

Paulo Alexandre Durant Moraes

**EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DO TERPINEOL,
HIMECROMONA E DERIVADOS**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do Grau de Mestre em
Química

Área de concentração: Química
Orgânica

Orientador: Prof^ª. Dr^a Maria da
Graça Nascimento

Coorientador: Prof. Dr. Marcus
César Mandolesi Sá

Florianópolis
2018

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

Moraes, Paulo Alexandre Durant
Epoxidação químio-enzimática do terpineol,
himecromona e derivados / Paulo Alexandre Durant
Moraes ; orientadora, Maria da Graça Nascimento,
coorientador, Marcus César Mandolesi Sá, 2018.
101 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e
Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

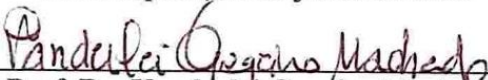
1. Química. 2. Biocatálise. 3. Lipase. 4.
Epoxidação. 5. Terpineol. I. Nascimento, Maria da
Graça. II. Sá, Marcus César Mandolesi. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Química. IV. Título.

PAULO ALEXANDRE DURANT MORAES

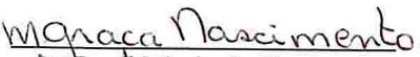
**EPOXIDAÇÃO QUÍMIO-ENZIMÁTICA DO TERPINEOL,
HIMECROMONA E DERIVADOS**

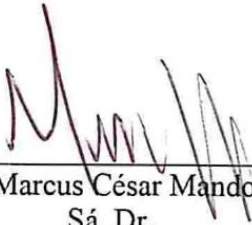
Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Química” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 20 de junho de 2018

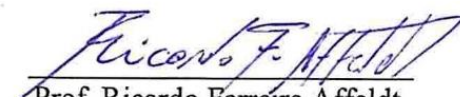

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado
Coordenador do Curso

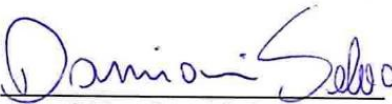
Banca Examinadora:


Prof.^a Maria da Graça
Nascimento, Dr.^a
Orientadora – UFSC


Prof. Marcus César Mandolesi
Sá, Dr.
Coorientador – UFSC


Prof. Miguel Soriano Balparda
Caro, Dr.
Titular – UFSC


Prof. Ricardo Ferreira Affeldt,
Dr.
Suplente – UFSC


Prof. Damiani Sebrão, Dr.
Relator – UDESC

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Capes, CNPq, INCT-Catálise e UFSC por disponibilizar a bolsa de estudos enquanto aluno e por fornecer as condições necessárias para elaboração deste trabalho. Após assumir a função de técnico, agradeço aos facilitadores, nomeadamente, os professores do Departamento de Química Luiz A. S. Madureira, Valdir R. Correia, Josiel B. Domingos e Fábio Z. Galetto, que sendo (ex)-chefes de departamento no período e supervisores de laboratório, permitiram que eu continuasse, sem impedimentos, com a pesquisa e pudesse dar sequência às atividades realizadas.

Na mesma linha, ao Prof. Vanderlei G. Machado e aos membros do colegiado do Programa de Pós-Graduação em Química, pela empatia com a situação e serem solícitos aos pedidos de prorrogação, cujo motivo foi supracitado.

Também sobre a função de técnico, aos amigos que conheci neste serviço, principalmente ao Glauber R. Lima, pelo bom e (distinto) humor e ao Juliano A. Roehrs, tanto pelas conversas diversas, quanto pela colaboração com algumas análises do CG.

Registrando a [sutil] importância, agradeço aos monitores dedicados ao trabalho, por evitarem que eu perdesse os parafusos com as pequenas incomodações rotineiras. No mesmo aspecto, vitais foram os amigos que fiz através da Atlética da Química, principalmente o Bruno Cavagnoli, Lucas Mattos, Giuliana, Vinicius Haddad e Regilsom.

Agradeço ao Prof. Marcus C. M. Sá, pela apresentação dos desafios interessantes que tentamos resolver e por ter aceito a co-orientação deste projeto. À Prof^a Maria da Graça Nascimento, por não apenas ser orientadora na pesquisa, mas por também contribuir à minha formação profissional e pessoal (e pela paciência e perseverança que superaram as eventualidades nesses anos todos).

Não posso esquecer minha mãe, irmão e tios (as), aos quais zelo e tenho real preocupação. A gratidão estende-se aos entes já falecidos: Eorziza, Gaspar, Janete, Dirce, Rosita, Silvio, e, em especial Alcides, ao qual espero ser digno da memória, honrando seus valores e fazendo jus a tudo que ensinaram.

But still try, for who knows what is possible...

Michael Faraday

RESUMO

Este trabalho relatou estudos da preparação quimio-enzimática dos epóxidos do terpineol e de três compostos cumarínicos, sendo estes, a himecromona e seus derivados de acetilação e eterificação.

Ao longo do trabalho, foram utilizadas lipases (principalmente a Lipozyme 435) como biocatalisadores, sendo empregados como agentes acilantes os ácidos butanoico, hexanoico, octanoico, decanoico ou dodecanoico. Como agente oxidante foi usado o peróxido de hidrogênio na forma de aduto com ureia (ureia-peróxido de hidrogênio, UPH) e em solução aquosa (30 %).

Fez-se a otimização de alguns parâmetros reacionais para preparação do óxido de terpineol, sendo estes a procedência da lipase, testando 14 lipases diferentes, o agente acilante empregado (ácidos butanoico, hexanoico, octanoico, decanoico ou dodecanoico), a sua proporção em relação ao alceno (1:1, 1:2 ou 1:4), o tempo de reação (1 – 24 h) e o solvente orgânico empregado. O correspondente epóxido foi obtido com conversão >99 %, dependendo das condições reacionais. Este resultado foi obtido ao utilizar a Lipozyme 435 e ácido hexanoico em quantidade equimolar, em CH_2Cl_2 por 6 h. Ao substituir este solvente por acetato de etila e manter as outras condições reacionais, obteve-se o epóxido com conversão de 95,2 %. Neste último caso, não é necessário usar o agente acilante.

Não foi possível a preparação dos epóxidos da himecromona e seus derivados, ao se usar condições similares às empregadas para epoxidação do terpineol. Então, outros métodos de epoxidação foram testados, diferente da reação de Prilezhaev, tal como a reação de Weitz-Schaeffer. Porém, os correspondentes epóxidos não foram obtidos.

Portanto, foi observado que um dos fatores mais importantes que influenciam na formação ou não, de epóxidos via quimio-enzimática de alcenos, está relacionado com a estrutura dos substratos.

Palavras-chave: Lipase. Biocatálise. Epoxidação. Terpineol. Himecromona.

ABSTRACT

This work reports the chemo-enzymatic synthesis of epoxides from terpineol and three coumarinic compounds, the last being hymecromone and its acetylation and etherification derivatives.

Throughout this work, lipases (especially Lipozyme 435) were used as biocatalysts, while carboxylic acids (butanoic, hexanoic, octanoic, decanoic or dodecanoic acid) were used as acyl sources. The oxidant agent employed constituted of hydrogen peroxide, both as its urea adduct (urea-hydrogen peroxide, UHP) and as aqueous solution (30 % v/v).

For the preparation of terpineol oxide, some reaction parameters were optimized, being the lipase source (being tested 14 different lipases), the acyl source (all carboxylic acids cited above), their ratio in relation to the alkene (1:1, 1:2 or 1:4), reaction time (1 – 24 h) and organic solvent. The corresponding epoxide was obtained on conversion degrees were not detected or were >99 %.

The best conversion to product (>99 %) was obtained by employing Lipozyme 435, equimolar amounts of terpineol and hexanoic acid, with CH₂Cl₂ as solvent in 6 h of reaction. By changing the halogenated solvent to ethyl acetate and maintaining all other conditions, an excellent conversion of 95,2 % was obtained. Considering the *greenness* between both solvents, the use of ethyl acetate is better, and in this case, no extra acylating agent is required.

It was not possible to prepare epoxides based on hymecromone and its derivatives by employing similar conditions as used for the terpineol epoxidation. Alternative methods, besides the Prilezhaev epoxidation, were then tested such as the Weitz-Schaeffer reaction. However, no product was detected.

Thus, it was observed that the substrate structure is one of the most important parameters that influence in the alkene chemo-enzymatic epoxidation, catalyzed by lipases.

Key-words: Lipase. Biocatalysis. Epoxidation. Terpineol. Hymecromone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Diagrama energético e mecanismo para formação do <i>i</i> -propanol catalisada por ácido.....	23
Figura 02. Exemplos de alguns aminoácidos, na sua forma não-ionizada, encontrados em enzimas e proteínas, classificados de acordo com a cadeia lateral em (a) Polar, não-carregada; (b) Negativamente carregada; (c) Apolar, alifática; (d) Positivamente carregada.....	24
Figura 03. Representação dos diversos níveis estruturais de uma enzima.....	25
Figura 04. Estrutura tridimensional da lipase B de <i>Candida antarctica</i> . Em azul e laranja, estão representadas as α -hélices que mudam a conformação do entorno do sítio-ativo, ilustrado em modelo bolas-e-palitos. (a) conformação "aberta"; (b) conformação "fechada".....	27
Figura 05. Representações dos modelos de sítio-ativo para catálise enzimática.....	27
Figura 06. Estruturas do isopreno e dos terpenos citronelol (26a), linalol (73) e α -terpineol (74).....	41
Figura 07. Estruturas dos isômeros de terpineol nas formas α - (74), β - (75), γ - (76) e 4-hidróxi (77).....	41
Figura 08. Estrutura do 1-benzopirano (80), cumarina (81) e cromona (82).....	42
Figura 09. Espectro de ^1H -RMN do terpineol, como mistura de isômeros 74 – 76, com 65 % de 74.....	60
Figura 10. Espectro de ^1H -RMN do terpineol, sendo 90 % na forma alfa (74).....	61
Figura 11. Representação tridimensional de 74, com detalhe da não-equivalência magnética em hidrogênios metilênicos geminais. 61	
Figura 12. Espectro de ^1H -RMN do produto de reação de 101 com <i>m</i> -CPBA.....	62
Figura 13. Espectro de ^1H -RMN de 101 obtido via epoxidação químio-enzimática de 74.....	63
Figura 14. Exemplo para o cálculo da conversão em 101 utilizando ^1H -RMN de uma reação típica de epoxidação de 74.....	64
Figura 15. Cromatograma de CG-DIC do terpineol na sua mistura de isômeros.....	65

Figura 16. Cromatogramas de CG-DIC de a) terpineol (isômero α , 90 %) e b) Produto de reação quimio-enzimática	65
Figura 17. Espectro de IV do alfa-terpineol (74, 90 %)	66
Figura 18. Espectro de IV do α -terpineol epoxidado (101).....	67
Figura 19. Influência do tempo para a preparação do epóxido do terpineol (101).....	71
Figura 20. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ de 90; na expansão de H7, observa-se em azul a análise do sinal do hidrogênio olefínico por deconvolução global espectral.....	76
Figura 21. Espectro de IV de 90.....	77
Figura 22. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ de 98	78
Figura 23. Espectro de IV de 98.....	79
Figura 24. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ de 99	80
Figura 25. Espectro de IV de 99.....	81
Figura 26. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ da epoxidação via química de 90	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Classificação das enzimas de acordo com a UIBBM	25
Tabela 02. Gêneros de importantes produtores de lipases microbianas	30
Tabela 03. Exemplos de aplicações industriais de lipases.....	30
Tabela 04. Lista de alguns reagentes usados como oxidantes na epoxidação de alcenos.....	34
Tabela 05. Lista de reagentes e solventes empregados neste trabalho.....	49
Tabela 06. Lista de lipases e seus respectivos microrganismos de origem	50
Tabela 07. Dados de caracterização dos compostos cumarínicos e terpênicos, relativos a 74 e 90	57
Tabela 08. Influência da procedência da lipase na epoxidação de 74.....	68
Tabela 09. Conversão do terpineol 74 em seu epóxido 101 em função do agente acilante e usando diferentes proporções em relação a 74. 70	
Tabela 10. Influência do solvente orgânico para a preparação de 101.....	73
Tabela 11. Avaliação para solubilização de 90 em misturas de hexano e co-solventes	83
Tabela 12. Testes de epoxidação quimio-enzimática da himecromona (90).....	84
Tabela 13. Tentativas de epoxidação quimio-enzimática de 98	85

