44	40	41

Condições de reação: alceno (1,40mmol), ácido octanóico (0,2mmol), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% (2,6mmol), n-decano (0,12mmol), CALB (10mg), líquido iônico (1mL).  
Temperatura ambiente, 24h.

Ao aumentar a temperatura para 50°C, a conversão ao epóxido aumentou. Ao usar [HOPMIm][NO<sub>3</sub>] a conversão ao epóxido do ciclohexeno aumentou de 70% a temperatura ambiente após 24 h, para 86% a 50 ° C após 5 h. Usando [BMIm][BF<sub>4</sub>], a conversão também foi maior, sendo de 73% (**Tabela 10**).<sup>83</sup>

Tabela 10 - Epoxidação do ciclohexeno com a CALB em líquido iônico a 50°C.<sup>83</sup>

	[HOPMIm][NO <sub>3</sub> ]	[BMim][BF <sub>4</sub> ]
Ciclohexeno	86	73

Condições de reação: alceno (1,40mmol), ácido octanóico (0,2mmol), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% (2,6mmol), n-decano (0,12mmol), CALB (10mg), líquido iônico (1mL). 50°C, 5h.

A partir destas considerações teóricas, neste trabalho propõe-se a utilização de lipases de diferentes procedências na preparação de perácidos derivados de ácidos carboxílicos e posterior utilização *in situ* na obtenção de epóxidos derivados do  $\alpha$ -pineno. Os estudos a seguir, serão apresentados em função da otimização dos parâmetros que influenciam diretamente nestas reações, tais como, procedência da lipase, solvente orgânico na presença ou não de líquidos iônicos, e de diversos doadores acila. Também será demonstrada a aplicabilidade desta metodologia em relação a diferentes substratos, tais como o  $\beta$ -pineno, citrionelal, 3-careno e eugenol.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar lipases, imobilizadas ou não, como biocatalisadores em reações de per-hidrólise de ácidos carboxílicos para formação de seus respectivos perácidos e a utilização destes na oxidação *in situ* de monoterpenos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar o epóxido do  $\alpha$ -pineno por métodos convencionais (*p. ex.* por oxidação com *m*-CPBA) e comparar os dados espectroscópicos obtidos com os pelo método enzimáticos.
- Preparar o epóxido do  $\alpha$ -pineno pelo método quimio-enzimático utilizando uréia peróxido de hidrogênio (UPH) como doador peróxido.
- Avaliar o uso de diferentes lipases na epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno.
- Avaliar o efeito da variação da massa da lipase de *Candida antarctica* (CALB) e da Lipozyme 435 na epoxidação do  $\alpha$ -pineno.
- Avaliar o efeito do tempo e temperatura na reação de epoxidação do  $\alpha$ -pineno catalisada pela Lipozyme 435.
- Avaliar o efeito do solvente orgânico na epoxidação do  $\alpha$ -pineno (incluindo os líquidos iônicos) catalisada pela Lipozyme 435.

- Averiguar a influência de diferentes doadores acilas tais como ácido hexanóico, octanóico e decanóico, na epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno catalisada pela Lipozyme 435.
- Utilizar as melhores condições reacionais obtidas anteriormente na epoxidação do  $\beta$ -pineno, 3-careno, citronelal e eugenol com a Lipozyme 435.
- Imobilizar a lipase de *Aspergillus niger* gel de ágar e em bucha vegetal e comparar com a lipase livre na epoxidação do  $\alpha$ -pineno.
- Isolar e caracterizar os epóxidos obtidos, através de técnicas espectroscópicas tais como as de infravermelho e ressonância magnética nuclear (RMN  $^1\text{H}$ ).
- Comparar os resultados obtidos com outros descritos na literatura.

## 3 PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 MATERIAIS

Os solventes e reagentes utilizados foram de grau de pureza >95% ou P.A, e são das seguintes procedências:

- **Aldrich:** ácidos hexanóico (99,5%), decanóico, 3-metilvalérico (97%), 2- bromovalérico, 2-bromohexanóico (99%), 2-bromohexadecanóico (97%), decanodióico, dodecanodióico, docosanodióico (85%), adípico, 2-octenóico e 4-pentenóico. Tetrametil silano(TMS), clorofórmio deuterado( $\text{CDCl}_3$ ) (99,8%), tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][ $\text{BF}_4$ ] (97%), hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][ $\text{PF}_6$ ] (96%), uréia peróxido de hidrogênio(UPH) (97%);
- **Merck:** tolueno (99,7%), isooctano (99%);
- **Vetec:** peróxido de hidrogênio 30%, ácidos butírico, caprílico (99,5%), láurico esteárico (99%), palmítico (98%) e octanóico, diclorometano (99,5%), cicloexano (99%), t-butanol (99%), éter *t*-butil-metilico (99,5%), acetonitrila (99,5%), éter di-*isopropilico* (99%);
- **Grupo Químico:** acetato de etila, etanol (99,5%), ácido etanóico;
- **Reagen:** hexano (98,5%);
- **Nuclear:** clorofórmio (99,8%), sulfato de magnésio anidro (98%);
- **Dinâmica:** éter etílico;
- **Fluka Chemika:**  $\alpha$ -pineno (98%),  $\beta$ -pineno (80%), ácido mirístico (98%), ácido 2-metilvalérico (98%);
- **SAFC:** citronelal 85%;
- **F.Maia:** tetrahidrofurano;



- **Carlo Herba:** acetona (99,5%);
- **Cromoline:** metanol (99,8%);
- **Sigma:** ácidos 4-metilvalérico (99%), (+/-)-canforcarboxílico, (+/-)-2-etilhexanóico, D(-)-mandélico e L-(+)-mandélico;
- **Geroma do Brasil:** eugenol;
- **Acros Organics:** 3-careno (90%).

Foram utilizadas também as seguintes lipases:

- **Novozymes:** lipase de *Candida antartica* (imobilizada em macroporos de resina acrílica) (Novozym 435 – CALB) (10,000 PLU/g<sup>a</sup>); Lipozyme 435 (imobilizada e geneticamente modificada a partir da *Mucor Miehei*); e lipase de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IN, 5-6 BAUN/g<sup>b</sup>);
- **Amano:** PS Amano – 30.000U/g<sup>c</sup>; lipase de *Rhizopus oryzae* (F-AP15) (150 u/mg<sup>d</sup>) ; lipase de *Candida rugosa* (AY Amano 30) (30,000u/g<sup>e</sup>); lipase de *Pseudomonas fluorescens* (AK Amano 20); lipase de *Mucor javanicus* (M Amano 10, 10.000u/g); lipase de *Aspergillus niger* (AS Amano; A Amano 12); lipases de *Burkholderia cepacia* (PS-C Amano I; PS-C Amano II, 1.000U/g; PS-D Amano I; PS Amano IM, 500U/g);
- **Sigma:** lipase de pâncreas de porco (46U/mg);

Estas lipases foram recebidas como doação da Novozyme e da Amano Pharmaceutical CO.

As duas lipases nativas de *Aspergillus niger* (19,8U/mL<sup>f</sup>) e a de *Mucor hiemalis* – lipase 32 (23,4 U/mL), foram isoladas a partir de

solo da região Brandão Bueno (MG, Brasil) e doadas pela prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patricia O. Carvalho (USF – Bragança paulista – SP).<sup>84</sup>

---

<sup>a</sup>PLU/g é uma unidade relacionada á 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>85</sup>

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

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

<sup>d</sup>u/mg solido é a quantidade necessária para liberar 1,0 $\mu$ mol/min de ácidos graxos de um triacilglicerol, a pH 7,2 e 37°C.

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

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

## 3.2 EQUIPAMENTOS

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

Os reagentes e produtos foram caracterizados por técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ). Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  foram obtidos em um espectrômetro da Varian (400MHz) utilizando como referência interna o tetrametilsilano (TMS,  $\delta=0,00\text{ppm}$ ). O solvente usado foi o clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ).

O produto também foi caracterizado por técnicas espectroscópicas de absorção no infravermelho (IV). O espectro de IV foi obtido na região de  $4000-700\text{ cm}^{-1}$  com um espectrofotômetro Perkin Elmer – FT-IR Spectrometer.

## 3.3 PREPARAÇÃO DO EPÓXIDO DO $\alpha$ -PINENO VIA NÃO ENZIMÁTICA

Em um erlemeyer foram adicionados 50mL (0,8 mol) de diclorometano sob agitação magnética em um banho com gelo. Em seguida adicionou-se 9g (52mmol) de ácido *m*-cloroperoxibenzóico e aos poucos 5mL (31,5mmol) de  $\alpha$ -pineno (**Figura 28**).

Constantemente, foram realizadas cromatografia de camada delgada para análise da formação do produto (eluente: 3:7 hexano/acetato de etila) e Rf:0,54.

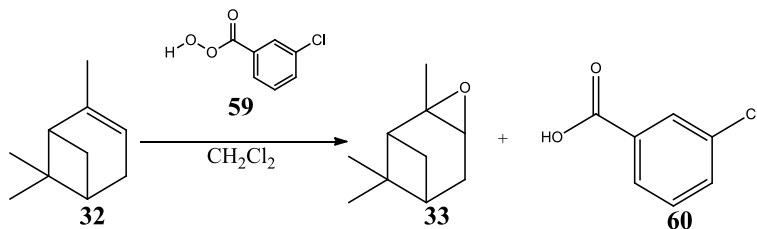


Figura 28– Epoxidação do  $\alpha$ -pineno via química.

Após adição do  $\alpha$ -pineno, foi possível observar a formação de um precipitado branco e liberação de gás. Após 30min de agitação, foi realizada cromatografia de camada delgada e deixado em agitação por mais 3 horas. A solução foi deixada na geladeira por 24h para total precipitação do ácido. A mistura reacional foi filtrada a vácuo, separando a parte líquida da sólida. Após secagem, foi determinado o ponto de fusão do sólido e comparado com a literatura. Obteve-se  $140^\circ\text{C}$ , que é compatível com o ácido *m*-cloro benzóico ( $153\text{-}156^\circ\text{C}$ ).<sup>86</sup>

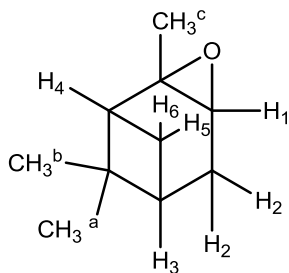
A parte líquida foi neutralizada com solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio. A fase aquosa foi descartada corretamente e a orgânica rotoevaporada para eliminar o solvente. Para verificar a formação do produto e identificá-lo, foram realizadas análises dos

espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e de absorção na região do infravermelho.

A **Figura 29 – A** mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$ , onde foi observado a formação dos produtos através da comparação das áreas relativas ao hidrogênio da dupla ligação em 5,3 ppm, com o hidrogênio do epóxido em 3,06 ppm.