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 01. Hidrólise de derivados da fluoresceína catalisada por esterases modificadas de <i>T. maritima</i>	26
Esquema 02. Preparação do acetato de <i>n</i> -butila utilizando a lipase de <i>E. coli</i>	28
Esquema 03. Hidrólise do butirato de <i>p</i> -nitrofenila catalisada pela cutinase em meio aquoso.....	29
Esquema 04. Preparação do butirato de hexila biocatalisado pela lipase de <i>R. miehei</i> imobilizada em resina aniônica	30
Esquema 05. Preparação dos acetatos de citroneíla (27a) e de geranoíla (27b) catalisada pela lipase de <i>M. miehei</i>	31
Esquema 06. Síntese de oxazolidinonas catalisada pela lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> (PS-IM).....	32
Esquema 07. Inversão da enantiopreferência biocatalítica na resolução de ésteres 2-bromobutíricos	32
Esquema 08. Síntese assimétrica de compostos spiro catalisada pela PPL e CALB	33
Esquema 09. Mecanismo de epoxidação concertada via reação de Prilezhaev	34
Esquema 10. Transformação quimio-enzimática de alcenos alifáticos realizada por Björkling.....	35
Esquema 11. Preparação de diversos epóxidos via quimio-enzimática, utilizando acetato de etila e UPH.....	36
Esquema 12. Preparação "sem solvente" de caprolactonas catalisada pela CALB	37
Esquema 13. Abertura regiosseletiva de epóxidos com nucleófilos fortes e fracos	38
Esquema 14. Semi-síntese do paclitaxel (65) partindo da 10-deacetilbacatina (64).....	40
Esquema 15. Ilustração de algumas etapas retrossintéticas para síntese total da vimblastina (66a).....	40
Esquema 16. Preparação de éteres bicíclicos pela reação de cicloadição utilizando terpineol (74) e aldeídos.....	42
Esquema 17. Proposta mecanística para a síntese da cumarina 81 a partir do aldeído salicílico (83)	43
Esquema 18. Mecanismo via Pechmann para síntese de cumarinas.....	43

Esquema 19. Preparação de larvicidas a partir da himecromona (90).....	44
Esquema 20. (a) Preparação de chalconas via Claisen-Schmidt. (b) Síntese da flavona partindo de hidroxichalcona.....	45
Esquema 21. Preparação do derivado acetilado (98) da himecromona (90)	52
Esquema 22. Preparação do derivado eterificado (99) de himecromona (90).....	53
Esquema 23. Epoxidação quimio-enzimática dos derivados cumarínicos 90, 98 e 99.....	53
Esquema 24. Preparação via química do epóxido do terpineol (101).....	55
Esquema 25. Epoxidação quimio-enzimática do α -terpineol (74) ..	56
Esquema 26. Epoxidação quimio-enzimática de 74 em diferentes condições reacionais.....	68
Esquema 27. Tentativa de epoxidação quimio-enzimática de 90 utilizando solventes orgânicos polares.....	83
Esquema 28. Tentativa de epoxidação via quimio-enzimática de 98.....	85
Esquema 29. Proposta mecanística da epoxidação de 98 via Weitz-Scheffer	86
Esquema 30. Tentativa de epoxidação quimio-enzimática de 98 via reação de Weitz-Scheffer	86
Esquema 33. Oxidação de 90 e 99 utilizando DMDO	87

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α : alfa

β : beta

δ : delta

$^1\text{H-RMN}$: espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio

Ac: acetil

Achymc: 7-acetilumbeliferona

CALB: lipase B de *Candida antarctica*

ccd: cromatografia em camada delgada

CG-DIC: cromatografia gasosa com detector de ionização por chama

DEE: éter dietílico

DMDO: dimetildioxirano

DMF: *N, N*-dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

Et: etil

hymc: himecromona

Hz: Hertz

IV: espectroscopia no infravermelho

m-CPBA: ácido *m*-cloroperbenzoico

Me: metil

MeCN: acetonitrila

Mehymc: 7-metoxiumbeliferona

MTBE: éter *t*-butilmetílico

PPL: lipase do pâncreas de porco

ppm: partes por milhão

$\text{S}_{\text{N}}1$: substituição nucleofílica unimolecular

$\text{S}_{\text{N}}2$: substituição nucleofílica bimolecular

terpOH: α -terpineol

TMS: tetrametilsilano

UPH: aduto de ureia-peróxido de hidrogênio

Abreviaturas usadas para descrição das bandas na espectroscopia de infravermelho

f: fraco

F: forte

ip: no plano

l: largo

m: médio

oop: fora do plano

s: estreito

sm: simétrico

asm: assimétrico

Abreviaturas usadas para descrição dos picos na espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton

d: duplete

dd: duplo duplete

m: multiplete

q: quarteto

s: simpleto

t: tripleto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Catálise: enzimas	23
2.1.1 Lipases	29
2.2 Epóxidos	33
2.2.1 Métodos de obtenção e aplicações	33
2.3 Produtos naturais, terpenos e cumarinas	39
3. OBJETIVOS	46
3.1 Objetivo geral	46
3.2 Objetivos específicos	46
3.2.1 Estudos com o terpineol	46
3.2.2 Estudos com os derivados cumarínicos	46
4. METODOLOGIA	49
4.1 Materiais e equipamentos	49
4.2 Experimental	52
4.2.1 Preparo do 4-metil-7-acetoxicumarina (98)	52
4.2.2 Preparo do 4-metil-7-metoxicumarina (99)	52
4.2.3 Epoxidação quimio-enzimática dos compostos cumarínicos 90, 98 e 99 - Procedimento Geral	53
4.2.4 Epoxidação química do α-terpineol	54
4.2.5 Epoxidação quimio-enzimática do α-terpineol (74) ... 55	
4.2.6 Avaliação da solubilidade da himecromona (90)	56
4.3 Caracterização dos compostos	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1 Epoxidação quimio-enzimática do terpineol	59

5.1.1 Caracterização do terpineol 74 e do respectivo óxido 101.....	59
5.1.2 Influência da procedência da lipase.....	68
5.1.3 Influência do agente acilante (e sua proporção).....	69
5.1.4 Influência do tempo de reação	71
5.2.4 Influência do solvente orgânico.....	72
5.2 Estudos da epoxidação quimio-enzimática da himecromona e derivados.....	75
5.2.1 Caracterização da himecromona (90) e seus derivados.....	75
5.2.2 Estudo da epoxidação da 4-metil-7-acetoxicumarina (98) e 4-metil-7-metoxicumarina (99)	84
CONCLUSÃO	89
PERSPECTIVAS	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1. INTRODUÇÃO

Em tempos de livre mercado, a disputa pela clientela e própria sobrevivência do negócio faz com que as empresas busquem a melhoria da qualidade do produto ofertado, além da redução nos custos de produção.¹

Exemplificando através do setor industrial, ao qual pertencem as áreas farmacêutica, têxtil, de cosméticos, alimentícia e de química fina, a rentabilidade pode ser ampliada reduzindo o consumo energético ou o volume de resíduos que necessitam de tratamento. Em ambos os casos, a catálise pode ser empregada para alcançar tais objetivos.^{2,3}

Dentre os vários catalisadores disponíveis, como metais de transição,⁴ ácidos e bases inorgânicas⁵ e organocatalisadores,⁶ as enzimas apresentam a vantagem de apresentar seletividade (químio-, regio- e enantiosseletividade). Não obstante, podem ser modeladas para uma reação específica e fixadas em suportes, facilitando sua recuperação e/ou reutilização, bem como o tratamento das reações ou aplicações em fluxo contínuo.^{2,7-10}

As lipases, enzimas da classe das hidrolases, são as que têm maior aplicação biotecnológica, sendo utilizadas para hidrólise e/ou esterificação, produzindo biodiesel, ésteres de aroma e aditivos de sabões, auxiliando na quebra de gorduras.^{2,5,11,12}

Tendo em vista o interesse público também sobre a sustentabilidade dos processos químicos realizados, há grupos que atualmente pesquisam o desenvolvimento de metodologias eficientes empregando lipases, pelo ajuste das condições ou aplicação de outras técnicas (como o ultrassom). Inclui-se ainda, o potencial de utilização desses catalisadores em diversas reações, como a condensação de Knoevenagel e as adições de Michael.¹³⁻¹⁵

Os epóxidos, uma classe de compostos interessante tanto como reagente (para formação de haloidrinas e outros álcoois α -substituídos, por exemplo) quanto produto “final” (resinas epóxi), podem ser obtidos através da biocatálise a partir de alcenos.¹⁶⁻¹⁸

Fundamentado nestas considerações, este trabalho objetiva, então, utilizar lipases como biocatalisadores para preparar epóxidos derivados de cumarinas e de terpenos, nomeadamente, a himecromona (e derivados) e o terpineol. Estes são produtos naturais que apresentam propriedades biológicas (tais como antiespasmótica ou antitumoral) e

a modificação possibilita a obtenção de diversos outros compostos análogos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Catálise: enzimas

Um dos preceitos da química está em que toda reação, por mais complexa que seja, pode ser expressa através de equações e mecanismos reacionais, descrevendo então o caminho entre reagente e produto, conjuntamente de uma variação energética, geralmente avaliada pela energia livre de Gibbs (ΔG).¹⁹

Em uma reação exergônica ($\Delta G < 0$), o processo é espontâneo; contudo, é necessário vencer a barreira energética de ativação (ΔG^\ddagger), que influi na velocidade de reação. Tem-se então que determinada transformação química, mesmo que favorecida, possa necessitar de muito tempo para ocorrer.¹⁹

Como alternativa ao processo lento, podem ser utilizados catalisadores. Em uma reação química, estes compostos alteram o caminho da reação, reduzindo a energia de ativação necessária, de modo que são regenerados ao fim do ciclo.¹⁹

Exemplificando, a formação do *i*-propanol partindo do respectivo alceno em meio aquoso não ocorre em quantidade apreciável, devido à ausência de um eletrófilo que se adicione à C=C. Contudo, na presença de um ácido, forma-se rapidamente o íon hidrônio, o qual então dá prosseguimento à reação, descrita na **Figura 01**. Em função do ácido conjugado do álcool ser mais ácido que o meio, este é deprotonado por uma molécula de água, regenerando o catalisador e por fim, formando o produto.²⁰

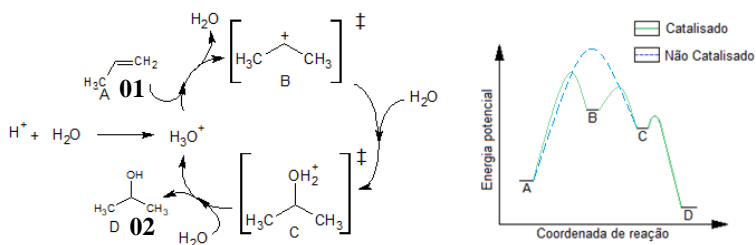


Figura 01. Diagrama energético e mecanismo para formação do *i*-propanol catalisada por ácido.

Entre os catalisadores existentes, tem-se as enzimas, moléculas de origem biológica que atuam em diversos processos. Estas possuem

elevada massa molar, constituindo-se de uma sequência de resíduos de aminoácidos, ligados através de ligações amídicas e são portanto, tipicamente proteínas.