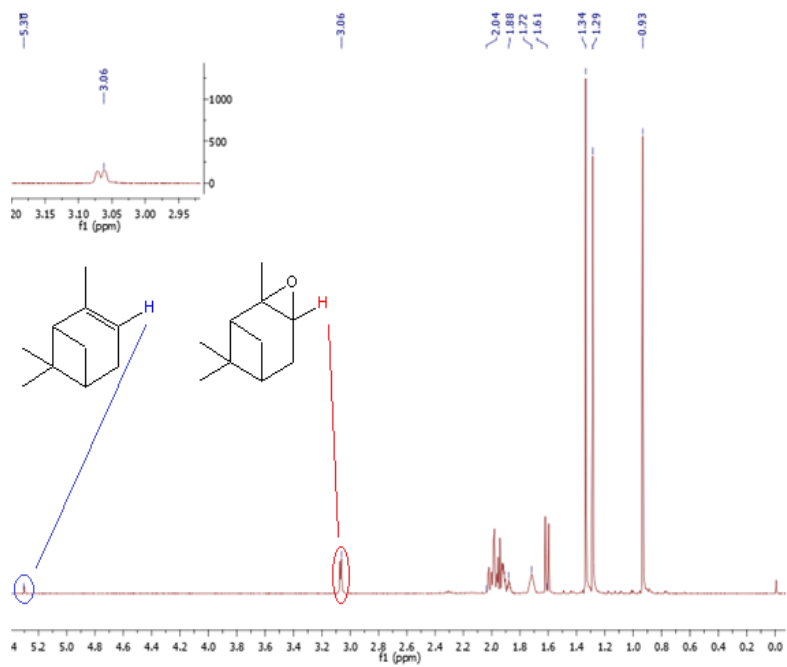
Os dados espectroscópicos do epóxido do  $\alpha$ -pineno foram comparados com a literatura e estão descritos a seguir.<sup>87</sup>

### Epóxido $\alpha$ -pineno



### 33

É possível observar no espectro (**Figura 29 – A**) o pico mais importante para determinar a formação do epóxido, em 3,06 ppm ( $\text{H}_1$ , 1H, d). Além deste, observa-se também os picos das metilas em 1,34 e 0,93ppm ( $\text{CH}_3^a$ , 3H, s e  $\text{CH}_3^b$ , 3H, s) e em 1,29ppm ( $\text{CH}_3^c$ , 3H, s). Observa-se ainda o multipletto entre 2,06 – 1,90ppm referente ao ( $\text{H}_2$ , 2H, m); o pico em 1,72ppm do  $\text{H}_4$  (1H, m) e em 1,61 e 1,98ppm referente aos hidrogênios  $\text{H}_6$  (1H, m) e  $\text{H}_5$  (1H, m).



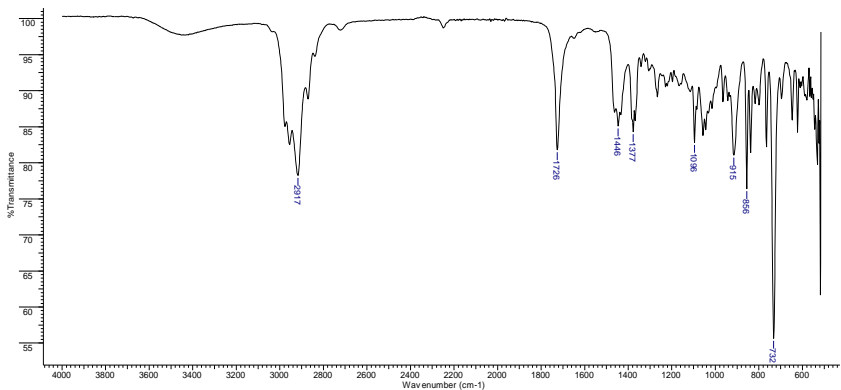


Figura 29– (A) Espectro de RMN1H do epóxido do  $\alpha$ -pineno [CDCl<sub>3</sub>, 400MHz].  
 (B) Espectro de absorção no infravermelho do epóxido do  $\alpha$ -pineno (filme).

É importante salientar que mesmo após purificação (ver item 3.3, pg37), ainda é detectado a presença do  $\alpha$ -pineno (<10%), devido a presença do pico em 5,7ppm correspondente ao H<sub>1</sub> da C=C do reagente.<sup>87</sup>

Na **Figura 29 - B**, é possível observar a banda correspondente ao epóxido em 1726cm<sup>-1</sup>, referente a ligação C-O. Verifica-se também uma banda média de deformação simétrica (CH<sub>3</sub>) em 1377 cm<sup>-1</sup>. Os sinais em 2800 cm<sup>-1</sup> e 3000 cm<sup>-1</sup> são atribuídos à deformação axial de C - H em carbonos sp<sup>3</sup>. Na região entre 1300 cm<sup>-1</sup> e 1500 cm<sup>-1</sup>, observam-se a banda de intensidade média 1446 cm<sup>-1</sup> corresponde ao estiramento da ligação C = C. Estas bandas são compatíveis com valores da literatura.<sup>87</sup>

### 3.4 PREPARAÇÃO QUIMIO-ENZIMÁTICA DO DERIVADO DO $\alpha$ -PINENO

Em uma reação típica, em um erlemeyer de 125 mL foram adicionados 50mg da CALB, 20 mL de diclorometano, 0,02mol (1,9g) de ureia peróxido de hidrogênio (UPH), 2mmol (0,3mL) de ácido hexanóico e 0,02mol (1,4mL) de  $\alpha$ -pineno. A reação foi mantida sob agitação constante em um agitador orbital (250rpm) a 25°C por 24h (Figura 30).

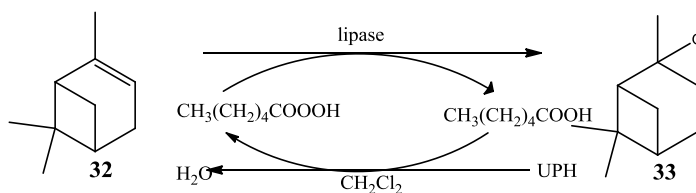


Figura 30– Epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno.<sup>61</sup>

Este sistema foi colocado em agitação por 24h e monitorado por cromatografia de camada delgada (eluente: 3:7 hexano/acetato de etila) para análise da formação do produto (RF: 0,54). Após 24h a mistura foi filtrada e a fase orgânica neutralizada com solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio, com a separação das fases orgânica e aquosa através de extração líquido-líquido. A fase aquosa foi descartada corretamente, e a orgânica submetida a um rota-evaporador para eliminar o solvente.



Para verificar a formação do produto e identificá-lo, foram realizadas análises dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de absorção no infravermelho. Os valores obtidos nos espectros são compatíveis com os apresentados para o epóxido preparado via química.

Foram avaliados vários parâmetros nesta reação, incluindo a influência do uso de diversas lipases (imobilizadas ou não), tempo de reação, doador acila, temperatura e o meio orgânico incluindo ou não os líquidos iônicos. A partir desses parâmetros, foram utilizadas as melhores condições para a epoxidação do  $\beta$ -pineno, 3-careno, citronelal e eugenol com a Lipozyme 435. Os detalhes experimentais para cada um destes estudos serão apresentados e discutidos nos resultados e discussão.

As reações foram realizadas na ausência das lipases, e não foi detectado a formação do produto.

### 3.5 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Aspergillus niger*

#### 3.5.1 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE EM GEL DE ÁGAR

Em um béquer de 50 mL foram adicionados 0,4g de agar, 2 mL de água e o sistema foi deixado no ultrassom por 3 minutos. Depois foram completados com 8 mL de água fervente (~100°C). Quando a mistura tornou-se transparente, deixou-se gelificar até atingir 30°C, e em seguida foram adicionados 30-70mg da lipase de *A. niger* dissolvida em 2 mL de água. Após resfriamento, foi obtido um

gel consistente e com auxílio de uma espátula este foi passado em uma peneira fina, obtendo-se pequenos pedaços de gel de ágar com a lipase (**Figura 31**).<sup>35</sup>

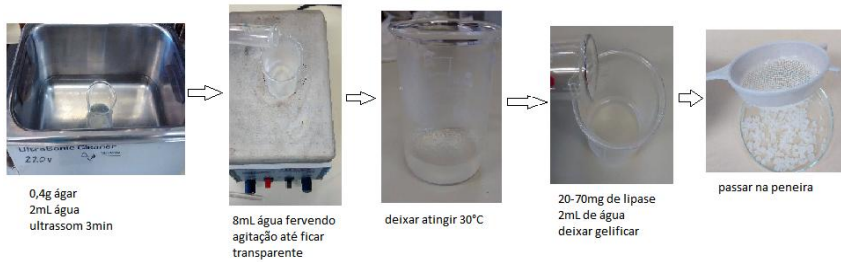


Figura 31–Imobilização da lipase de *A.niger* em gel de ágar.

### 3.5.2 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE EM BUCHA VEGETAL

A bucha vegetal foi colocada em solução de peróxido de hidrogênio 30% por 24h; e após estar seca foi cortada em pequenos pedaços e utilizada na imobilização da lipase de *A. niger*. Para a imobilização foi pesado 500mg de bucha vegetal em uma paca de Petri. Foram dissolvidas 10-70mg de lipase em 20mL de solução tampão fosfato de potássio (pH=7,2), e colocado sobre o suporte. O sistema foi seco em capela por aproximadamente 24h, obtendo-se assim o suporte com o biocatalisador. Este processo é por adsorção (**Figura 32**).<sup>88</sup>

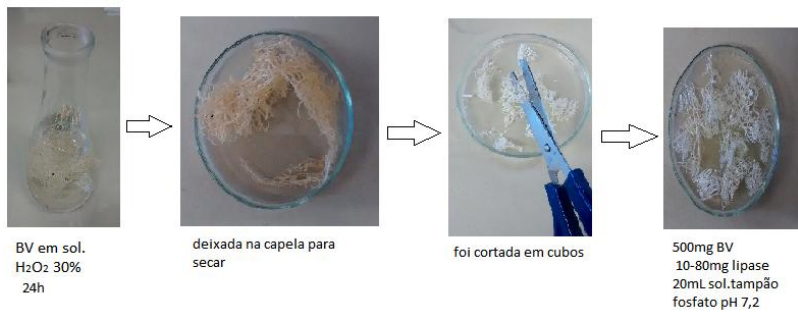


Figura 32– Imobilização da lipase de *A.niger* em bucha vegetal.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho serão apresentados os resultados obtidos na epoxidação quimio-enzimática dos terpenos  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno, 3-careno, citronelal e eugenol. O primeiro terpeno escolhido para iniciar os estudos foi o  $\alpha$ -pineno. Com este composto foram estudadas algumas condições experimentais, tais como o uso de lipases de diferentes fontes, tempo e temperatura da reação, tipo de doador acila e a influência do meio orgânico. Após estes estudos, as melhores condições reacionais foram testadas com outros quatro terpenos.

### 4.1 EPOXIDAÇÃO QUIMIO-ENZIMÁTICA DO $\alpha$ -PINENO

Para iniciar os estudos das reações de epoxidação foi preciso escolher primeiro o biocatalisador e por isso avaliou-se o uso de lipases de diferentes procedências. Foi escolhido o ácido hexanóico como doador acila e o diclorometano como solvente, segundo alguns estudos já realizados na epoxidação do citronelol.<sup>74</sup> A reação estudada esta representada na **Figura 33**.

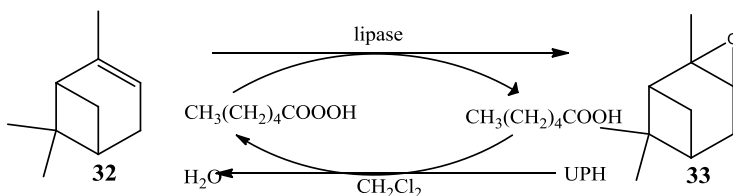


Figura 33 – Epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno catalisada por lipases.

#### 4.1.1 AVALIAÇÃO DO USO DE DIFERENTES LIPASES

Neste estudo foram selecionadas 18 lipases comercialmente disponíveis e 2 nativas para verificar a eficiência de cada uma delas na epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno. A procedência, atividade e as siglas correspondentes estão descritas na parte experimental (item 3.1, pg.53).

Ao usar as lipases F-AP15, PS Amano, AK Amano 20, M Amano 10, AY Amano 30, AYS Amano, A Amano 12, PS-C Amano I, lipase do Pancreas de Porco, PS-C Amano II, PS-D Amano I, PS Amano IM e a de *Mucor hiemalis*; o produto **33** não foi obtido. Inicialmente, as reações foram realizadas em 8h.

Na epoxidação do  $\beta$ -cariofileno estudada pela Silva e col., por exemplo, ao utilizar a FAP-15 o epóxido **27** (pg. 34) foi obtido com conversões de 16 e 15%, com a lipase na forma livre e imobilizada em gel de ágar, respectivamente.<sup>35</sup>

Porém, na epoxidação do  $\alpha$ -pineno ao utilizar a FAP-15 em uma reação de 24h, não foi observada a formação do produto. A mesma foi realizada mudando o agente oxidante. Ao utilizar água oxigenada 30%, também não foi detectada a formação do epóxido **33**.

Além destas, outras lipases foram usadas e os resultados de conversão ao epóxido **33**, estão apresentados na **Tabela 11**.

Tabela 11– Avaliação do uso de diferentes lipases na epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno.

Lipases	Conversão(%) <sup>a</sup>
CAL-B	75 <sup>b</sup>
Lipozyme 435	60 <sup>b</sup> ; 57 <sup>c</sup>
<i>Aspergillus niger</i>	44 <sup>c</sup> ; 75 <sup>d</sup>
RM IM	9 <sup>c</sup>
Lipase 32	6 <sup>c</sup>

Condições de reação:  $\alpha$ -pineno (0,01mol), ácido hexanóico (2mmol), UPH (0,02mol), lipase (50mg); diclorometano (20mL), 25°C, 300 rpm. (a) Determinada por RMN <sup>1</sup>H; (b)9h; (c)8h, e (d) 24h.

Ao utilizar as lipases RM IM e a lipase 32, a conversão ao produto foi baixa sendo de 6 e 9%. As maiores conversões ao epóxido **33** foram obtidas ao utilizar as lipases CALB, Lipozyme 435 e a de *A. niger* (44 – 75%). Dentre as duas lipases nativas apenas ao usar a de *A. niger* é que o produto foi obtido com conversão de 44%. Para comprovar sua eficiência como biocatalisador fez-se a reação em 24horas, e obteve-se o produto com conversão de 75%.

Os resultados obtidos mostraram a importância de avaliar diferentes fontes de biocatalisadores para cada substrato. Considerando as lipases que foram eficientes na epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno, escolheu-se as três que formaram o epóxido

**33** em maiores conversões, sendo a CALB, Lipozyme 435 e a de *A. niger*, para serem utilizadas nos próximos estudos.

## 4.2. EPOXIDAÇÃO QUIMIO-ENZIMÁTICA DO $\alpha$ -PINENO COM A CALB

O primeiro biocatalisador utilizado foi a CALB, e avaliou-se a influência do tempo. Não foram feitos outros estudos com a CALB, considerando que esta foi utilizada em vários outros trabalhos, incluindo a obtenção de epóxidos derivados do ácido linoleico e a resolução de alcoóis.<sup>21,33</sup>

Mais especificamente, Rocha e col. usaram a CALB na resolução cinética do (R,S)-iodofeniletanol.<sup>21</sup> Mais tarde, Zanette e col. usaram a CALB como biocatalisador da epoxidação quimio-enzimática do ácido linoleico.<sup>33</sup>

### 4.2.1 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE REAÇÃO

Neste primeiro estudo foram preparadas cinco reações idênticas com as mesmas condições descritas anteriormente (item 3.4, pg. 60) e após 3, 6, 9, 24 e 30h, a formação do produto foi determinada por RMN <sup>1</sup>H, após isolamento do produto da reação (item 3.4, pg. 60). Os valores de conversão ao epóxido **33** estão representados na **Figura 34**.

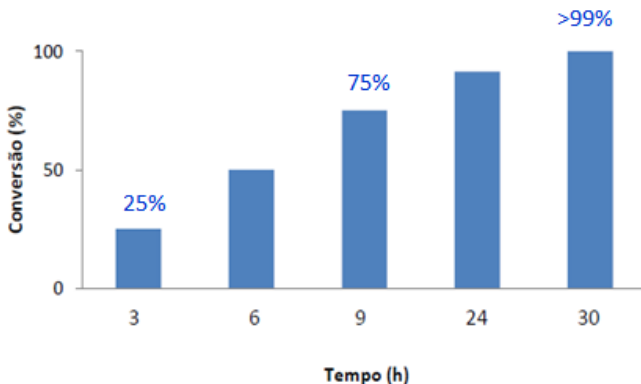


Figura 34– Influência do tempo na epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno  
Condições de reação:  $\alpha$ -pineno (0,01mol), ácido hexanóico (2mmol), UPH (0,02mol), CALB (50mg), diclorometano (20mL), 25°C, 3-30h, 300 rpm.

Em três horas, o epóxido foi obtido com 25% de conversão. A porcentagem de conversão foi aumentando com o tempo, sendo que em 9 horas foi de 75%. Em 30h, o epóxido **33** foi obtido com conversão >99%, sendo um bom resultado. Salienta-se que as condições de reação são brandas.

Como citado a CALB é uma lipase bem conhecida e muito estudada pelos químicos como biocatalisador em diversas reações de resolução e epoxidação.<sup>21, 32, 33, 74</sup>

Assim, optou-se por utilizar outra lipase nos próximos estudos, sendo a Lipozyme 435, que também foi fornecida pelo fabricante na forma imobilizada.



### 4.3 EPOXIDAÇÃO QUIMIO-ENZIMÁTICA DO $\alpha$ -PINENO COM A LIPOZYME 435

Utilizando a Lipozyme 435, avaliou-se o tempo e temperatura de reação, massa da lipase, uso de diferentes doadores acilas e também a influência do meio reacional, na presença de solventes orgânicos puros e/ou em mistura com alguns LIs.

#### 4.3.1 INFLUÊNCIA DO TEMPO NA REAÇÃO

O primeiro estudo feito com a Lipozyme 435 foi o do tempo, sendo que as reações foram realizadas em 3, 6, 8, 9, 16, 24 e 30h. Os valores de conversão ao epóxido **33** estão representados na **Figura 35**.

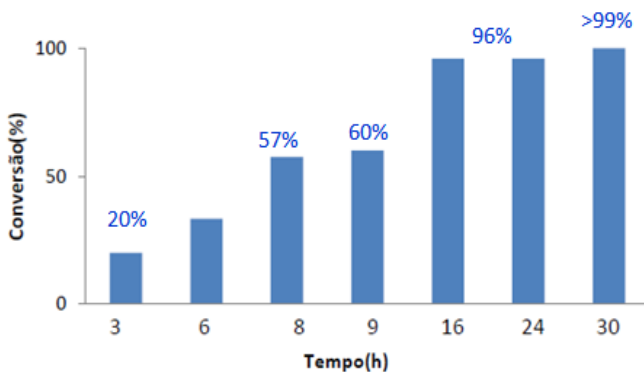


Figura 35– Influência do tempo na epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno. Condições de reação:  $\alpha$ -pineno (0,01mol), ácido hexanóico (2mmol), UPH (0,02mol), Lipozyme 435 (50mg); diclorometano (20mL); 25°C, 3-30h, 300 rpm.

Em três horas de reação o epóxido **33** foi obtido com 20% de conversão. Esta porcentagem foi aumentando com o tempo, sendo que em 9 horas foi de 60%. Foi possível observar no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (expandido na região de 2,9 - 5,4 ppm) que o pico em 3,08 ppm referente ao hidrogênio do epóxido vai aumentando sua intensidade, enquanto o pico em 5,2 ppm referente ao hidrogênio da dupla ligação do terpeno, foi diminuindo (**Figura 36**).

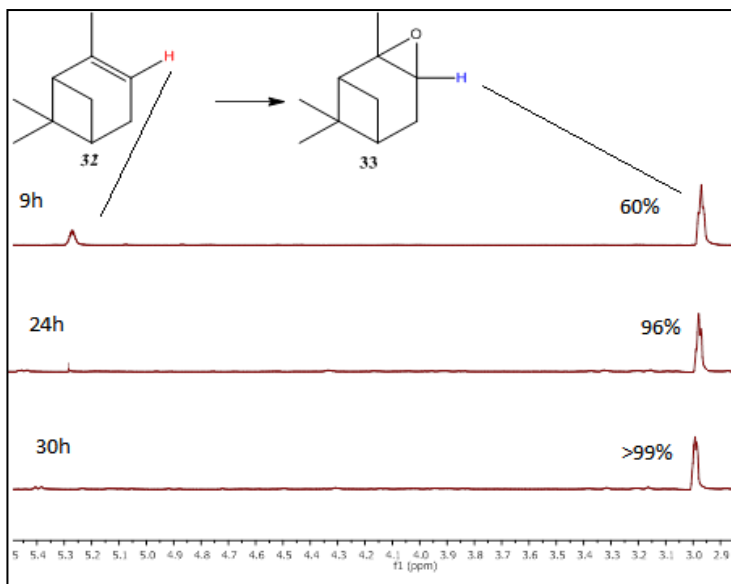


Figura 36– Espectros de RMN 1H (2,9 - 5,4 ppm) mostrando a influência do tempo na epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz). Condições de reação:  $\alpha$ -pineno (0,01mol), ácido hexanóico (2mmol), UPH (0,02mol), Lipozyme 435 (50mg); diclorometano (20mL); 25°C, 9-30h, 300 rpm.

No tempo de 16 e 24h de reação não houve diferença significativa na conversão, sendo de ~91%. A conversão total ao epóxido foi em 30h (>99%). Os dados mostram que dependendo do tempo de reação, o produto pode ser obtido em boas conversões, e em condições brandas.

Nos estudos seguintes foi escolhido o tempo de 8h, visto que não houve diferença significativa na conversão entre os tempos de 8

e 9h, sendo de 57 e 60%. Neste sentido, no próximo estudo foram usadas diferentes massas da Lipozyme 435.

#### 4.3.2 INFLUÊNCIA DA MASSA DA LIPOZYME 435.

A lipase atua na primeira etapa da reação de epoxidação, ou seja na formação do perácido *in situ*, para posterior oxidação do alceno. Por isso a quantidade de lipase é muito importante na reação, pois irá determinar a quantidade de perácido formado. Além disso, dependendo desta quantidade pode ocorrer a saturação, ou seja, ao aumentar a massa da lipase não se obtêm uma maior conversão ao produto.<sup>56, 59, 60</sup>

A **Figura 37**, mostra os valores de conversão ao epóxido **33** usando diferentes massas da Lipozyme 435.

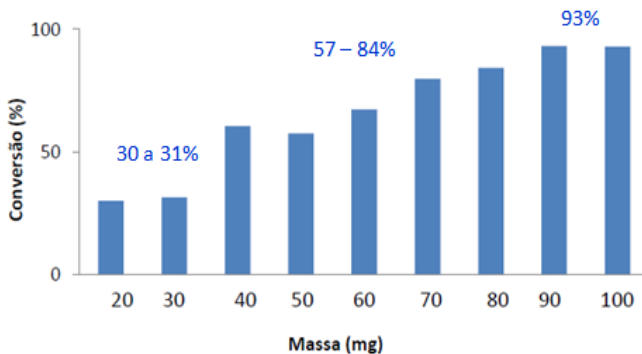


Figura 37– Influência da massa da Lipozyme 435 na epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno. Condições de reação:  $\alpha$ -pineno (0,01mol), ácido hexanóico (2mmol), UPH (0,02mol), Lipozyme 435 (20 - 100mg); diclorometano (20mL); 25°C, 8h, 250 rpm.

Observa-se na **Figura 37**, que a conversão aumentou ao variar a massa da lipase de 20-100mg, o que é um resultado esperado em função da formação de quantidades maiores do perácido. Ao usar 20 e 30mg, as conversões em **33** foram de 30 e 31%, respectivamente. Ao usar de 40-100mg, as conversões aumentaram, sendo de 57-93%.

Foi realizado o reuso desta lipase (diferentes massas), porém não foi verificada a formação do produto.