Porém, há algumas exceções, como as RNases, onde os aminoácidos são substituídos por bases nitrogenadas que não se ligam diretamente, e sim através de uma cadeia fosfoglicosídica.²¹

Na cadeia lateral dos aminoácidos, vários grupamentos são observados, tais como tiol, hidroxila, alquila, carboxilato e amida, entre outros, como ilustrado nos aminoácidos exemplificados na **Figura 02**.²¹

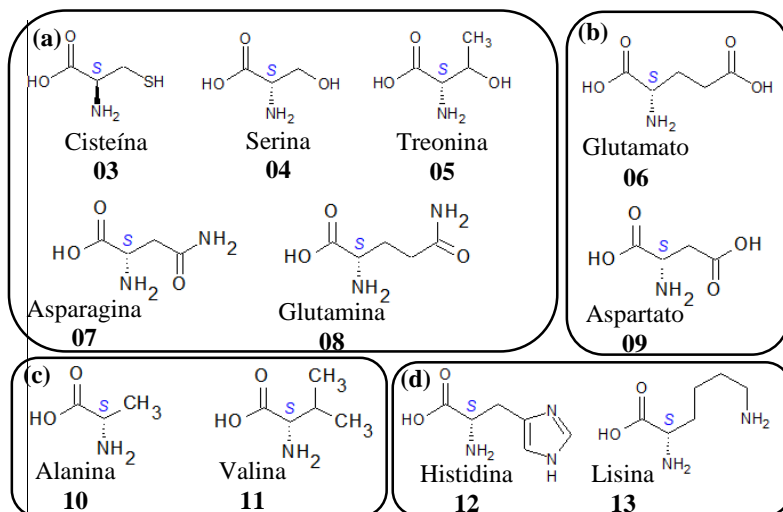


Figura 02. Exemplos de alguns aminoácidos, na forma não-ionizada, encontrados em enzimas e proteínas, classificados de acordo com a cadeia lateral em (a) Polar, não-carregada; (b) Negativamente carregada; (c) Apolar, alifática; (d) Positivamente carregada.

Pode-se avaliar uma enzima em quatro níveis estruturais: primário, secundário, terciário e quaternário. No primeiro nível, observa-se a sequência na qual os aminoácidos unem-se. As estruturas secundárias por sua vez apresentam as conformações de aminoácidos mais próximos (em α -hélices e folhas β -pregueadas), originadas das diversas interações presentes, tais como dipolares, ligações de hidrogênio e pontes de enxofre.²¹

O conjunto de uma vizinhança de estruturas secundárias por sua vez, gera a estrutura terciária, enquanto que as interações de uma ou mais (sub)unidades terciárias formam a estrutura quaternária (**Figura 03**).²¹

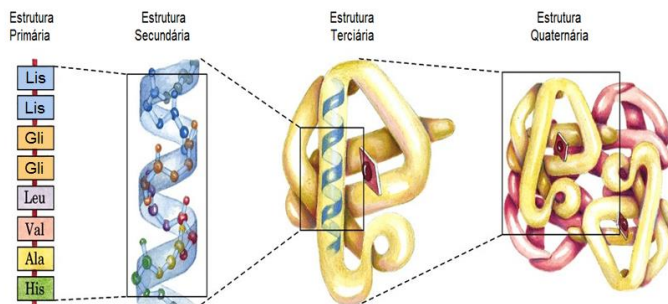


Figura 03. Representação dos diversos níveis estruturais de uma enzima. (adaptado da ref. 21)

Em função das diversas reações biocatalisadas, as enzimas foram classificadas pela UIBBM (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular) de acordo com o tipo de reação que catalisam, como observado na **Tabela 01**.²¹

Tabela 01. Classificação das enzimas de acordo com a UIBBM.²¹

Classe (EC) ^(a)	Subclasse	Tipo de reação catalisada
Oxidoredutase (EC 1)	Hidrogenase, oxidase, peroxidase	Transferência de elétrons ou remoção de hidrogênio
Transferase (EC 2)	Transcetolase, transaldolase	Transferência de grupo
Hidrolase (EC 3)	Lipases, peptidases, esterases, fosfatases	Hidrólise, esterificação, amidação, transesterificação
Liase (EC 4)	Descarboxilase, hidrolíase, cetoacidase	Adição de grupos funcionais a dupla ligação ou formação de dupla por remoção de grupos
Isomerase (EC 5)	Racemase, epimerase, oxirredutase, mutase	Transferência de grupos dentro da molécula para produzir isômeros
Ligase (EC 6)	Sintetase, quelatase	Formação e clivagem de C-C, C-S, C-O, C-N e ésteres de fosfato

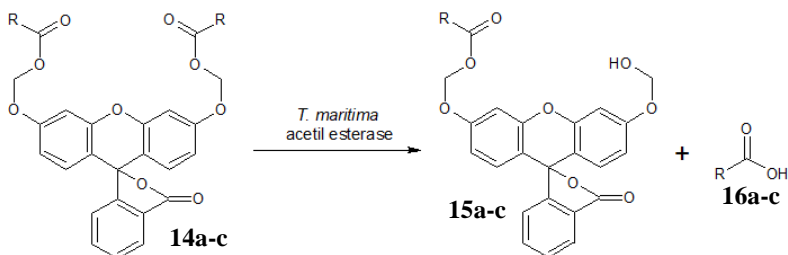
(a) Número EC (*Enzyme Commission*) de classificação.

De toda a estrutura da enzima, o processo catalítico ocorre apenas em uma pequena porção, chamada de sítio-ativo, estabilizando os intermediários da reação biocatalisada, o que reduz a energia de

ativação do processo e aumenta a taxa de formação de produto, em ordens entre 10^5 - 10^{17} em relação a reação não catalisada.^{7,21}

O sítio-ativo é moldado espacialmente pelo conjunto de interações dos aminoácidos no restante da molécula, denominado apoenzima. Tal formato, tão específico, garante às enzimas algumas das suas maiores vantagens, tais como estereo-, quimio- e enantiosseletividade.²¹

Um exemplo de enzima com sítio-ativo rígido (mais conhecido como modelo *chave-fechadura* de Fischer) é a acetil esterase de *Thermotoga maritima*, que prefere ésteres com grupos acetila ligados a álcoois primários ou secundários, aromáticos ou não. Ao substituir alguns resíduos de aminoácidos, altera-se a conformação estrutural, causando uma diminuição na atividade da enzima para o substrato original (**14a**), mas obtêm-se resultados melhores ao usar agentes acilantes mais impedidos (metacrilato, **14b** e ciclobutil, **14c**), em uma série de derivados de fluoresceína (**Esquema 01**). Nota-se também regioseletividade nesta reação, tendo em vista a formação exclusiva do produto de mono-hidrólise e preservação da lactona destes compostos, que não sofre abertura.²²



Reagente	R	Atividade ^(a)
14a	CH ₃	1/33
14b	C(CH ₃)=CH ₂	1/8
14c	C(CH ₂) ₃	4

(a) Proporção entre a atividade da espécie natural (TM0077) com uma variante (P228A).

Esquema 01. Hidrólise de derivados da fluoresceína catalisada por esterases modificadas de *T. maritima*. (adaptado da ref. 22)

Contudo, uma enzima não se apresenta como uma estrutura totalmente rígida, podendo sofrer alterações conformacionais.⁷ A lipase B de *Candida antarctica* (CALB), por exemplo, apresenta α -hélices que podem atuar como “tampa” do sítio-ativo - tipicamente

constituído por resíduos de serina, histidina e aspartato, e cuja distância em relação a ele varia em função do solvente que se encontra. Como observado em simulações de dinâmica molecular, a CALB teria o sítio-ativo mais “disponível” em meio aquoso, se comparado com sua forma cristalizada. (**Figura 04**).^{7,23}

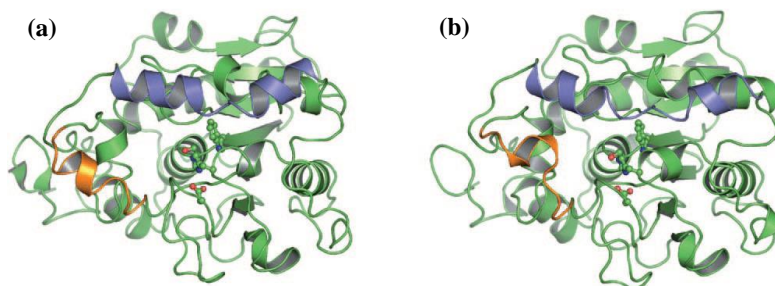


Figura 04. Estrutura tridimensional da lipase B de *Candida antarctica*. Em azul e laranja, estão representadas as α -hélices que mudam a conformação do entorno do sítio-ativo em modelo bolas-e-palitos. (a) conformação "aberta"; (b) conformação "fechada".²³

Ao observar a “moldabilidade” do sítio-ativo, o modelo de Fischer foi atualizado. Com o novo modelo de “encaixe-induzido”, proposto por Koshland, o sítio-ativo tem conformação *similar* à sua forma ativa e ajusta-se enquanto os reagentes aproximam-se, para formar o complexo “enzima-substrato”. A **Figura 05** ilustra a diferença entre os modelos.^{20,21}

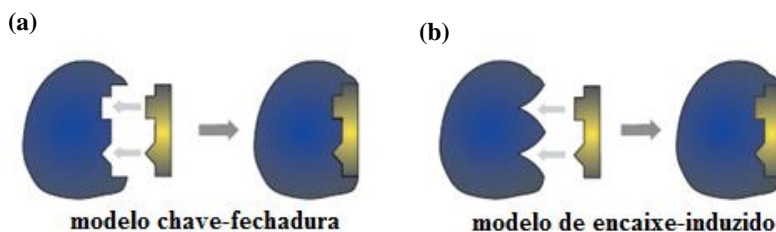
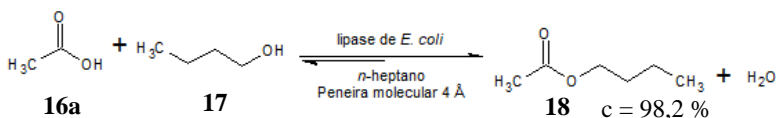


Figura 05. Representações dos modelos de sítio-ativo para catálise enzimática. (adaptado da ref. 20)

Apesar de enzimas naturalmente atuarem em meio aquoso, publicações dos anos 1980 já notavam sua aplicabilidade em meio

orgânico, acarretando em uma série de vantagens. Assim, facilita-se a solubilização de reagentes hidrofóbicos (eliminando a necessidade de sistemas bifásicos), altera-se a atividade catalítica (modificando-se a conformação estrutural) e ainda evitam-se reações paralelas ou de equilíbrio que dependam de água.²⁴

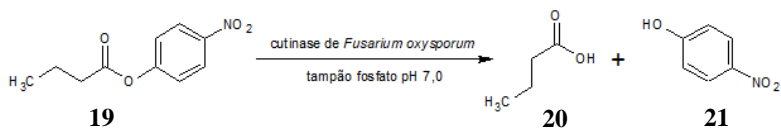
Por exemplo, Peng *et al.* utilizaram a lipase CS-2 de uma espécie recombinante de *Escherichia coli* para preparar o acetato de *n*-butila, usando 1-butanol e ácido acético em *n*-heptano. Em dado momento, a conversão em produto estagnava após atingir o equilíbrio químico entre síntese e hidrólise. Ao empregar peneiras moleculares para remover a água formada, obteve-se um aumento na conversão ao produto de aproximadamente 10 % (**Esquema 02**).²⁵



Esquema 02. Preparação do acetato de *n*-butila utilizando a lipase de *E. coli*.²⁵

Em outro estudo, Speranza e Macedo avaliaram a atividade da cutinase de *Fusarium oxysporum* incubada em diversos solventes na hidrólise do butirato de *p*-nitrofenila. Ao empregar solventes orgânicos hidrofílicos (metanol, etanol, acetona, tetraidrofurano, 1-propanol e 1-butanol), as atividades relativas foram menores que a reação-controle (em solução-tampão, sem incubação), com valores entre 5 – 20 %, possivelmente em função de estes solventes removerem a “água essencial” da enzima, que é definida como a quantidade de água que interage intensamente com a estrutura proteica, garantindo a preservação da estrutura terciária,⁷ causando a diminuição da atividade catalítica.²⁶

Porém, o uso de solventes mais apolares, como hexano, *iso*-octano e 1-octanol, resultou em atividades relativas entre 160 - 180 %, o que indicou não apenas a preservação da água essencial, bem como uma possível alteração benéfica na conformação estrutural (**Esquema 03**).²⁶



Esquema 03. Hidrólise do butirato de *p*-nitrofenila catalisada pela cutinase em meio aquoso.²⁶

Pode-se também utilizar lipases, que normalmente hidrolisam triacilgliceróis, em processos de (inter)esterificação. Mais recentemente, as lipases foram empregadas para catalisar reações de formação de C-C, como a adição aldólica e de Michael e a condensação de Knoevenagel, como também na oxidação de Baeyer-Villiger.²⁷⁻³²

A atuação de enzimas em reações “não-naturais” resulta na chamada *versatilidade* (ou “promiscuidade”) *enzimática*, fato já observado em 1900, ampliando as possibilidades de síntese com estes biocatalisadores.^{27,28,33}

Neste trabalho, as lipases foram usadas para a obtenção *in situ* de peroxiácidos e posterior preparação de epóxidos. A seguir, serão descritas mais detalhadamente.

2.1.1 Lipases

As lipases (EC 3.1) são enzimas pertencentes a classe das hidrolases que não necessitam de cofatores, são tipicamente resistentes ao meio orgânico (como líquido iônico e solventes orgânicos tradicionais, como diclorometano, clorofórmio e hexano, ou de baixo ponto eutético), e também podem apresentar resistência à temperaturas ou concentração salina elevada ou em valores de pH não-neutros.^{7,18,21,33}

Conjuntamente à estabilidade em amplas condições de trabalho, as lipases podem ser obtidas de diversas fontes, estando presentes em animais, vegetais e microrganismos. Esse último grupo, que é constituído de bactérias, fungos e fermentos produz geralmente lipases extracelulares, facilitando o processo de isolamento ao omitir etapas de ruptura e extração requeridas por enzimas intracelulares.³⁴

A **Tabela 02** apresenta alguns exemplos de lipases obtidas de microrganismos, e que são comercialmente importantes.

Tabela 02. Gêneros de importantes produtores de lipases microbianas. ³⁴

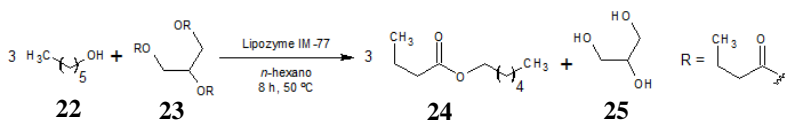
Tipo de microrganismo	Espécies comercialmente importantes
Fungos	<i>Rhizopus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Geotrichum</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Rhizomucor</i> sp.
Bactérias	<i>Bacillus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Burkholderia</i> sp.
Fermentos	<i>Candida</i> sp., <i>Rhodoturula</i> sp., <i>Pichia</i> sp., <i>Saccharomyces</i> sp.

Adicionado à relativa facilidade de purificação, a produção de lipases microbianas pode ser realizada por processos fermentativos simples, seja fluxo contínuo ou batelada, inclusive utilizando rejeitos agroindustriais como matéria-prima. Como o processo é escalável, as lipases tornam-se industrialmente interessantes para diversos setores. ³⁴⁻³⁶ Algumas aplicações estão apresentadas na **Tabela 03**. ³⁶

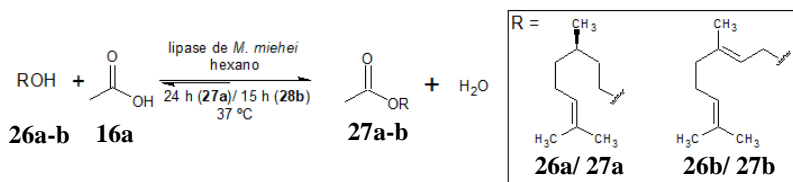
Tabela 03. Exemplos de aplicações industriais de lipases. ³⁶

Setor	Exemplos/ função
Alimentos	Panificação, laticínios, doces, flavorizantes
Limpeza	Aditivo removedor de gorduras
Têxtil	Melhora a eficiência de outros tratamentos químicos sobre o tecido
Cosméticos	Síntese de ésteres de aroma (acetato de isoamila, butirato de etila, caprilato de etila), desengordurante
Tratamento de resíduos	Biorremediação de rejeitos lipídicos
Polímeros	Síntese de polímeros biodegradáveis (como polihidroxialcanoatos e policaprolactona)

Por exemplo, a lipase de *Rhizomucor miehei* foi usada para obtenção do butirato de hexila (um éster de aroma), formando o produto (**24**) em conversões excelentes (96,2 %), após otimização das condições reacionais (**Esquema 04**). ³⁷

**Esquema 04.** Preparação do butirato de hexila biocatalisada pela lipase de *R. miehei* imobilizada em resina aniônica.

Com o uso de lipases de *Mucor miehei*, foram preparados ésteres derivados do citrionelol e geraniol (**Esquema 05**). Os acetatos foram preparados em escala de bancada e tiveram as condições de reação otimizadas (solvente, tempo, proporção álcool: ácido carboxílico, quantidade de lipase empregada), obtendo conversões excelentes (de ~90 % a >99 %, respectivamente). Ao escalonar o processo para um pequeno reator, os resultados foram excelentes para **27b** (>99 %) e aceitáveis (49 %) para o éster **27a** (**Esquema 05**).³⁷

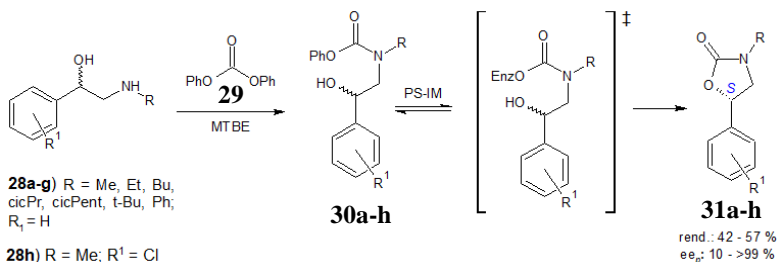


Esquema 05. Preparação dos acetatos de citrionela (**27a**) e de geraniol (**27b**) catalisada pela lipase de *M. miehei*.

Mesmo que as aplicações industriais das lipases se relacionem majoritariamente à hidrólise ou (trans)esterificação, estas enzimas são importante fonte de estudo e constituem a classe mais extensivamente pesquisada de biocatalisadores.⁷

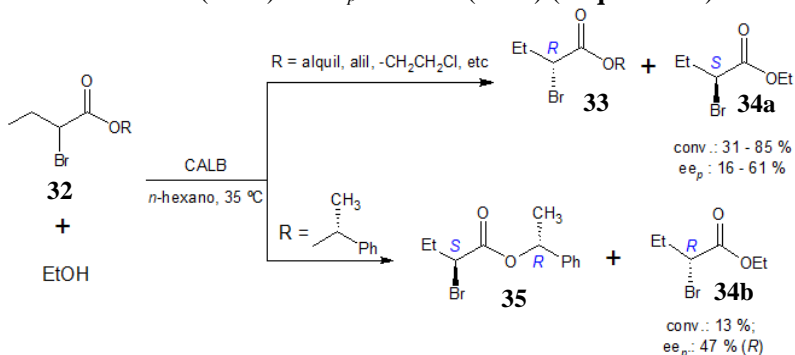
As lipases foram também utilizadas por Zhang *e col.* (especificamente, a lipase IM de *Burkholderia cepacia*) para resolução de misturas racêmicas, obtendo-se oxazolidinonas enantiomericamente enriquecidas e/ou puras através de reações “one pot” em cascata de aminoálcoois e carbonatos. Na primeira etapa, tem-se uma carbamação via química, que prossegue então para a lactonização enantiosseletiva (**Esquema 06**).³⁸

Foram obtidos rendimentos razoáveis (42 - 57 %) e ótimos excessos enantioméricos do produto (ee_p , 95 - >99 %) quando a amina de partida apresentava substituintes pequenos (**31a**, **31b** e **31h**). Nos casos onde este grupo se tornava maior ou mais volumoso, os rendimentos foram moderados (~45 %) mas o ee_p tornou-se baixo (10 % para **31f**, R = *t*-Bu), provavelmente devido a um encaixe não adequado no sítio-ativo.³⁸



Esquema 06. Síntese de oxazolidinonas catalisada pela lipase de *B. cepacia* (PS-IM).

Em outro exemplo de resolução enzimática, Silva *e col.* modularam a seletividade da lipase de *C. antarctica* (CALB) para obtenção de α -bromoésteres. Ao variar algumas propriedades do álcool empregado (efeito estéreo, presença de C=C, heteroátomos, ou do centro quiral), alterou também a preferência do enantiômero formado, ou seja *S* ou *R*. Contudo, apesar de interessante, a conversão em **34b** foi baixa (13 %) e o ee_p razoável (47 %) (**Esquema 07**).³⁹

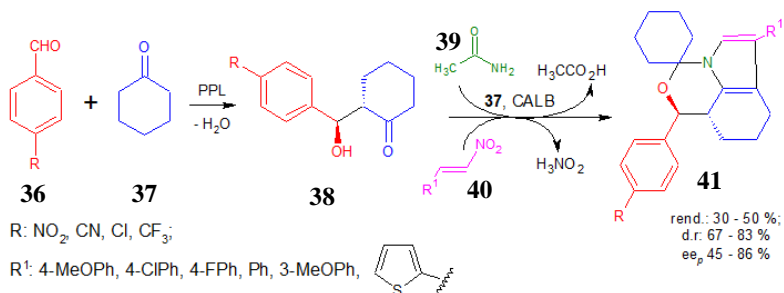


Esquema 07. Inversão da enantiopreferência biocatalítica na resolução de ésteres 2-bromobutíricos. (adaptado da ref. 39)

É também possível utilizar as lipases para transformar centros pró-quirais em compostos enantiomericamente puros/enriquecidos através da síntese assimétrica. Chen *e col.* prepararam derivados *spiro*-oxazínicos, utilizando a lipase de pâncreas de porco (PPL) e de *Candida antarctica* (CALB).⁴⁰

Na etapa de adição aldólica, foram observados bons rendimentos (70 - 99 %) e seletividade tanto enantiomérica (ee_p 79 -

86 %) quanto diastereoisomérica (d.r. 3 - 7:1). Após otimização de alguns parâmetros da etapa multicomponente, a quimioteca elaborada exibiu rendimentos globais, ee_p e d.r. razoáveis, com valores respectivos de 30 – 51, 42 – 86 % e 67/33 – 83/17 (**Esquema 08**).⁴⁰



Esquema 08. Síntese assimétrica de compostos spiro catalisada pela PPL e CALB.

Uma outra classe de compostos que pode ser obtida empregando as lipases são os epóxidos, que serão descritos a seguir.