A partir desses resultados, em todos os outros estudos foram utilizados 50mg da lipase, e avaliados outros parâmetros (temperatura, doador acila e meio reacional) que possam aumentar

ainda mais a conversão ao epóxido. No próximo estudo avaliou-se a influência da temperatura.

### 4.3.3 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA

Outro fator importante que afeta a velocidade das reações catalisadas por enzimas ou não é a temperatura. A temperatura pode influenciar na atividade, seletividade e estabilidade do biocatalisador, bem como o equilíbrio da reação.<sup>4, 5, 10, 89</sup>

Para avaliar este efeito na epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno as reações estudadas foram realizadas na faixa de 20-45°C, e os resultados estão apresentados na **Figura 38**.

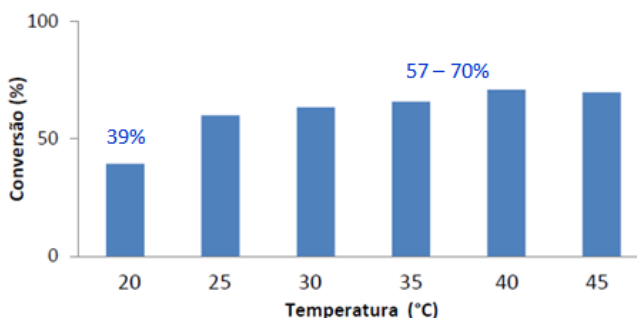


Figura 38– Influência da temperatura na formação do epóxido do  $\alpha$ -pineno. Condições de reação:  $\alpha$ -pineno (0,01mol), ácido hexanóico (2mmol), UPH (0,02mol), Lipozyme 435 (50mg); diclorometano (20mL); temperatura: 20 – 45°C, 8h, 300 rpm .

É possível observar que a 20°C, a conversão é relativamente baixa sendo de 39,4% e acima deste valor, de 25 a 45°C não houve variação significativa nas conversões, sendo de 57 – 71%.

Nas temperaturas entre 25-40°C as condições foram adequadas para a formação do perácido, enquanto que a 45°C houve uma possível decomposição da UPH e diminuição da atividade catalítica da Lipozyme 435, obtendo o epóxido com conversão um pouco menor (70%) que em 40°C (71%). Segundo a ficha técnica a Lipozyme 435 pode ser utilizada entre 30-70°C.<sup>85</sup>

Como mencionado, a Lipozyme 435 já está imobilizada, o que ajuda a manter a estabilidade em temperaturas maiores que 35°C.<sup>85</sup>

A partir destes resultados, optou-se por realizar as reações em 25°C para avaliar o efeito do solvente.

#### 4.3.4 EFEITO DO SOLVENTE ORGÂNICO

Neste estudo, foi avaliada a influência do meio orgânico na epoxidação do  $\alpha$ -pineno. Está bem estabelecido na literatura que a atividade da enzima é fortemente afetada pelo solvente orgânico.<sup>20, 74, 90</sup>

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

polares com  $\log P < 2,00$  muitas vezes não são adequados para estas reações.<sup>90</sup>

O parâmetro de saúde é uma escala que indica o grau de toxicidade ao corpo humano durante longa exposição a solventes. Como valor máximo na escala tem-se a água com parâmetro igual a 10, sendo o melhor solvente para saúde humana. Os solventes ideais para a saúde humana são aqueles com parâmetros entre 8 e 10. Os que apresentam valores entre 4 e 7 são considerados intermediários com relação a exposição e <4 devem ser substituídos por outros solventes menos tóxicos ao corpo humano.<sup>91</sup>

A **Tabela 12**, mostra os dados da conversão ao produto **33** obtidos ao usar os diferentes solventes orgânicos.



Tabela 12- Efeito do solvente orgânico na epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno.

Entrada	Solvente	Log $P^a$	Parâmetro de saúde <sup>b</sup>	Conv. (%) <sup>c</sup>
1	isooctano	4,51	4	24
2	<i>n</i> -hexano	3,50	4	5
3	ciclohexano	3,20	7	<5
4	tolueno	2,50	4	33
5	clorofórmio	2,00	3	25
6	éter diisopropílico	1,52	8	33
7	<i>t</i> -butanol	1,45	6	50
8	MTBE	1,43	5	42
9	diclorometano	0,93	4	57
10	éter etílico	0,85	5	25
11	acetato de etila	0,68	8	>99
12	THF	0,49	6	45
13	acetona	-0,23	8	<5
14	Etanol	-0,24	8	<5
15	acetonitrila	-0,33	6	<5
16	metanol	-0,76	5	<5

Condições de reação:  $\alpha$ -pineno (0,01mol), ácido hexanóico (2mmol), UPH (0,02mol), lipozyme435 (50mg); solvente (20mL); 25°C, 8h, 250 rpm. (a) ref.90; (b) ref.91; (c) Determinado por RMN <sup>1</sup>H

Ao utilizar os solventes mais polares acetona, etanol, acetonitrila e metanol verificou-se que estes não foram adequados para a reação de epoxidação do  $\alpha$ -pineno, obtendo o epóxido com conversão <5% (Entradas 13 - 16).

Estes solventes com  $\log P < 0$  podem inativar a enzima, pois retiram a água essencial ao redor da lipase.<sup>10</sup>

Além disto, alguns deles são reconhecidamente tóxicos para a saúde humana, como o metanol e acetonitrila.<sup>91</sup>

Ao usar os solventes apolares tais como isooctano, hexano, tolueno e ciclohexano, ( $\log P > 2,0$ ) o epóxido foi obtido com conversões de 5 a 33% (Entradas 1 – 4). Estes resultados podem ser explicados pelo fato que o solvente apolar não inativa a enzima mas também não estabiliza o intermediário formado na reação da C=C do  $\alpha$ -pineno com o peroxi-ácido (**Figura 21**, pg.37).<sup>53</sup>

Observa-se que os valores do parâmetro de saúde para o isooctano (4), hexano (4) e tolueno (4) estão no limite da toxicidade para saúde, e que o ciclohexano (7) não é tão tóxico. Porém não é possível estabelecer uma relação direta entre estes valores e as conversões ao epóxido, considerando que nesta reação outros fatores estão envolvidos, como a formação quimio-enzimática do peroxi-ácido.

As maiores conversões ao produto **33** foram obtidas utilizando os solventes com  $0 < \log P < 2,0$ , tais como o acetato de etila (>99%), diclorometano (57%) e *t*-butanol (50%). Estes resultados são esperados, considerando que devido a polaridade do solvente

não deve ocorrer a inativação da enzima e estes podem estabilizar o estado de transição (**Figura 21**, pg.24), com características polares.

O acetato de etila pode ser utilizado como solvente e doador acila. Após o uso deste como solvente fez-se a reação novamente utilizando-o como solvente e doador acila. Em 8h de reação e na ausência do ácido hexanóico, o epóxido **33** foi obtido com 80% de conversão. Estes resultados são muito bons, visto que além de ser um solvente eficiente para a reação de epoxidação, é também considerado não nocivo á saúde humana (Parâmetro de saude= 8).<sup>90</sup>

Esses dados mostram que existe certa relação entre o grau de conversão e a polaridade do solvente (expresso em valores de  $\log P$ ), visto que ao usar todos os solventes com  $\log P < 0,00$ , obteve-se o epóxido com conversão <5%. Entretanto, as maiores conversões foram obtidas com os solventes que apresentam  $0 < \log P < 2,0$ .

Recentemente, o uso de lipases, em líquidos iônicos (LIs) tem demonstrado muitas vantagens tais como altas taxas de conversão, enantiosseletividade elevada, melhor estabilidade da enzima e capacidade de reciclagem.<sup>75, 92</sup>

Assim, para avaliar a influência de alguns LIs na epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno, foram escolhidos três solventes (*t*-butanol, MTBE e isoctano). Estes foram usados em uma mistura solvente orgânico:líquido iônico (9:1 v/v) com os LIs [BMIm][BF<sub>4</sub>] e [BMIm][PF<sub>6</sub>]. Esta composição de solvente:LIs foi baseada em trabalhos anteriores, na epoxidação do citronelal e do  $\beta$ -cariofileno.<sup>63,</sup>

<sup>74</sup> Ao utilizar misturas de solventes orgânicos e LIs não foi possível obter o epóxido **33**.

Entretanto, Silva e col. ao estudar a epoxidação do citrionelol com diferentes misturas de solventes orgânicos (hexano, clorofórmio e MTBE) e LIs ([BMIm][Cl], [BMIm][PF<sub>6</sub>] e [BMIm][BF<sub>4</sub>]) catalisada pela CALB, os produtos **51** e **52** (pg. 45) foram obtidos com conversões de 18 e 75%, respectivamente.<sup>74</sup>

Em resumo, os dados aqui relatados demonstram que o meio orgânico é um parâmetro muito importante na epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno e de outros alcenos. O parâmetro de saúde não apresentou uma relação direta com o valor da conversão ao epóxido o que é também esperado devido as diversas etapas envolvidas nesta reação. Porém todas estas informações são importantes e devem ser consideradas.

O estudo a seguir visa avaliar a influência de diferentes doadores acilas na obtenção do correspondente peroxi-ácido. O solvente utilizado foi o diclorometano por ser de polaridade intermediária.

#### 4.3.5 INFLUÊNCIA DO DOADOR ACILA

Uma das primeiras etapas das reações catalisadas por lipases é a formação do intermediário “acil-enzima”.<sup>10, 74, 93</sup> Dessa forma espera-se observar uma certa influência dos diferentes doadores acilas, nestas reações.

Neste estudo, e inicialmente, nove ácidos carboxílicos de cadeia linear foram usados para avaliar a influência do tamanho da cadeia alquílica na epoxidação do  $\alpha$ -pineno. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 39**.

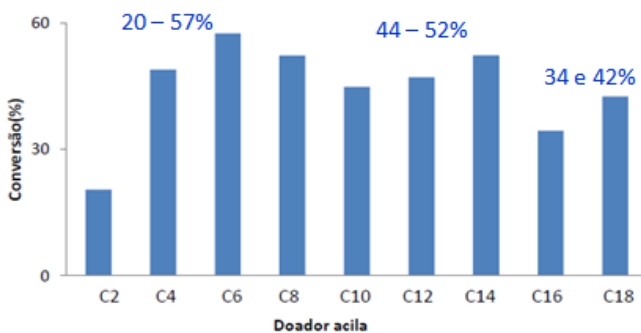
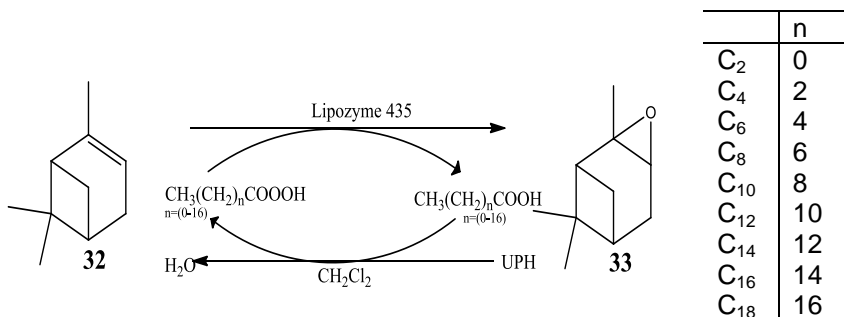


Figura 39– Influência do tamanho da cadeia alquílica do doador acila na epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno. Condições de reação:  $\alpha$ -pineno (0,01mol), ácido carboxílico (2mmol), UPH (0,02mol), Lipozyme 435 (50mg); diclorometano (20mL); 25°C, 8h, 300 rpm.

Como observado na **Figura 39**, o grau de conversão ao epóxido **33** aumentou de 20 para 57,5% com o aumento da cadeia alquílica do ácido carboxílico de C<sub>2</sub> a C<sub>6</sub>. O doador acila que levou a uma maior conversão ao epóxido foi o ácido hexanóico.