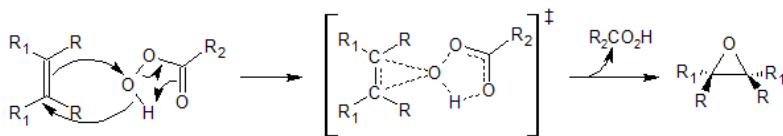
2.2 Epóxidos

Os epóxidos (ou oxiranos) são éteres cíclicos de três membros de ligações angularmente tensionadas, com maior energia interna na molécula, se comparado à estrutura aberta homóloga.²⁰

2.2.1 Métodos de obtenção e aplicações

Para preparar epóxidos, pode-se utilizar de haloidrinas (haletos orgânicos α -hidroxilados) que por sua vez podem ser preparadas a partir de alcenos. Pode-se, por exemplo, preparar o 1-cloro-2-feniletanol a partir do estireno utilizando Oxona[®] (peroximonossulfato de potássio) e NH₄Cl.⁴¹

É também possível transformar alcenos diretamente em epóxidos ao reagí-los com agentes oxidantes. Utilizando um perácido (peroxiácido), através da reação de Prilezhaev, ocorre a transferência concertada de um átomo de oxigênio para a ligação dupla C=C, formando o epóxido estereoespecificamente e gerando o respectivo ácido carboxílico como subproduto (**Esquema 09**).⁴²



Esquema 09. Mecanismo de epoxidação concertada via reação de Prilezhaev.⁴²

Alternativamente, outros agentes oxidantes podem ser empregados, sendo alguns exemplos citados na **Tabela 04**. Contudo, a escolha destes deve ser discriminatória, levando em consideração aspectos como facilidade de reação, tratamento de resíduos ou ainda a real aplicabilidade. O oxigênio molecular, por exemplo, tem a difusão em meio líquido dificultada, necessitando de elevadas pressões, enquanto o trióxido de cromo é um agente oxidante muito forte, o que pode levar a abertura do anel e subsequentemente oxidar o produto.⁴³

Tabela 04. Lista de alguns reagentes usados como agentes oxidantes na epoxidação de alcenos.⁴²

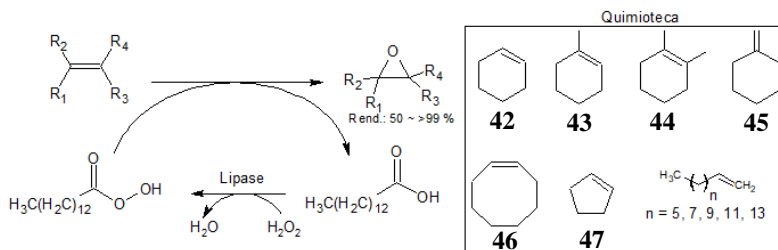
Oxidante	% O ₂ ativo (m/m)	Sub-produto
O ₂	100	Nenhum/ H ₂ O
H ₂ O ₂	47,1	H ₂ O
N ₂ O	36,4	N ₂
O ₃	33,3	O ₂
KMnO ₄	30,4	Sais Mn (II)
HNO ₃	25,0	NO _x
CrO ₃	24,0	Sais de Cr (III)
NaOCl	21,6	NaCl
AcOOH	21,1	AcOH
<i>t</i> -BuOOH	17,8	<i>t</i> -BuOH
H ₂ NCONH ₂ · H ₂ O ₂ (UPH)	16,0	H ₂ NCONH ₂ · H ₂ O
KHSO ₅	10,5	KHSO ₄
<i>m</i> -ClC ₆ H ₄ COOOH (<i>m</i> -CPBA)	9,3	<i>m</i> -ClC ₆ H ₄ COOH
(Me ₃ Si) ₂ O ₂	9,0	(Me ₃ Si) ₂ O
NaIO ₄	7,5	NaIO ₃
PhIO	7,3	PhI

Entre os agentes oxidantes usados, o ácido *meta*-cloroperbenzoico (*m*-CPBA) é tipicamente utilizado em laboratórios por ser um sólido, o que facilita seu manuseio, por solubilizar em meio orgânico, além de simplificar o tratamento pós-reacional. O subproduto (ácido *m*-clorobenzoico) é insolúvel em meio aquoso, mas lavagens com soluções saturadas de bissulfito e/ou bicarbonato costumam ser suficientes para retirá-lo do meio reacional. Contudo, pode sofrer decomposição, recomendando-se o emprego abaixo de 50 °C, e é potencialmente explosivo, dificultando o transporte e o escalonamento dos processos que o utilizam.⁴⁴

Industrialmente, um dos agentes oxidantes mais interessantes é o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que gera água como resíduo. Contudo, este apresenta-se numa concentração máxima de 30 % em água, degrada-se com o tempo e, por ser um oxidante forte, gera riscos de segurança aos manipuladores.^{45,46}

Como alternativa, outras formas deste peróxido podem ser empregadas, como o aduto de ureia-peróxido de hidrogênio (UPH). Além de ser comercialmente disponível, apresenta-se como um sólido estável, é fácil de manusear e armazenar, além de ser anidro. Assim, limita-se a presença de água no meio, reduzindo as chances de hidrólise do produto, o que levaria à formação de dióis.^{47,48}

Outra forma para preparar epóxidos é com o uso de lipases. Em 1992, Björkling *e col.* publicaram um estudo onde estes foram obtidos em um processo quimio-enzimático. Na etapa enzimática, forma-se o perácido empregando um ácido carboxílico (neste estudo foi usado o ácido mirístico) e peróxido de hidrogênio, analogamente ao preparo biocatalisado de ésteres. O perácido, então, reage com o alceno e forma o produto, de acordo com o **Esquema 10**.^{7,48}

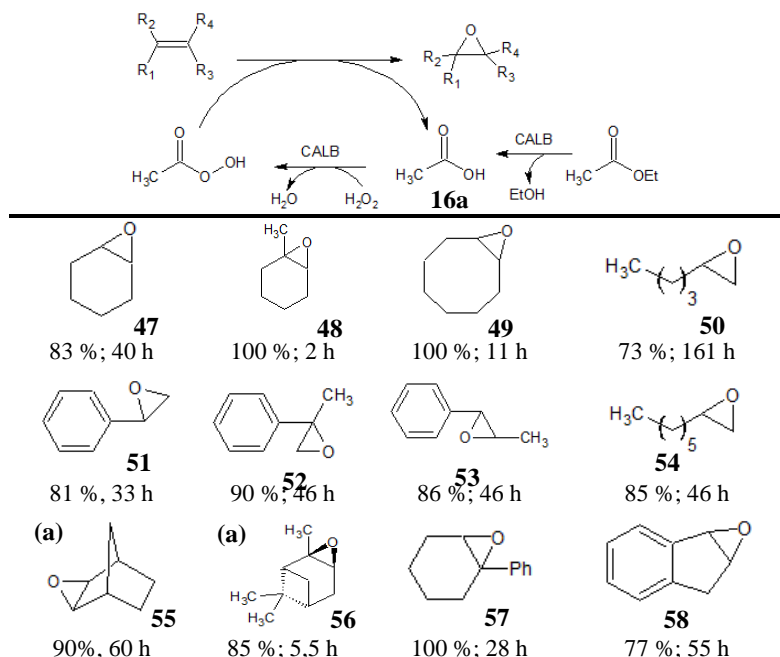


Esquema 10. Transformação quimio-enzimática de alcenos alifáticos realizada por Björkling.⁴⁸

Neste estudo, também foi observado que a adição do oxidante de forma porcionada favoreceu a formação do produto em maiores conversões. Para o epóxido derivado de **42**, após 24 h de reação, com adição única de peróxido, obteve-se uma conversão de 17 %. No mesmo tempo de reação, e acrescentando-se o agente oxidante ao longo de 12 h, este valor aumentou para 98 %.⁴⁸

Em 2006, Ankudey *e col.* propuseram o uso de UPH para a epoxidação quimio-enzimática, valendo-se da propriedade que este oxidante possui de ser liberado de maneira controlada no meio reacional. Utilizando a CALB e uma série de alkenos (entre eles **42**, **43**, **46**), resultados bons e ótimos foram obtidos, com conversões entre 73 – 100 %.

Nas reações cujo solvente foi o acetato de etila, observou-se que a lipase também hidrolisava o solvente para formar ácido acético, não sendo necessário adicionar outro ácido carboxílico (no caso, ácido octanoico) para a formação dos epóxidos (**Esquema 11**).⁴⁹



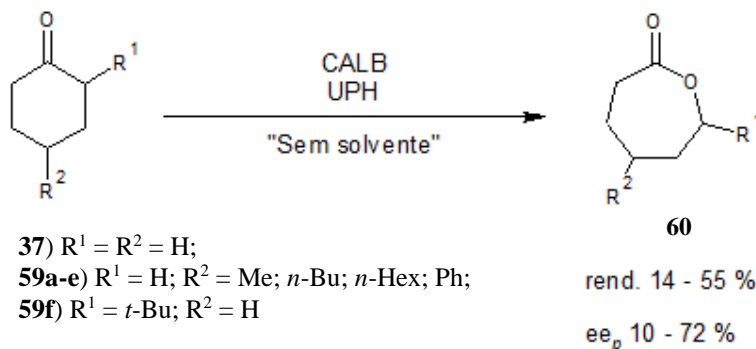
Esquema 11. Preparação de diversos epóxidos via quimio-enzimática, utilizando acetato de etila e UPH. (a) Formado de forma estereosseletiva. (adaptado da ref. 49)

Apesar dos rendimentos serem bons para toda a quimioteca preparada, pode-se observar que os tempos reacionais não foram idênticos para todos os compostos, dependendo da estrutura do alceno de partida.⁴⁹

Ao se aumentar o número de substituintes da C=C, impacta-se na densidade eletrônica e nucleofilicidade do grupo funcional, facilitando o ataque à ligação O-O fraca do perácido e posterior formação do epóxido.²⁰

Assim sendo, os compostos **47** e **48**, que reagiram em tempos reacionais muito distintos, foram influenciados em função do número de substituintes na C=C, alterando a densidade eletrônica da instauração. Contudo, para **48** pode-se propor a redução na liberdade conformacional do alceno, causado pelo substituinte CH₃, que devido ao efeito 1,3-diaxial prefere posicionamento equatorial, aumentando a rigidez dos confôrmeros.²⁰

O trabalho de Ankudey,⁴⁹ no aspecto de empregar o acetato de etila simultaneamente como solvente e reagente, assemelha-se ao publicado por Pchelka *e col.* em 1998, onde cicloexanonas foram quimicamente transformadas em lactonas através da reação de Baeyer-Villiger, utilizando a lipase de *C. antarctica*. Apesar dos rendimentos serem moderados (14 – 55 %), estes compostos apresentaram bons ee_p, em função da enantiopreferência da lipase (**Esquema 12**).⁵⁰

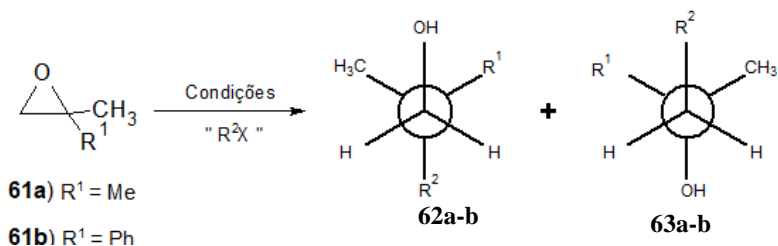


Esquema 12. Preparação "sem solvente" de caprolactonas catalisada pela CALB.

Devido a tensão angular e a diferença de polaridade entre os átomos do ciclo, as ligações C-O dos epóxidos são suscetíveis a processos de abertura de anel com diversos nucleófilos, inclusive de

forma regioespecífica, com o devido controle das condições reacionais e análise da estrutura do reagente de partida.^{20,51}

Como regra geral, nucleófilos fracos irão se adicionar ao carbono que melhor estabilize uma carga parcial positiva (durante clivagem da ligação C-O), ocorrendo o processo mais rapidamente na presença de um catalisador ácido. Nucleófilos fortes irão preferencialmente atacar pelo lado mais desimpedido, seguindo uma reação típica S_N2, como ilustrado no **Esquema 13**.²⁰



#	R ²	Condições	Conversão	Razão 62:63
1	OMe	MeOH/ óxido de grafeno ^(a) / t.a., 1 h	95 %	97:3
2	<i>n</i> -Bu	(<i>n</i> -Bu) ₂ Cu(CN)Li ₂ /THF/ -78 → -20 °C, 2 h	96 % (63b)	--/-- ^(b)

(a) Atua como catalisador ácido. (b) Razão entre produto majoritário:menoritário não foi mencionada.