Com o aumento da cadeia de C<sub>8</sub> a C<sub>14</sub> a conversão ao produto foi de 44 a 52%. Ao utilizar os ácidos C<sub>16</sub> e C<sub>18</sub> houve uma diminuição na conversão ao epóxido **33**, sendo de 34 e 42%.

Estes efeitos podem estar relacionados aos efeitos estéreos em função do tamanho da cadeia alquílica e com a formação do intermediário acil-enzima, e posterior reação com o agente oxidante (UPH).<sup>10, 74</sup>

Resultados semelhantes foram reportados na literatura para a epoxidação quimio-enzimática do citrionelol catalisada pela CALB, onde a conversão ao epóxido **51** aumentou de 41 a 71% com aumento da cadeia alquílica do ácido carboxílico (C<sub>6</sub> a C<sub>16</sub>). O valor mais alto (71%) foi obtido quando o ácido octanóico foi o doador acila.  
74

Além dos ácidos carboxílicos de cadeias lineares, foram também utilizados outros 17 ácidos (**61 – 77**) (**Figura 40**) para avaliar os efeitos estéreos e eletrônicos dos doadores acilas. Os resultados obtidos de conversão ao epóxido **33** estão representados na **Tabela 13**.

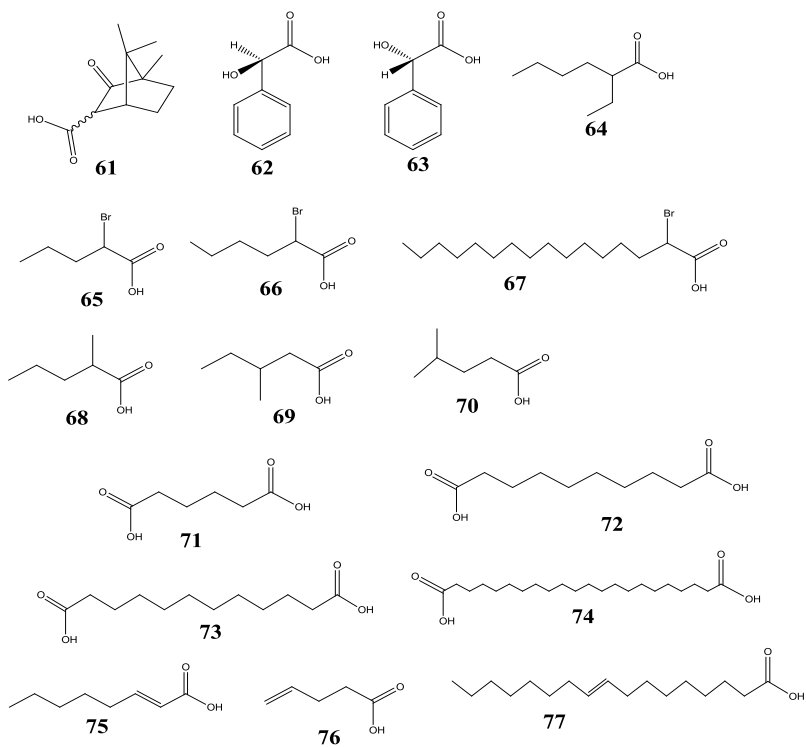


Figura 40– Estruturas dos ácidos carboxílicos usados na epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno.

Tabela 13– Influência do uso de diferentes doadores acilas (61-77) na epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno.

Entrada	Ácido	Conv. (%)
1	2-metilvalérico ( <b>68</b> )	2
2	3-metilvalérico ( <b>69</b> )	12
3	4-metilvalérico ( <b>70</b> )	26
4	hexanodióico ( <b>71</b> )	7
5	decanodióico ( <b>72</b> )	4
6	dodecanodióico ( <b>73</b> )	24
7	docosanodióico( <b>74</b> )	19
8	2-octenóico( <b>75</b> )	7
9	4-pentenóico ( <b>76</b> )	35
10	octadec-9-enóico ( <b>77</b> )	22

Condições de reação:  $\alpha$ -pineno (0,01mol), ácido (2mmol), UPH (0,02mol), Lipozyme 435 (50mg); diclorometano (20mL); 25°C, 8h ,300 rpm .

Ao utilizar os ácidos de **61 – 64** não houve conversão ao produto. A não formação do peroxi-ácido pode ser explicada pelos efeitos eletrônicos e ou estéreos, pois os ácidos possivelmente possuem uma estrutura que impede a aproximação do sitio ativo e



assim não ocorre o encaixe adequado da mesma, necessário para a formação do complexo “acil-enzima”.<sup>18</sup>

Ao utilizar os ácidos 2-bromoaléico (**65**), 2-bromohexanóico (**66**) e 2-bromohexadecanóico (**67**), também não foi verificada a formação do epóxido **33**. Esta relatada na literatura que ácidos fortes podem diminuir a atividade da enzima. Ao usar os ácidos carboxílicos  $\alpha$ -bromados, o efeito retirador de elétrons do halogênio contribuiu com essa diminuição de atividade e a não formação do peroxi-ácido.

94

Resultados similares foram reportados por Silva e col. na epoxidação do citronelol. O epóxido **51** (pg. 45) não foi detectado indicando que não houve a formação do perácido na presença destes ácidos.

Ao utilizar os ácidos 2-(**68**), 3- (**69**) e o 4-metilaléico (**70**) as conversões ao epóxido **33** variaram de 2% a 26% (Entradas 1 – 3). Estes resultados mostram a influência dos efeitos eletrônicos e estéreos na formação do perácido, na primeira etapa da reação quimio-enzimática. Observa-se que as conversões aumentaram de 2 para 26% ao usar os ácidos 2- e 4-metilaléico, respectivamente como doadores acila. Salienta-se que ao usar o ácido butanóico e hexanóico, as conversões ao epóxido **33** foram de 49 e 57% respectivamente, conforme descrito no item 4.3.5 (pg.80).

Resultados semelhantes foram relatados por Hollmann e col. ao avaliarem a atividade da CALB nas reações de esterificação do ácido aléico com as metilas nas posições  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - com 1-octanol. Quando foram utilizados os ácidos  $\alpha$ - e  $\beta$ -substituídos, as conversões

aos produtos foram baixas, pois estes substituintes dificultam a ligação adequada do substrato (doador acila) no sítio ativo.<sup>95</sup>

Ao usar os diácidos **(71)**, **(72)**, **(73)** e **(74)** as conversões ao epóxido foram baixas de 4 – 24%. A maior conversão ao produto foi ao utilizar o ácido dodecanodióico **(73)** com 24% (Entradas 4 – 7).

Ao comparar o ácido láurico (**Figura 39**, pg.81) com o diácido correspondente **(73)**, é possível observar uma diferença significativa nos valores de conversão, sendo 47 e 24%, respectivamente. Outro exemplo é o ácido hexanóico (**Figura 39**, pg. 81) que formou o epóxido com conversão de 57%, enquanto o ácido hexanodióico **(71)** apenas 7%. Portanto, conclui-se que para a reação de epoxidação do  $\alpha$ -pineno é preferível utilizar os ácidos com apenas um grupo carboxila.

Para finalizar os estudos de epoxidação do  $\alpha$ -pineno catalisada pela Lipozyme 435, foi avaliada a influência da posição da insaturação nos ácidos. Os 3 ácidos utilizados foram os 2-octenóico **(75)**, 4-pentenóico **(76)** e o oleico **(77)**.

Ao utilizar o ácido 2-octenóico como doador acila a conversão ao epóxido **33** foi a mais baixa, 7%. A maior conversão de 35% foi obtida utilizando o ácido 4-pentenóico (Entradas 8 – 10). O afastamento da ligação dupla do grupo carboxila favoreceu a formação do complexo acil-enzima, novamente salientando a influência dos efeitos estéreos nestas reações.

Ao utilizar o ácido oleico **(77)** como doador acila a conversão ao epóxido foi moderada (22%), pois apesar de possuir a insaturação

distante do grupo carboxila, é um ácido de cadeia alquílica longa, o que pode dificultar a formação do complexo “acil-enzima”.

A partir dos resultados obtidos, verifica-se que é de grande importância o estudo do doador acila, a fim de avaliar e comprovar os efeitos estéreos e eletrônicos na formação do complexo “acil-enzima”, e posterior formação do perácido, necessário para a obtenção do epóxido.

Após todos esses estudos citados acima, elencou-se as melhores condições reacionais para a reação de epoxidação de outros terpenos (serão citadas no próximo item).

#### 4.4 EPOXIDAÇÃO QUIMI-ENZIMÁTICA DE OUTROS TERPENOS

Na epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno foi possível avaliar diversos parâmetros que influenciam na conversão ao epóxido, tais como o tempo, temperatura, doador acila, solvente e diferentes lipases.

Após avaliar os estes parâmetros, foi possível obter uma boa conversão ao epóxido **33** (57%). Sendo assim, foram selecionadas algumas dessas condições reacionais para a epoxidação do 3-careno (**34**),  $\beta$ -pineno (**41**), citronelal (**42**) e do eugenol (**43**).

As reações de epoxidação foram realizadas com o ácido hexanóico como doador acila, diclorometano com solvente, UPH como agente oxidante e a 25°C. O biocatalisador escolhido foi a Lipozyme 435 e o tempo de reação foi de 8h.

Ao utilizar as condições experimentais descritas acima na epoxidação dos terpenos  $\beta$ -pineno (**41**) e eugenol (**43**), não foi verificada a formação dos correspondentes produtos. Este resultado pode ser relacionado com a menor reatividade da ligação dupla C=C terminal. Resultados similares foram obtidos na epoxidação quimio-enzimática do estireno, e alguns derivados, baseado na formação do perácido catalisada pela lipase de *R. miehei*.<sup>26</sup>

Entretanto, ao utilizar o 3-careno (**34**) foi possível obter o correspondente epóxido. A estrutura do 3-careno é semelhante ao  $\alpha$ -pineno e por isso, talvez, tenha sido epoxidado nas mesmas condições reacionais. Após 8h de reação o produto foi obtido com conversão de 46% (**Figura 41**).

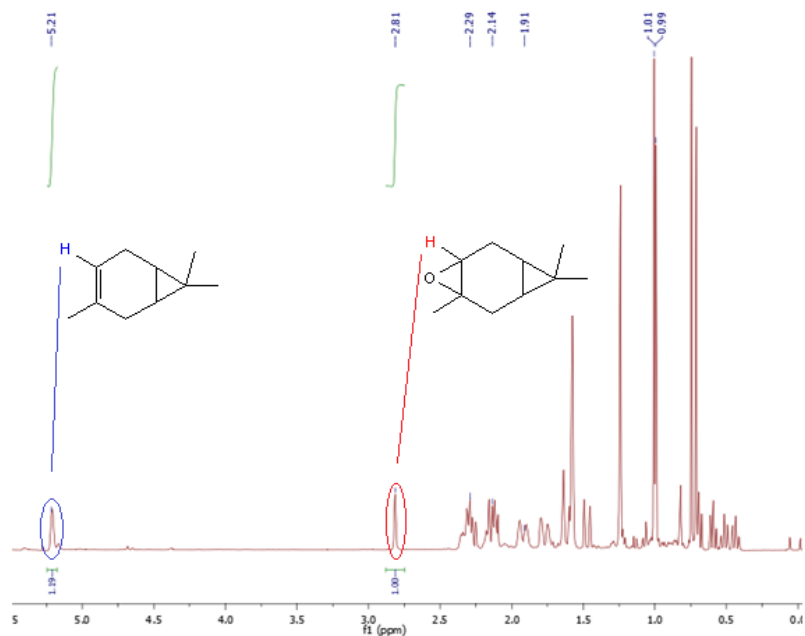


Figura 41– Espectro de RMN 1H (0,0 – 5,5 ppm) de uma alíquota da reação de epoxidação quimio-enzimática do 3-careno catalisada pela Lipozyme 435. (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz).Condições de reação: 3-careno (0,01mol), ácido hexanóico (2mmol), UPH (0,02mol), Lipozyme 435 (50mg); diclorometano (20mL); 25°C, 8h, 300 rpm. Conversão: 46%.