Esquema 13. Abertura regioesletiva de epóxidos com nucleófilos fortes e fracos.^{52,53}

Em função destas qualidades, controle e previsibilidade de produto, quando quimicamente transformado, o grupo dos anéis oxiranos torna-se útil, principalmente como intermediário, seja para síntese de polímeros, como o polióxido de etileno (PEO) e polipropileno glicol (PPG), de plastificantes poliméricos (diésteres derivados do 9,10-diidroxioleato de metila), ou de componentes de resinas epóxi (éter diglicidílico de bisfenol A).^{17,55,56}

A importância dos epóxidos para a indústria de polímeros evidencia-se na epocloridrina (1-cloro-2,3-epoxipropano), que em 2016 apresentou um volume de vendas em torno de 1,2 milhões de toneladas. Entre outros setores que utilizam epóxidos, cita-se a indústria de fármacos e a química fina.^{57,58,59}

Dentre os alcenos que podem ser oxidados, a classe de terpenos constitui um material de partida interessante, considerando que são compostos naturais com atividade biológica diversificada.⁵⁴

Outro grupo de produtos naturais clássico com insaturação são as cumarinas, que são δ -lactonas fundidas a um anel aromático. Estas são estruturalmente mais diversificadas que os terpenoides de cadeias alifáticas e que por vezes podem apresentar formas mais complexas.⁶⁰

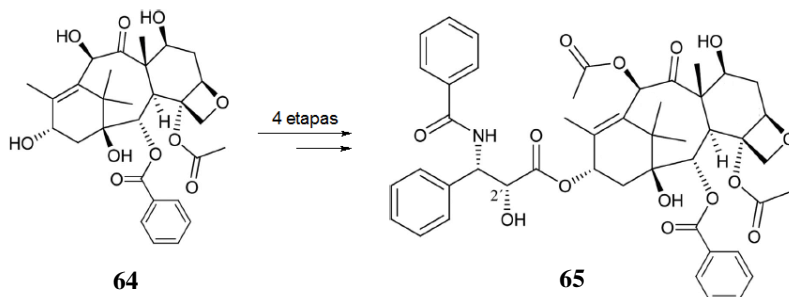
A seguir, serão discutidas algumas características destes compostos.

2.3 Produtos naturais, terpenos e cumarinas

Dos diversos campos da química orgânica, o de produtos naturais atua como fonte de várias moléculas interessantes, seja para a medicina, indústria ou agricultura.⁶¹

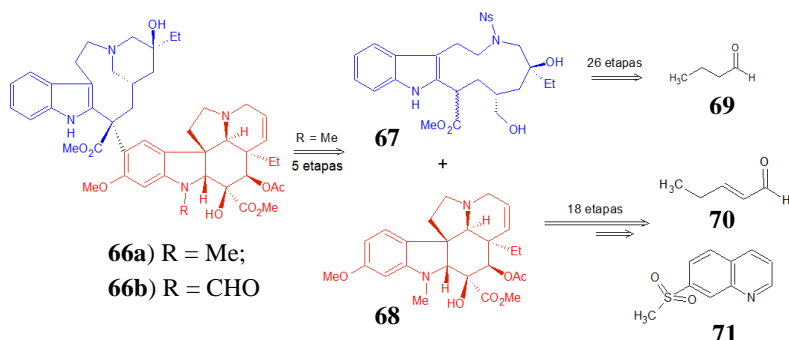
Pode-se também usar tais moléculas, ou fragmentos destas, como reagentes para a síntese de outras, explorando esta abordagem neste trabalho. Isso é especialmente válido na obtenção de um composto com propriedades relevantes otimizadas (como a capacidade de um fármaco em ser absorvido e metabolizado por um determinado sistema e efeitos adversos) ou, nas vezes em que o rendimento da extração, ou a própria concentração da espécie na fonte natural, é menor do que desejado, tornando o processo ambientalmente predatório ou com rentabilidade econômica reduzida.^{62,63}

Como exemplo, o composto quimioterápico paclitaxel (**65**, Taxol[®]), extraído da casca do teixo-do-pacífico (*Taxus brevifolia*), apresenta concentração (m/m) de 0,04 %, irrisória para fins práticos. Após descobrir que outra árvore (*Taxus baccata*) continha nas folhas a 10-deacetilbacatina III (**64**), similar e facilmente convertido sinteticamente ao composto **65**, diversificou-se o meio de produção do composto-alvo, reduzindo a busca pela primeira espécie vegetal (**Esquema 14**).^{63,64}



Esquema 14. Semi-síntese do paclitaxel (**65**) partindo da 10-deacetilbacatina (**64**).

Em outro exemplo de quimioterápico, a vimblastina (**66a**, Velban[®]), que constitui 0,001-0,05 % da vinca (*Catharanthus roseus*), foi totalmente sintetizada através de estratégias lineares e convergentes, permitindo-se também o preparo de compostos similares, como a vincristina (**66b**), que difere de **66a** pela substituição da metila do nitrogênio indolínico por um grupamento aldeídico (**Esquema 15**).⁶⁵⁻⁶⁷



Esquema 15. Ilustração de algumas etapas retró sintéticas para síntese total da vimblastina (**66a**).

Com estes breves exemplos, observa-se a aplicabilidade da síntese orgânica como alternativa para a preparação e/ou modificação [semi-]artificial de moléculas complexas de origem natural. Dentre os inúmeros grupos de produtos naturais, são destacados neste trabalho os terpenos e as cumarinas. O primeiro, maior constituinte dos óleos essenciais de diversas plantas,⁴⁸ subdivide-se de acordo com o número de moléculas de isopreno (**72**) que participam da estrutura do

composto. Assim, monoterpenos, como citrionelol (**26a**), linalol (**73**) e terpineol (**74**), ilustrados na **Figura 06**, possuem duas unidades de **72**. Os sesquiterpenos, diterpenos e sesterterpenos contém três, quatro e cinco unidades do monômero, respectivamente.²⁰

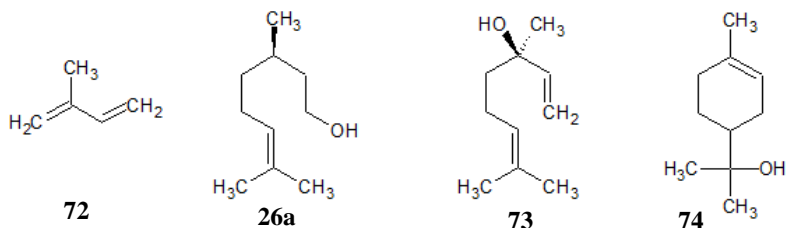


Figura 06. Estruturas do isopreno e dos terpenos citrionelol (**26a**), linalol (**73**) e α -terpineol (**74**).

Além dos trabalhos que reportam o uso de monoterpenos e derivados como potenciais fármacos (antifúngicos, anti-isquêmicos), encontram-se relatos desses compostos atuando como sistema de defesa vegetal, flavorizantes, repelentes, entre outros.⁶⁸⁻⁷¹

O terpineol é um monoterpreno com quatro isômeros estruturais (explicitados na **Figura 07**), diferindo pelo posicionamento da insaturação e da hidroxila. É encontrado no óleo essencial de algumas plantas, apresentando-se comumente como mistura de isômeros, sendo majoritária a forma alfa (α).⁷²

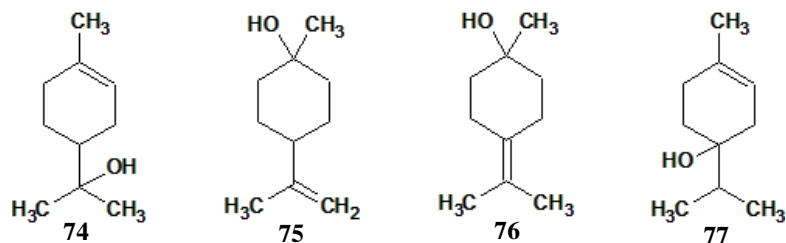
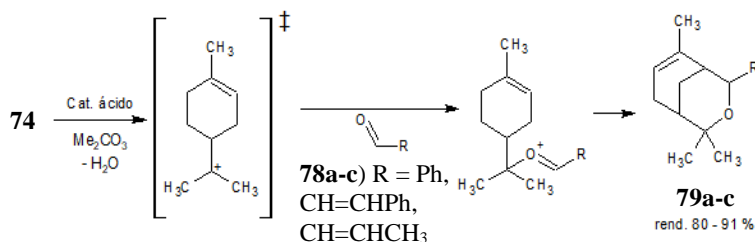


Figura 07. Estruturas dos isômeros de terpineol nas formas α - (**74**), β - (**75**), γ - (**76**) e 4-hidróxi (**77**).

Especificamente, o terpineol já foi empregado como solvente na dispersão de partículas de níquel, chumbo, titânio e zircônio, evitando a aglomeração destas possivelmente por estabilização estérea.^{73,74}

Este composto é também aplicado como aditivo de gasolina, aumentando a octanagem da mistura e a eficiência térmica e de consumo do combustível.⁷⁵ Foi também usado como possível potencializador das propriedades aromáticas e/ou biológicas de outras moléculas naturais, através da reação de cicloadição ao benzaldeído, cinamaldeído e crotonaldeído (**Esquema 16**).⁷⁶



Esquema 16. Preparação de éteres bicíclicos pela reação de cicloadição utilizando terpineol (**74**) e aldeídos.

As cumarinas (**81**) são lactonas derivadas do 1-benzopirano (**80**), distinguindo-se das cromonas (**82**) pela posição da carbonila, formando cetonas α, β -insaturadas (**Figura 08**).⁶⁰

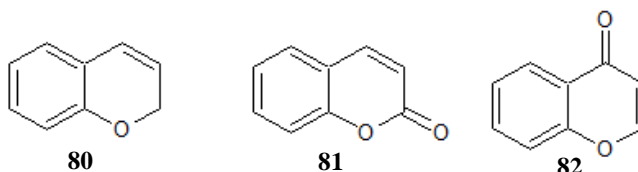
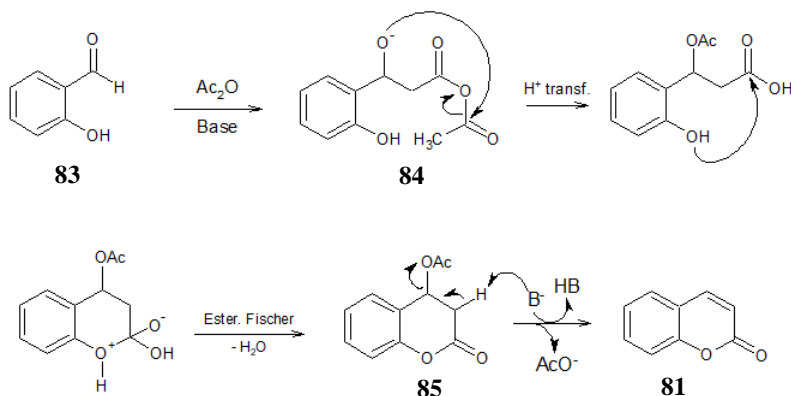


Figura 08. Estrutura do 1-benzopirano (**80**), cumarina (**81**) e cromona (**82**).