Moreira e col. estudaram a epoxidação do 3-careno catalisada pela CALB e foi obtido o epóxido com conversão >99% em 90min de reação. Porém neste trabalho foi utilizado uma grande quantidade de lipase (200mg) e como doador acila o ácido octanóico em 30°C.<sup>96</sup>

Ao utilizar o citronelal (**42**), o epóxido foi obtido com conversão de 59%. As condições reacionais foram as mesmas da anterior (**Figura 42**).

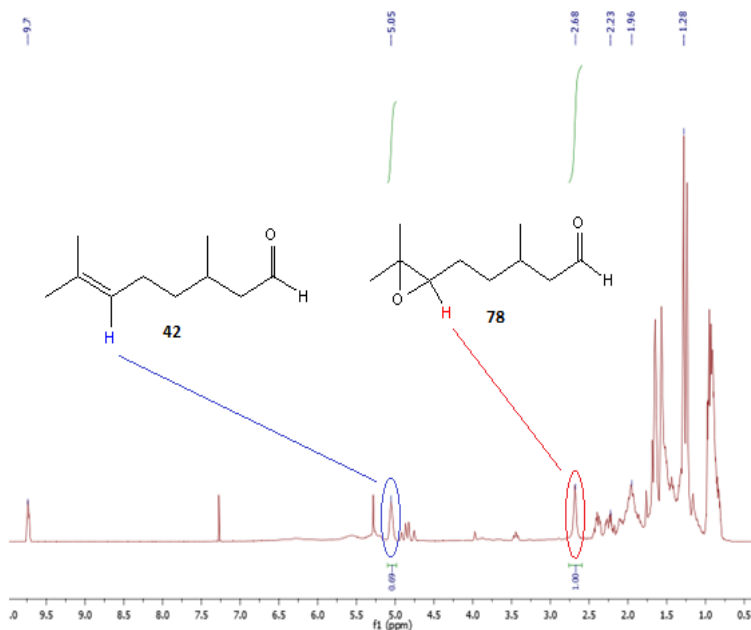


Figura 42- Espectro de RMN 1H (0,0 –10,0 ppm) de uma alíquota da reação de epoxidação quimio-enzimática do citronelal catalisada pela Lipozyme 435. (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz).Condições de reação: citronelal (0,01mol), ácido hexanóico (2mmol), UPH (0,02mol), Lipozyme 435 (50mg); diclorometano (20mL); 25°C, 8h, 300 rpm . Conversão: 59%.

Silva e col. também obtiveram conversões altas na epoxidação quimio-enzimática de um terpeno com estrutura similar, o

citronelol. A reação foi catalisada pela CALB e como doador acila foi utilizado o ácido octanóico a 25°C. O epóxido **51** foi obtido com conversão de 77%.<sup>74</sup>

Estes resultados mostraram que o uso da epoxidação quimio-enzimática, *via* lipase, é uma alternativa viável, e dependendo das condições reacionais os epóxidos podem ser obtidos em boas conversões.

No próximo estudo, foi utilizada a lipase de *A. niger* que, conforme já citado (item 4.1.1, pg. 65), foi um biocatalisador eficiente na formação do perácido, e posterior formação do epóxido.

#### 4.5 EPOXIDAÇÃO QUIMIO-ENZIMÁTICA DO $\alpha$ -PINENO COM A LIPASE DE *A. niger*

É muito importante dentro da biocatálise explorar outros biocatalisadores além dos comerciais. Assim, escolheu-se a lipase de *A. niger* para a epoxidação do  $\alpha$ -pineno.

Esta lipase foi usada, com boa eficiência em outras reações.<sup>22, 23, 84, 97</sup> Carvalho e col. estudaram a esterificação enantiosseletiva do (*R,S*)-ibuprofeno com *n*-propanol catalisada pela lipase de *A. niger*, sendo que foi obtido preferencialmente o *R*-éster ( $ee_p=25$  e  $c=19,8\%$ ).<sup>22,23</sup> Mais tarde, Pilissão e col. utilizaram a lipase de *A.niger* na forma livre como biocatalisador da acilação enantiosseletiva da (*R,S*)-*sec*-butilamina. A (*R*)-amida foi obtida com conversão de 41% em 1h de reação ( $ee_p= 89\%$ ).<sup>97</sup>

Para iniciar os estudos com esta lipase, na sua forma livre, avaliou-se a influência do tempo, na epoxidação do  $\alpha$ -pineno. Neste

estudo as reações foram realizadas em 8, 24, 30 e 40h. Os valores de conversão ao produto estão representados na **Figura 43**.

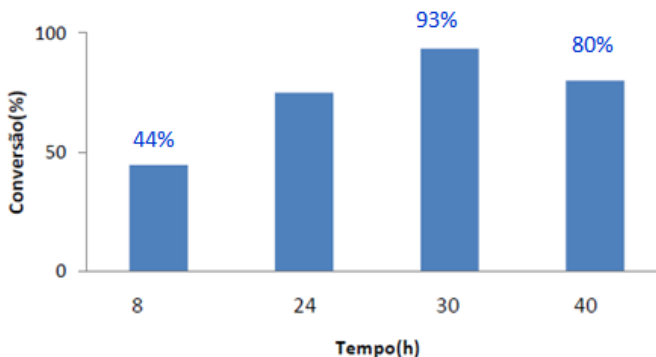


Figura 43– Influência do tempo na epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno. Condições de reação:  $\alpha$ -pineno (0,01mol), ácido hexanóico (2mmol), UPH (0,02mol), lipase de *A. niger* (50mg); diclorometano (20mL); 25°C, 8 - 40h, 300 rpm .

Observa-se que com o aumento do tempo houve um aumento significativo na conversão ao epóxido. Em 8h de reação, a conversão foi de 44% e em 30h aumentou para 93%. Porém em 40h, a conversão diminuiu para 80%. Este resultado se deve provavelmente ao fato da enzima ficar muito tempo em contato com a UPH, e possivelmente tenha desnaturado e/ou tenha ocorrido a decomposição do agente oxidante. Deve-se considerar que a reação poderá ser feita em tempos maiores, para assegurar estes resultados.

A lipase usada foi doada na forma livre, e após a reação não foi possível separá-la da UPH, e fazer estudos da reutilização.



Por isso, é importante imobilizar a enzima. Além do manuseio ser mais conveniente, espera-se um aumento significativo da estabilidade para o uso em altas temperaturas e em solventes orgânicos, a recuperação a partir do meio reacional, bem como a reutilização.<sup>10</sup>

Sendo assim o próximo estudo descreve o uso da lipase de *A. niger* imobilizada em gel de ágar e em bucha vegetal. Os sistemas (suporte/ biocatalisador) foram preparados conforme item 3.5.1 e 3.5.2, pg. 61-62.

Neste primeiro estudo, avaliou-se a influência da massa de *A.niger* (30-70mg) imobilizada em gel de ágar.

Este suporte foi escolhido, pois já foi utilizado para imobilizar outras lipases (F-AP15, PS Amano, AK Amano 20,entre outras), e estes sistemas usados na epoxidação do  $\beta$ -cariofileno.<sup>35</sup>

Os resultados de conversão ao epóxido **33** estão representados na **Figura 44**.

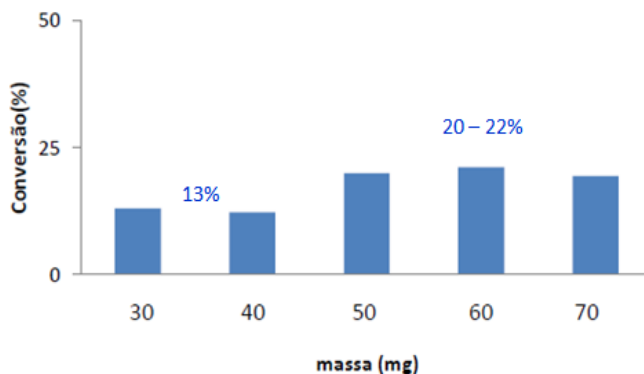


Figura 44– Influência da massa da lipase de *A. niger* imobilizada em gel de ágar na epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno. Condições de reação:  $\alpha$ -pineno (0,01mol), ácido hexanóico (2mmol), UPH (0,02mol), lipase (30 - 70mg/g ágar); diclorometano (20mL); 25°C, 8h, 300 rpm.

Ao utilizar 30mg de lipase a conversão ao epóxido **33** foi de 13% e ao utilizar 60mg de lipase foi 21%. Ao utilizar as massas 50 - 70mg não houve uma mudança significativa de conversão ao epóxido, sendo de 20 - 22%.

Estes valores de conversões são baixos, visto que ao utilizar 50mg de *A.niger* na sua forma livre obteve-se o epóxido com conversão de 44%, enquanto que imobilizada foi apenas 20%.

Resultados semelhantes foram obtidos na epoxidação do  $\beta$ -cariofileno catalisado por diferentes lipases imobilizadas em gel de ágar. Neste estudo, as conversões ao epóxido foram de 2 a 15%, muito menores quando comparado com a lipase na forma livre, 3 a 25%.<sup>35</sup>

Nestes casos não houve melhora na conversão do epóxido ao imobilizar a enzima e isso se deve, provavelmente, ao fato que após imobilização o catalisador pode não assumir as modificações estruturais adequadas que favoreçam o encaixe adequado do substrato no sítio ativo. Além disso, o suporte possui muita água, e devido a menor solubilidade do substrato neste meio, a reação não é favorável.

Uma das vantagens de imobilizar a enzima citado na literatura é a capacidade de reutilizar o biocatalisador. Assim, os suportes contendo as diferentes massas de lipase foram reutilizadas nesta reação. Porém não foi verificada a formação do epóxido **33**.

Foi possível observar uma mudança no aspecto macroscópico do gel de ágar após sua utilização, sendo verificada certa dissolução, o que deve ter afetado a atividade da enzima (**Figura 45**).

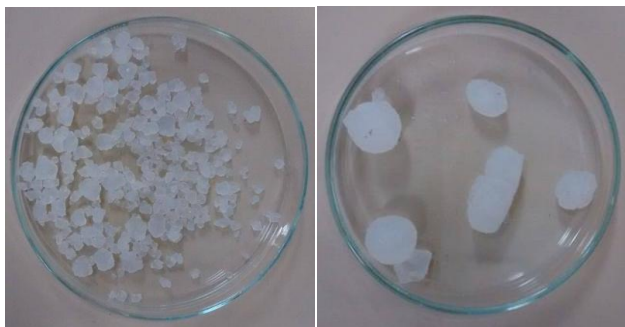


Figura 45– Aparência do gel de ágar antes e após a reação de epoxidação do  $\alpha$ -pineno.

Com o objetivo de aumentar os valores de conversão e reutilizar o biocatalisador, a lipase de *A. niger* foi imobilizada em bucha vegetal. Neste suporte a imobilização é por adsorção, mas durante a reação pode ocorrer a dessorção da enzima.

Recentemente, diversas lipases foram imobilizadas em bucha vegetal (BV) e estes sistemas usados como biocatalisador na preparação do octanoato de *n*-pentila (**24**) com boas conversões.<sup>36, 88</sup>

Foram utilizadas de 30 a 70mg de lipase imobilizada em bucha vegetal. Os resultados de conversão a epóxido **33** estão apresentados na **Figura 46**.