Conhecidas há décadas pelos químicos, algumas rotas sintéticas foram elaboradas, como as clássicas reações de Perkin e Pechmann. Na reação de Perkin, o produto típico é o ácido cinâmico ou derivado, formado através da reação de um benzaldeído com anidrido acético na presença de uma base, como piridina ou acetato de sódio. Apesar de relativamente antiga, datando de 1868, o mecanismo desta reação não foi totalmente elucidado.^{21,76}

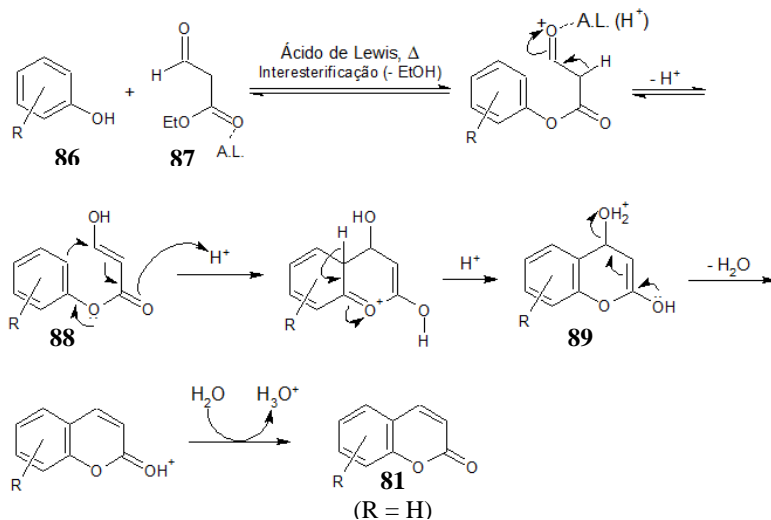
Observando que o ácido cinâmico e **81** divergem apenas na presença de heterociclo e estereoquímica do alceno (*trans* no ácido, *cis* em **81**), facilmente adapta-se a reação de Perkin para a preparação de cumarinas, partindo do aldeído salicílico (**83**) e possivelmente seguindo mecanismo similar, adicionado de uma etapa de

lactonização, que é sugerida na transformação entre **84** e **85**, como apresentado no **Esquema 17**.



Esquema 17. Proposta mecanística para a síntese da cumarina **81** a partir do aldeído salicílico (**83**).

A síntese de Pechmann utiliza fenol, β -ceto éster e catalisador ácido, que atua nos grupos oxigenados da segunda molécula. A primeira etapa do mecanismo é uma interesterificação típica, com o grupo carboxílico ativado pelo catalisador (**Esquema 18**).⁷⁸

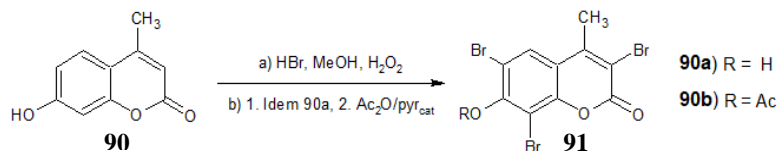


Esquema 18. Mecanismo via Pechmann para síntese de cumarinas.

Após a condensação entre **86** e **87**, ocorre a eliminação do hidrogênio α -ácido, facilitada pela ativação da carbonila β ao grupo éster, formando a espécie **88**. Realiza-se então uma adição conjugada, gerando o heterociclo, seguida da remoção de um próton para recuperar a aromaticidade do anel benzênico (**87**). Por fim, através de uma sequência simples de protonação de álcool, desidratação e recuperação do catalisador gera-se a cumarina **81**.

Utilizando resorcinol (3-hidroxifenol), tem-se a formação de umbeliferonas (7-hidroxicumarinas). Caso o segundo reagente seja o acetoacetato de etila, produz-se a 4-metilumbeliferona (**90**), também conhecida como himecromona (hymc).

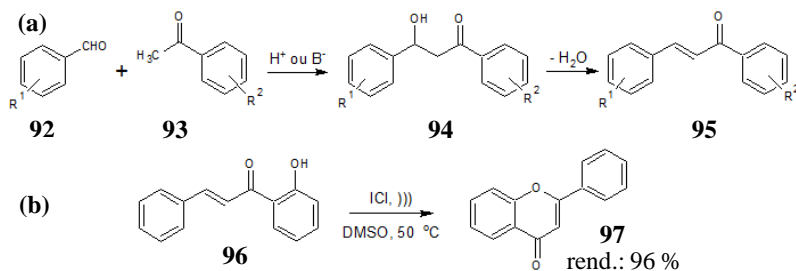
Entre suas aplicações, a himecromona (**90**) é utilizada como um colerético e antiespasmótico, tendo aplicação no tratamento de discinesia biliar. Este composto também pode ser aplicado como inibidor do hialuronano, auxiliando no tratamento de processos inflamatórios, autoimunes e de alguns tipos de câncer. Além disso, é um indicador fluorescente, precursor na preparação de inseticidas e anti-incrustante biológico.⁷⁹⁻⁸¹



Esquema 19. Preparação de larvicidas a partir da himecromona (**90**).⁸²

Recapitulando a seção 2.2, os alcenos ricos em densidade eletrônica, como o caso do terpineol (**74**), têm sua epoxidação facilitada, por atacar mais rapidamente a ligação fraca O-O do perácido.⁴³ A ligação olefínica de **90** também é eletronicamente enriquecida, por conta da substituinte metila e do grupo fenol, conjugado. Contudo, a presença de uma carbonila, por efeito mesomérico, altera a densidade eletrônica, diminuindo o efeito doador.²⁰

Assim, a epoxidação das cumarinas 4-substituídas aproximarse-ia, por exemplo, das chalconas (**95**), produzidas facilmente através da condensação de Claisen-Schmidt e precursoras de flavonas (**97**), ambas classes de produtos naturais com propriedades biológicas diversificadas (**Esquema 20**).^{83,84}



Esquema 20. (a) Preparação de chalconas via Claisen-Schmidt. (adaptado da ref. 85) (b) Síntese da flavona partindo de hidroxichalcona. (adaptado da ref. 84)

Então, este trabalho visou realizar a epoxidação quimio-enzimática de **74** e **90** (e dois derivados, de acetilação e eterificação), onde foram avaliados a influência de diversos parâmetros reacionais, tais como tempo, solvente e a procedência da lipase, entre outros.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Obter epóxidos à partir do terpineol, da himecromona e derivados via quimio-enzimática, definindo os melhores parâmetros reacionais, e realizar a caracterização dos produtos através de técnicas espectroscópicas.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Estudos com o terpineol

- Preparar o padrão epóxido, via química, do terpineol **74**.
- Realizar a epoxidação quimio-enzimática de **74**, empregando lipases de diversas procedências (entre estas as de *Candida antarctica*, *Pseudomonas fluorescens* e *Rhizopus oryzae*).
- Avaliar a influência de alguns parâmetros reacionais na conversão em epóxido, sendo estes o tempo de reação (1 – 24 h), solvente orgânico (por exemplo diclorometano, hexano e acetona), agente acilante (ácido butanoico, hexanoico, octanoico, decanoico ou dodecanoico) e a sua proporção em relação ao alceno (1:1 – 1:4).
- Isolar e caracterizar os epóxidos através de técnicas espectroscópicas (¹H-RMN e IV), determinando também os tempos de retenção por cromatografia gasosa (CG).

3.2.2 Estudos com os derivados cumarínicos

- Preparar via química os derivados acetilado (**98**), eterificado (**99**) e o epóxido da himecromona (**100a**).
- Definir e otimizar as condições iniciais para epoxidação quimio-enzimática de hmc (**90**), sendo estes parâmetros a temperatura, tempo, solvente orgânico, agente acilante (ácido hexanoico ou octanoico) e fonte de peróxido (H₂O₂ 30 % ou UPH).
- Testar a aplicabilidade da reação de epoxidação biocatalisada com parâmetros otimizados para hmc (**90**), empregando os compostos **98** e **99**.
- Determinar o fator de retenção por cromatografia em camada delgada (ccd) e caracterizar os compostos **90**, **98**, **99** e **100a-c** através de técnicas espectroscópicas (RMN, IV) e ponto de fusão.

- Comparar os resultados obtidos com outros correlatos citados na literatura.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais e equipamentos

Para o desenvolvimento do trabalho, foram empregados os reagentes listados a seguir, utilizando-os sem purificação prévia ao uso (**Tabela 05**).

Tabela 05. Lista de reagentes e solventes empregados neste trabalho.

Reagentes	
Himecromona, ≥ 98 % (Aldrich)	α -terpineol, ≥ 90 % (Aldrich)
Terpineol, mistura de isômeros ^(a) (Fluka)	Iodometano, 99 % (Sigma-Aldrich)
Carbonato de Potássio, P.A (Quimidrol)	Ácido bórico, P.A. (Vetec)
Cloreto de potássio, P.A. (Merck)	Hidróxido de sódio, P.A. (Vetec)
Anidrido acético, P.A. (Vetec)	Ácido butírico, P.A.
Ácido hexanoico, $\geq 99,5$ % (Aldrich)	Ácido octanoico, $\geq 99,5$ % (Vetec)
Ácido decanoico, $\geq 98,0$ % (Fluka)	Ácido dodecanoico, P.A. (Vetec)
Peróxido de hidrogênio, 30 % (Vetec)	Bicarbonato de sódio, P.A. (Vetec)
Ácido <i>meta</i> -cloroperbenzoico, 70-75 % (Acrós Organics)	Ureia-peróxido de hidrogênio, P.A (Aldrich)
Sílica para cromatografia em camada delgada, 60 Å, 700-800 mesh (Macherey-Nagel)	
Solventes	
Hexano, 98,5 % (Synth)	Clorofórmio, $\geq 99,8$ % (Synth)
<i>t</i> -Butanol, $\geq 99,0$ % (Vetec)	Éter <i>t</i> -butil metílico, $\geq 99,5$ % (Vetec)
Éter dietílico, $\geq 99,5$ % (Vetec)	Acetato de etila, P.A. (Reagen)
Diclorometano, $\geq 99,5$ % (Vetec)	Tetrahydrofurano, P.A. (F. Maia)
Acetona, P.A. (Carlo Erba)	Etanol, $\geq 99,5$ % (Synth)
Acetonitrila, $\geq 99,5$ % (Vetec)	Metanol, $\geq 99,8$ % (Cromoline)
Dimetilformamida, $\geq 99,0$ % (Grupo Química)	Dimetilsulfóxido, $\geq 99,0$ % (Grupo Química)
1,4-Dioxano, P.A. (Vetec)	Clorofórmio deuterado (CIL) ^(b)
Acetona deuterada (CIL) ^(b)	Metanol deuterado (CIL) ^(b)

(a) Distribuição isomérica: 65 % α (**74**), 20 % γ (**76**), 10 % β (**75**).

(b) Abreviatura para Cambridge Isotope Laboratories, Inc.

Adicionalmente, foram utilizadas as seguintes lipases, como biocatalisadores (**Tabela 06**).

Tabela 06. Lista de lipases e seus respectivos microrganismos de origem. ⁸⁶

Lipase	Microrganismo de origem	Atividade	Fornecedor
Lipozyme 435	<i>Candida antarctica</i>	10.000 PLU/ g ^(a)	Novozymes
Lipozyme RM IM	<i>Rhizomucor miehei</i>	5-6 BAUN/ g ^(b)	
LAY 30	<i>Candida rugosa</i>	30.000 u/ g ^(c)	
F-AP 15	<i>Rhizopus oryzae</i>	150 u/ mg ^(d)	
AK Amano 20	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	25.000 U/g ^(e)	
AYS	<i>Candida rugosa</i>	30.000 u/ g ^(f)	Amano
A Amano 12	<i>Aspergillus niger</i>	120.000 u/ g ^(g)	
AS	<i>Mucor javanicus</i>	15.000 u/ g ^(h)	
M Amano 10	<i>Mucor javanicus</i>	10.000 u/ g ⁽ⁱ⁾	
PS-C Amano I	<i>Burkholderia cepacia</i>	1.000 U/ g ⁽ⁱ⁾	
PS-C Amano II	<i>Burkholderia cepacia</i>	≥ 600 U/ g ⁽ⁱ⁾	
“Lipase”	<i>Candida cylindracea</i>	10 ⁶ U (6.10 ⁴ U/ mg _{sólido}) ^(l)	Sigma
Lipase tipo XII	<i>Chromobacterium viscosum</i>	10 ⁴ U (3.580 U/ mg _{sólido}) ^(l)	
Lipoprotein	[ficha técnica não encontrada]	3910 U/ mg _{sólido}	Genzyme

(a) Definido como a quantidade de enzima que libera um μmol de ácidos graxos por (minuto. Como substrato foi usado o laurato de propila.