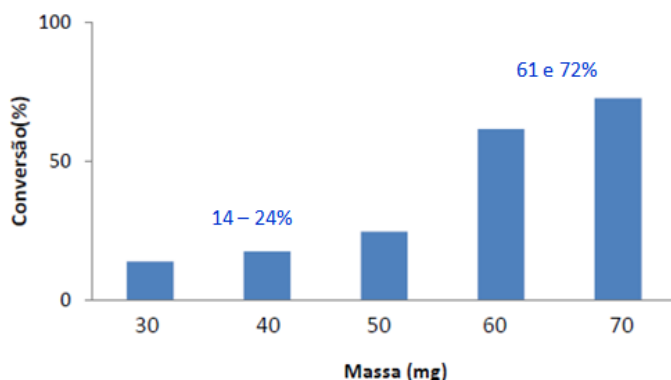


Figura 46– Influência da massa da lipase de *A. niger* imobilizada em bucha vegetal na epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno. Condições de reação:  $\alpha$ -pineno (0,01mol), ácido hexanóico (2mmol), UPH (0,02mol), lipase (30 - 70mg); diclorometano (20mL); 25°C, 8h, 300 rpm .

Ao utilizar as massas 30-50mg a conversão ao epóxido **33** foi baixa variando de 14% a 24%. Porém ao aumentar a massa da lipase

para 60 e 70mg a conversão ao epóxido aumentou significativamente, sendo de 61 e 72%, respectivamente. Ou seja, quanto maior a massa de lipase maior é a quantidade dela presa ao suporte e maior a conversão ao produto.

Ao utilizar 50mg da lipase na sua forma livre a conversão ao epóxido foi maior (44%) ao comparar com ela imobilizada em bucha vegetal (24%). Porém este valor pôde ser aumentado ao utilizar massas maiores de lipase.

Os suportes contendo as diferentes massas de lipase foram reutilizados nesta reação. Porém não foi verificada a formação do epóxido **33**. Foi possível observar após as reações, que o aspecto macroscópico do suporte estava diferente, podendo desta forma também ter ocorrido a lixiviação da enzima (**Figura 47**).

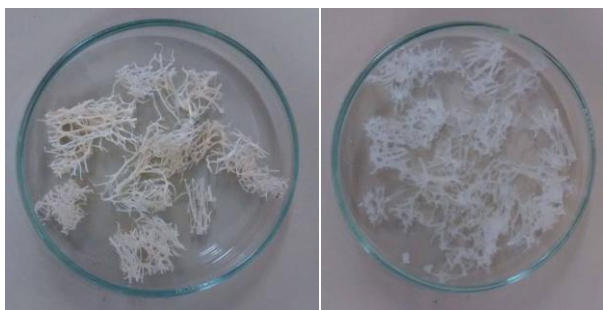


Figura 47 – Aparência da bucha vegetal antes e depois da reação de epoxidação do  $\alpha$ -pineno.

Salienta-se que o método de adsorção é rápido e fácil de ser realizado. Porém, como as interações não são fortes, pode ocorrer a

dessorção do biocatalisador para o meio reacional causando a inativação.

Avaliou-se a seguir, o uso do acetato de etila como solvente nesta reação. Foi usado 50mg de lipase livre e imobilizada na bucha vegetal e em gel de ágar. Os dados de conversão ao epóxido **33** estão apresentados na **Tabela 14**.

Tabela 14– Valores de conversão ao epóxido do  $\alpha$ -pineno catalisada pela lipase de *A. niger* livre e imobilizada.

Conversão (%) <sup>a</sup>		
Livre	gel ágar	bucha vegetal
44 <sup>b</sup> ; 92 <sup>c</sup>	20 <sup>b</sup> ; 17 <sup>c</sup>	24 <sup>b</sup> ; 73 <sup>c</sup>

Condições de reação:  $\alpha$ -pineno (0,01mol), ácido hexanóico (2mmol), UPH (0,02mol), lipase 50mg; solvente (20mL); 25°C, 8h, 300 rpm. (a) Determinado por RMN <sup>1</sup>H; (b) diclorometano; (c) acetato de etila

O acetato de etila além de ser o solvente da reação, pode atuar como doador acila. Na reação com a lipase imobilizada em gel de ágar as conversões ao epóxido foram baixas, inclusive com o uso de acetato de (16,6%). Como citado, este suporte possui uma grande quantidade de água e isso interfere na difusão do substrato.

Ao utilizar o biocatalisador na sua forma livre houve um aumento significativo ao mudar o solvente, sendo de 44% em diclorometano e 92% em acetato de etila.

A influência do solvente foi maior com a lipase de *A.niger* imobilizada em bucha vegetal. Ao utilizar o diclorometano a conversão ao epóxido **33** foi de 24%, e de 73% ao utilizar o acetato de etila. Essa diferença é explicada pelo fato que a bucha vegetal é um material poroso e a adsorção da enzima ocorre na superfície do suporte, tendo assim bastante contato com o solvente.

Os resultados aqui relatos demonstram a importância da escolha do suporte para cada reação. Para a epoxidação do  $\alpha$ -pineno suporte mais adequado foi a bucha vegetal.

Além disso, vale ressaltar a principal vantagem de imobilizar uma enzima, que é a possibilidade de reuso. Porém, não foi possível reutilizar os suportes.

Em resumo, os dados reportados neste trabalho para a epoxidação do  $\alpha$ -pineno e de outros terpenos, mostram que diversos parâmetros reacionais são importantes e devem ser analisados cuidadosamente. Entre eles citam-se o meio reacional, o doador acila, bem como a escolha de um suporte resistente ao meio reacional.

Como vantagem da metodologia enzimática, destaca-se que as reações em geral, são feitas em condições brandas, e os epóxidos são compostos de interesse na química orgânica.

## 5 CONCLUSÕES

As reações de epoxidação quimio-enzimática do  $\alpha$ -pineno (**32**) foram realizadas variando algumas condições reacionais tais como a fonte do biocatalisador, tempo, temperatura da reação, doador acila e o meio orgânico. Após avaliação das melhores condições, fez-se a epoxidação do 3-careno (**34**),  $\beta$ -pineno (**41**), citronelal (**42**) e eugenol (**43**).

Para a obtenção do epóxido (**33**), deve-se considerar que:

- A Lipozyme 435, CALB e a lipase de *A. niger* foram os biocatalisadores mais eficientes, formando o epóxido (**33**) com conversões de 57, 75 e 44 %, respectivamente;
- Utilizando a Lipozyme 435 como biocatalisador, a conversão total ao epóxido foi em 30h de reação (>99%). O tempo de 8h foi selecionado para os estudos futuros;
- Ao utilizar 20-100mg de Lipozyme 435, a maior conversão ao epóxido (**33**) foi obtida com 90mg (93%);
- Na faixa de temperatura de 30-45<sup>0</sup>C não houve uma variação significativa na conversão ao epóxido, sendo de 63-71%;
- Os melhores solventes orgânicos foram acetato de etila, diclorometano e *t*-butanol sendo que o epóxido (**33**) foi obtido com conversões de >99, 57 e 50%, respectivamente;
- Ao utilizar misturas de solventes orgânicos e LIs não foi possível obter o epóxido (**33**), salientado a importância do meio reacional nesta reação;
- O ácido hexanóico foi o doador acila mais eficiente (57%);



- Ao utilizar a lipase de *A.niger* imobilizada em gel de ágar, o epóxido (**33**) foi obtido valores de conversão baixos (12 a 22%);
- Ao utilizar a lipase *A.niger* imobilizada em bucha vegetal, o epóxido (**33**) foi obtido com conversões 13 a 72%;
- Não foi possível reutilizar as lipases imobilizadas;
- Ao utilizar as melhores condições experimentais para a epoxidação do  $\alpha$ -pineno (Lipozyme 435, ácido hexanóico, diclorometano, UPH, 25°C em 8h), obteve-se o epóxido do 3-careno e do citronelal com conversões de 44 e 59%, respectivamente.

A partir destes resultados, verifica-se a grande importância da otimização das condições reacionais em sistemas biocatalíticos. As reações de epoxidação quimio-enzimática mostraram fortemente influenciadas por diversos fatores, com destaque para a fonte do biocatalisador, doador acila e o meio orgânico.

Deve-se destacar também que os epóxidos podem ser obtidos em condições brandas de reação e que estes são intermediários úteis na química orgânica, para a obtenção, por exemplo, de dióis e amino alcoóis.

## 6 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos, tem-se como perspectivas:

- Otimizar outras condições reacionais, tais como o uso de diferentes lipase ou doadores acilas para a epoxidação quimio-enzimática dos terpenos,  $\beta$ -pineno e eugenol.
- Utilizar diferentes tipos de agitação, como orbital, magnético e Dubnoff, na epoxidação do  $\alpha$ -pineno catalisada pela lipase de *A. niger* imobilizada visando não danificar os suportes;
- Variar algumas condições reacionais, tais como lipase, doador acila ou solvente na epoxidação quimio-enzimática do 3-careno e do citronelal, com o objetivo de aumentar a conversão aos correspondentes epóxidos.

## 7 REFERÊNCIAS

1. Santos E. N.; Lago, R. M.; *Quim. Nova*, 30,6, 1480-1483, 2007.
2. Van Arnum S. D.; *J. Chem. Educ.*, 82, 11, 1689-1692, 2005.
3. (a) De Conti R. M.; Porto A.L.M.; Rodrigues J. A.; Moran P.J.S.; Manfio G.P.; Marsaioli A.J. *J. Mol. Catal. B:Enzym.* 11, 4-6, 233-236, 2001. (b) Hwang S.;Choi C.Y.; Lee E.Y. *J.Ind.Eng.Chem.* 16, 1-6, 2010.
4. Nelson, D. L.; Cox, M. M.; Lehninger: Principles of Biochemistry, 4th Ed. USA, W. H Freeman, 2004.
5. Campbell M. K., Farrel S. O., *Bioquímica, Orlando: Thomson, Combo*, 3ª Ed. 2007.
6. Cabral J. M. S.; Aires-Barros M. R.; Gama M.; Engenharia Enzimática, Ed. Lidel – Edições Técnicas, Ltda., 2003.
7. Aouf C.; Durant E.; Lecont J.; Figueira-Espinoza M.C.; Dubreucq E.; Fulcrand H.; Villeneuve P. *Green Chem*, 2014.
8. Piovan L.; Kagohara E.; Ricci L. C.; Keppler A. F.; Capelari M.; Andrade L. H.; Comasseto J. V.; Porto A. L. M. *Tetrahedron: Asymm.* 19, 2385-2389, 2008.
9. Wohlgemuth R., *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 713-724, 2010.
10. Faber K., Biotransformations in Organic Chemistry Berlin: Springer, 1-116, 3ª Ed., 1997.
11. Cherif S.; Fendri A.; Miled N.; Trabelsi H.; Mejdoub H.; Gargouri Y. *Biochemie* 89, 1012-1018, 2007.
12. (a)Haki G. D.; Rakshit, S. K. *Bioresour. Technol.*, 89, 17-34, 2003. (b) Woolley P.; Petersen S.B.; Lipases, their Structure, Biochemistry and Application. Ed.Cambridge, 1994.

13. (a) Tufvesson P. Lipase catalysed synthesis of speciality chemicals. Dissertation, Lund University, Sweden, 2008. (b) Kapoor M., Gupta M.N. *Proc. Biochem.* 47, 555-569, 2012.
14. Lopez-Serrano P.; Cao L.; van Rantwijk F.; Sheldon R.A. *Biotechnol Lett* 24, 1379–1383, 2002.
15. Hobbs H.R.; Kondor B.; Stephenson P.; Sheldon R.A.; Thomas N.R., Poliakoff M. *Green Chem*, 8, 9, 816–821, 2006.
16. Kirk, O.; Christensen, M. *Org. Process Res. Dev*, 6, 4, 446-451, 2002.
17. Uppenberg, J.; Hansen, M.; Patkar, S.; Jones, T. *Structure* 2, 4, 293-308, 1994.
18. Pleiss, J.; Fischer, M.; Schmid, R.. *Chem. Phys. Lipids*, 93, 1-2, 67-80, 1998.
19. Anderson, E.; Karin, M.; Kirk, O.. *Biocatal. Biotransform.* 16, 3, 181-204, 1998.
20. Silva J.C.; Nascimento M.G. *J. Braz. Chem. Soc.* 27, 12, 2016.
21. Rocha L.C.; Rosset I.G.; Luiz R.F.; Raminelli C.; *Tetrahedron Asymmetry* 21:926–9, 2010.
22. Carvalho P.O.; Calafatti A.S.; Marassi M.; Silva D.M.; Contesini F.J.; Bizaco R.; Macedo G.A. *Quim. Nova*, 28, 4, 614–621, 2005.
23. Carvalho P.O.; Contesini F.J.; Ikegaki M. *Braz J. Microbiol.* 37, 329–337, 2006
24. Sheldon R.A. *Adv. Synth. Catal.* 349:1289–1307, 2007.
25. Turner, N.; Vulfson, E. *Enz. Microb. Technol.* 27, 1-2, 108-113, 2000.
26. Mendez-Sanchez D.; Ríos-Lombardía N.; Gotor V.; Gotor-Fernandez V. *Tetrahedron*, 70, 1144 - 1148, 2014.

27. Mateo C.; Palomo J.M.; Fernandez-Lorente G.; Guisan G.M.; Fernandez-Lafuente R. *Enz. Microb. Technol.* 40, 1451–1463, 2007.
28. Christensen M. W.; Andersen L., Husum T. L; Kirk, Eur O.. *J. Lipid Sci. Technol.*, 105, 318–321, 2003.
29. (a) Sheldon R.A. *Adv. Synth. Catal.*, 349, 1289 – 1307, 2007.(b) Sheldon, R.A.; van Pelt, S.; *Chem. Soc. Rev.*42, 6223, 2013. (c) Milner, S. E.; Maquire, A. R.; *ARKIVOC* 2012, i, 321; Franssen, M. C. R.; Steunenbergh, P.; Scott, E. L.; Zuilhof, H.; Sanders, S. M. P. *Chem. Soc. Rev.* 42, 6491, 2013.
30. Cabral J. M. S.; Kennedy J. F.; in: *Thermostability of Enzymes*, (Ed.: M. N. Gupta), Springer Verlag, Berlin, 163– 179, 1993.
31. Sorgedragger M.J.; Verdoes D.; Van der Meer H.; Sheldon R.A. *Chimica Oggi/Chemistry Today.* 26, 23–25, 2008.
32. Van Langen L.M., Selassa R.P., Van Rantwijk F.; Sheldon R.A. *Org Lett*, 7, 327– 329, 2005.
33. Zanette A.F.; Zampakidi I.; Sotiroudis G.T.; Zoumpantioti M.; Leal I.; Souza R., et al. *J Mol Catal B: Enzym*, 107:89–94, 2014.
34. Krajewska B., *Enz. Microb. Technol.*, 35, 126 –139, 2004.
35. Silva J.M.R.; Nascimento M.G. *Quím. Nova*, 37, 6, 2014.
36. Alves, M.M. Imobilização de lipases em Bucha vegetal: preparação de éteres de aroma. [Florianópolis]; UFSC; 2015.
37. Brady D.; Jordaan J., *Biotechnol. Lett.* 31, 1639–1650, 2009.
38. Saeed A.; Iqbal M.; *Biotechnol. Prog.*29, 573–600, 2013.
39. Partap S.; Kumar A.; Sharma N.K.; Jha K.K.; *J Nat Prod Resour* 1, 2, 127-34, 2012.

40. Silva M.W.K.; Ranil R.H.G.; Fonseka R. *Trop Agric Res.*; 23, 2, 186-91,2012.
41. Google Imagens. Disponível em [www.google.com.br/imghp?hl=pt-PT](http://www.google.com.br/imghp?hl=pt-PT). Acesso em: 05 de junho de 2017.
42. Siqueira G.; J. Bras, A., *Bioresources*, 5, 727–740, 2010.
43. D’Almeida A.L.F.S.; Calado V.; Barreto D.W.; D’Almeida. *Ciência Tecnol.* 15, 59–62, 2005.
44. Staudinger H., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 53, 1073 – 1085, 1920.
45. Klemm D.; Heublein B.; Fink H.-P.; Bohn- Angew A. *Chem. Int.* 44, 3358 – 3393, 2005.
46. Schoenbein C. F., *Ber. Naturforsch. Ges. Basel*, 7, 27, 1847.
47. Balsler K.; Hoppe L.; Eichler T.; Wendel M.; Astheimer A.J.; Weinheim V.C.H *Pharmazie.* 419 – 459, 1986.
48. Martinez A. J.; Manolache S.; Gonzalez V.; Young R. A.; Denes F. J.; *J. Biomater. Sci. Polym.* 11, 415 – 438, 2000.
49. Kauffmann C.; Shoseyov O.; Shpigel E.; Bayer E. A.; Lamed R.; Shoham Y.; Mandelbaum R. T.; *Environ. Sci. Technol.* 34,1292 – 1296, 2000.
50. Armisen R.. *J. Appl. Phycol., Nat Prod Resour.*, 7, 231–243, 1995.
51. Mulagalapalli S. et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 142, 3, 291–297, 2007.
52. Slayden S. W.; Liebman, J. F.; Sawaki, Y; Wiley J.; *The Chemistry of Hydroxyl, Ether and Peroxide Groups.* ED. Patai, S., Chichester: J. Wiley; 103-133, 587-656, 1993.
53. Holleben A. L. A.; Schuch, C. M.. *Quim.Nova.* 20, 1, 58-71, 1997.

54. Matsumoto, K.; Katsuki T.; Arends I. W. C. E. *de Vries, J. G.* , 1, 69-121, 2011.
55. Urlacher, V. B.; Girhard, M. *Trends Biotechnol.*, 30, 26-36, 2012.
56. Björkling F., Godtfredsen S. E.; Kirk O.; *J. Chem. Soc, Chem. Commun.*, 1301-1303, 1990.
57. Wiermans L.; Hofzumahaus S.; Schotten C.; Weigand L.; Schallmeyer A.; Domínguez de María, P. *Chem-Cat.Chem*, 5, 3719-3724, 2013.
58. Yin D.; Purpero, V. M.; Fujii, R.; Jing, Q.;Kazlauskas, R. J. *Chem.Eur. J.* 19, 3037-3046, 2013.
59. Björkling F.; Frykman H.; Godtfredsen S.E.; Kirk O.; *Tetrahedron*, 48, 22, 4587–4592, 1992.
60. Björkling, F.; Godtfredsen S. E.; Kirk, O.; *Trends Biotechnol.*, 9, 360-363, 1991.
61. Skouridou V.; Stamatis H.; Kolisis F. N. *Biocatal. Biotrans.*, 21, 6, 85-290, 2003.
62. Klaas M.R.; Warwel S.; *Org. Lett.*, 1, 7,1025-102, 1999.
63. Da Silva J.M.R.; Bitencourt T.B; Moreira M.A.; Nascimento M.G. *J Mol Catal B: Enzym* 95:48–54, 2013.
64. Gan L.H.; Ooi K.S.; Goh S.H.; Gan L.M.; Leong Y.C.; *Eur. Polym. J.* 31, 719–724,1995.
65. Hill K.; *Pure Appl. Chem.* 72, 1255–1264, 2000.
66. Rahman M.; Brazel C.S.; *Prog. Polym. Sci.* 29, 1223–1248, 2004.
67. Formo M.W.; Oils-Fats-Lipids 1995, Proceedings of the 21st World Congress of the International Society of Fat Research (ISF), The Hague (P.J. Barnes & Associates, eds.), 519-527, 1995.

68. Sell, C.S. *A Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry*. Quest International, Ashford, Kent, UK, 2003.
69. Schwab W.; Fuchs C.; Huang F.C.; *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 115, 3–8, 2013.
70. Corma A.; Iborra S.; Velty A., *Chem. Rev.* 107, 2411–2502, 2007.
71. Metzger J.O.; Bornscheuer U.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 13–22, 2006.
72. Monteiro J.L.F.; Veloso C., *Top. Catal.* 27, 169–180, 2004.
73. Schörken U.; Kempers P.; *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 111, 627–645, 2009.
74. Silva J.M.R.; Nascimento M.G. *Proc. Biochem.* 47, 517–22, 2012.
75. (a) Hara P.; Mikkola J.P.; Murzin D.Y.; Kanerva L.T.; *J.Mol. Catal. B – Enz.* 67, 129–134, 2010. (b) Rantwijk F.; Sheldon R.A. *Chem. Rev.* 107, 2757–2785, 2007. (c) Moniruzzaman M.; Nakashima K.; Kamiya N.; Goto M. *Biochem. Engin. J.* 48, 295–314, 2010.
76. Walden P., *Bull. Russ. Acad. Sci.*, 405, 1914.
77. Plechkova N. V.; Seddon K. R., *Chem. Soc. Rev.*, 37, 123, 2008.
78. Smiglak M.; Reichert W.M.; Holbrey J. D.; Wilkes J. S.; Sun L.; Thrasher J. T.; Kirichenko K.; Singh S.; Katritzky A. R.; Rogers R.D.; *Chem. Commun.*, 2554, 2006.
79. Liu Q.; Janssen M. H. A.; Van Rantwijk F.; Sheldon R. A., *Green Chem.*, 7, 39, 2005.
80. Rogers D.; Seddon K. R., *ACS Symp.* 818, 17, 2002.
81. Wasserscheid P.; Welton T.; *Ionic liquids in Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
82. Davis J. H., *Chem. Lett.*, 33, 1072, 2004.



83. Kotlewska A. J.; van Rantwijk F.; Sheldon R. A.; Arends I. W. C. E. *Green Chem*, 13, 2154, 2011.
84. Pilissão C., Carvalho O.P., Nascimento M.G. *J.Braz. Chem. Soc.* 21, 973-977, 2010.
85. Ficha técnica. Disponível em [www.novozym.com](http://www.novozym.com). Acesso em 26 de junho de 2017.
86. Maki, T.; Takeda,K., *In Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, 2000.
87. Williams D.H.; Fleming I. *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*. 4<sup>o</sup>Ed, 1987.
88. Nascimento M.G., da Silva J.M.R., da Silva J.C.; Alves M.M. *J. Mol. Catal. B Enzym.*;112, 1-8,2015.
89. (a) Li H-H., He Y-H., Guan Z., *Catal. Comm.*12, 580-582, 2011. (b)Lou W.Y.. Zhang Y.Y., Zong M.H., Wu., *Enzyme Microb. Technol.* 35, 190-6, 2004.
90. (a) Laane C., Boeren S., Vos K., Veeger C., *Biotechnol. Bioeng.* 30, 81-7, 1987. (b) Villeneuve P., *Biotechnol. Adv.* 25, 515-36, 2007.
91. Giunda D.; Masia M.P.; Marhetti M.; Marrone R.; Salina M. *Tetr. Lett.* 5122-5125, 2013.
92. (a)Silva W.S.D., Lapis A.A.M., Suarez P.A.Z., Neto B.A.D., *J.Mol. Catal. B:Enzym.* 68, 98-103, 2011.
93. Bitencourt T.B.; Nascimento M.G. *Green Chem.*11, 209-214, 2009.
94. Clayden J., *Organic Chemistry Oxford: Oxford University Press*, 2001.
95. Hollmann F., Grzebyk P., Heinrichs V., Doderer K. Thum O. *J. Mol. Catal. B:Enzym.* 57, 257-61, 2009.

96. Moreira M.A.; Nascimento M.G. *Cat.Com.* 8, 2049-2053, 2007.
97. Pilissão C., Carvalho O.P., Nascimento M.G. *J.Braz. Chem., Soc.*9, 1688-1697, 2012. Carvalho