(b) Definido como a velocidade inicial de incorporação do ácido decanoico nas posições 1,3 de triglicerídeo em óleo de girassol rico em oleato.

(c) Definido como a quantidade de enzima que libera 10 μmol s de ácido graxo (não-definido) por minuto a pH 7,0.

(d) Definido como a quantidade necessária para liberar 1,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$ de ácidos graxos de um triacilglicerol, a pH 7,2 e 37 °C.

(e) Definido como a quantidade de lipase que libera o equivalente a 01 μmol de ácidos graxos de azeite de oliva por minuto

(f) Método “LMAP”, não se descrevendo qual a reação empregada na ficha técnica.

(g) Método “Amano”, não se descrevendo qual a reação empregada na ficha técnica.

(h) “Atividade digestora de gordura”

(i) Método “M”, não se descrevendo qual a reação empregada na ficha técnica.

(j) Definido como a quantidade necessária para liberar $1,0 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ de acetato de 1-feniletila a partir da transesterificação do 1-feniletanol com acetato de vinila a 25°C .

(k) Uma unidade hidrolisa 01 microequivalente de ácido graxo de triglicerídeo de azeite de oliva por hora, em pH 7,2 a 37°C .

(l) Uma unidade hidrolisa 01 microequivalente de ácido graxo de triglicerídeo de azeite de oliva por hora, em pH 7,7 a 37°C .

Os seguintes equipamentos também foram utilizados, estando todos localizados no laboratório de Biotatálise (301/306):

- Agitador magnético/ chapa de aquecimento (Dist, MicroQuímica MQAMA302, Marte MAG01H);
- Balanças (Ohaus Adventurer, AND EK-200i);
- Mantas de aquecimento (Fisatom)
- Controladores de potência (MicroQuímica MQCPT2000P)
- Agitador orbital (Certomat MO);
- Banho termostatizado (Microquímica MQBTZ99-20);
- Rotaevaporador (Büchi 461);

Para obtenção e análise dos resultados, empregou-se o cromatógrafo a gás com detector por ionização de chama (CG-DIC) e coluna capilar da Agilent HP-5 ((5%-fenil)polisiloxano, de dimensões $30 \text{ m} \times 0,32 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$) localizado no laboratório de Biotatálise (Agilent, modelo 7820A), bem como o do laboratório multiusuário de analítica instrumental (Agilent, modelo 7890B), sendo as análises realizadas pelo autor ou por Juliano Alex Roehrs, técnico responsável no local.

Definiu-se a temperatura do injetor e detector em 280 e 300°C (respectivamente), utilizando uma rampa térmica durante a análise (80°C por 06 minutos, então $15^\circ\text{C}/\text{min}$ até 280°C , mantendo por 1 minuto), com fluxo de gás hidrogênio de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A amostra foi diluída em *n*-hexano grau HPLC, e $1,0 \mu\text{L}$ foi injetado manualmente, com *split* de 20:1.

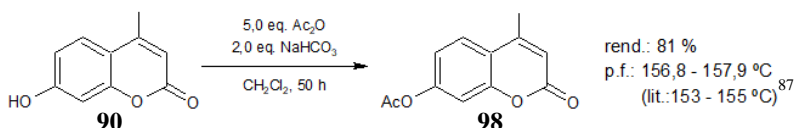
Fez-se também uso de aparelho de ponto de fusão (Microquímica MQAPF-302) e dos espectrômetros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H -RMN), de 200 MHz e 400 MHz (Bruker), e de infravermelho (IV, Bruker, modelo Alpha), localizados na Central de Análises do Departamento de Química, Grupo de Estudos de Materiais Poliméricos (Polimat) e no Laboratório de Química Orgânica (105/107).

4.2 Experimental

4.2.1 Preparo do 4-metil-7-acetoxicumarina (98)

Em um béquer de 50 mL, pesou-se 1,0 g de himecromona (**90**, 5,68 mmol), que foi transferida para um erlenmeyer de 250 mL e pipetou-se em seguida cinco equivalentes de anidrido acético (2,67 mL). Adicionou-se 25,0 mL de CH₂Cl₂, seguidos de dois equivalentes de NaHCO₃ (954,3 mg), previamente pesados em um béquer. O sistema foi colocado em agitação magnética à temperatura ambiente, acompanhando-se a reação por cromatografia em camada delgada (ccd). Após 50 h de reação, apenas um sinal era visível na revelação com iodo, indicando consumo total de reagentes (R_f = 0,67, CH₂Cl₂:AcOEt 4:1).

Após este tempo de reação, o material sólido foi filtrado e lavado com 3,0 mL de CH₂Cl₂. O meio orgânico então foi seco (MgSO₄), rotaevaporado e analisado por ¹H-RMN e IV para caracterização (**Esquema 21**).



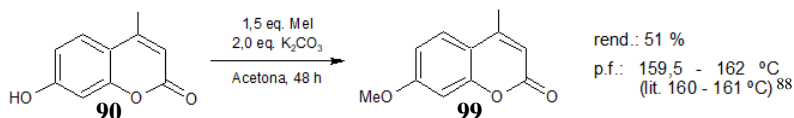
Esquema 21. Preparação do derivado acetilado (**98**) da himecromona (**90**).

4.2.2 Preparo do 4-metil-7-metoxicumarina (99)

Em um béquer, foram pesados 1,324 g de **90** (7,5 mmol), solubilizando em 15,0 mL de acetona e a solução foi transferida para um balão de fundo redondo, ao qual adicionaram-se dois equivalentes de K₂CO₃ (2,073 g) e 1,5 equivalentes de CH₃I (700 µL). Deixou-se em agitação magnética à temperatura ambiente por 48 h.

Após o tempo de reação, filtrou-se o meio reacional com papel pregueado, lavando o sólido com aproximadamente 2,0 mL de acetona e removendo o solvente sob pressão reduzida. Foram obtidos 0,73 g (rendimento de 51,0 %) de um sólido branco, sendo identificado como produto puro pelas técnicas de ¹H-RMN e IV, sem necessidade de purificação por cromatografia em coluna ou outra forma (**Esquema 22**).

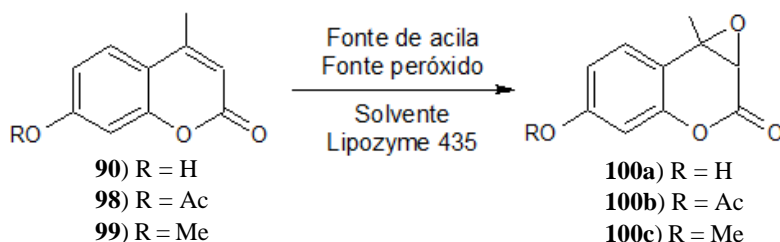
O resíduo sólido da reação foi filtrado e lavado com CH_2Cl_2 , obtendo-se 0,12 g adicionais de um sólido amarelo, constituído de uma mistura entre o produto **99** e o reagente **90**. Deve-se ressaltar que, em função da baixa massa de produto obtida neste resíduo e do processo não ter sido otimizado, optou-se por não se purificar este material.



Esquema 22. Preparação do derivado eterificado (**99**) de hymc (**90**).

4.2.3 Epoxidação quimio-enzimática dos compostos cumarínicos 90, 98 e 99 - Procedimento Geral

Utilizou-se 50,0 – 880 mg do derivado cumarínico (**90**, **98** ou **99**), dissolvendo-o em 15 – 25,0 mL de solvente orgânico (por exemplo, CH_2Cl_2 , CHCl_3 ou em acetonitrila), 1 – 4 equivalentes de ácido octanoico ou hexanoico, 1 ou 2 equivalentes de peróxido de hidrogênio (30 % em solução aquosa ou do aduto de uréia-peróxido de hidrogênio, UPH) e 30 - 100 mg de lipase de *C. antarctica* imobilizada comercialmente em resina aniônica (Lipozyme 435). O sistema foi colocado em frasco âmbar ou em erlenmeyer, sob agitação orbital a 250 rpm, a 35 °C por 24 ou 48 h (**Esquema 23**).



Esquema 23. Epoxidação quimio-enzimática dos derivados cumarínicos **90**, **98** e **99**.

Após o tempo de reação, fez-se a filtragem do material, e lavagem com ~ 30 mL de solução aquosa saturada de NaHCO_3 . A fase orgânica foi separada e seca, deixando-se evaporar no ambiente, para evitar uma eventual contaminação do rotaevaporador (sendo este

utilizado nos casos de solventes pouco voláteis, como acetonitrila) e o produto obtido analisado por $^1\text{H-RMN}$.

Como já citado, entre os parâmetros avaliados, estão o solvente orgânico empregado, ácido carboxílico (hexanoico ou octanoico), fonte de peróxido (H_2O_2 30 % ou UPH), tempo (24 – 48 h) e temperatura (25 – 35 °C). O detalhamento de cada experimento, será apresentado nos Resultados e Discussão.

4.2.4 Epoxidação química do α -terpineol (74)

Metodologia I

Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 1,29 g (8,39 mmol) de α -terpineol (**74**), resfriando em banho de gelo. Em um béquer, adicionou-se uma solução de 1,5 equivalentes de ácido *m*-cloroperbenzoico (*m*-CPBA, 2,17 g), em 15,0 mL de CH_2Cl_2 .

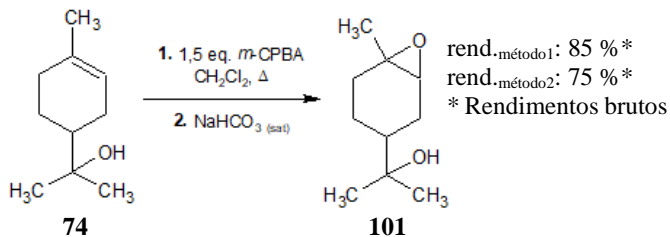
A solução de perácido foi então transferida para o balão reacional, com o auxílio de um funil simples, lentamente ao longo de 10 min, mantendo-se agitação manual. Após o término da adição, agitou-se por mais 2 min e removeu-se o banho de gelo.

O meio reacional foi lavado com duas alíquotas de 20,0 mL de solução saturada de NaHCO_3 . A fase orgânica foi coletada, seca e rotaevaporada, obtendo-se 1,21 g de óleo ligeiramente opaco, sendo este analisado por $^1\text{H-RMN}$ (rendimento = 85 %).

Metodologia II

Em um balão de fundo redondo, adicionou-se 1,29 g (8,34 mmol) de **74**, dissolvendo-o em 25,0 mL de CH_2Cl_2 . Em um béquer, pesou-se 1,5 equivalentes de *m*-CPBA (2,15 g), dissolvendo-o em 25,0 mL do mesmo solvente. Transferiu-se lentamente a solução de perácido ao balão reacional, adicionando em seguida pedaços de porcelana porosa. O sistema foi colocado em refluxo por 48 h, acompanhando-se por ccd ($R_f = 0,83$, acetona: CH_2Cl_2 1:1)

Após o término da reação, fez-se a extração com três alíquotas (10,0 mL, cada) de solução saturada de NaHCO_3 . A fase orgânica foi coletada, seca e rotaevaporada, obtendo-se 1,07 g de um líquido oleoso opaco, que foi analisado por $^1\text{H-RMN}$.



Esquema 24. Preparação via química do epóxido do terpineol (**101**).

Apesar da ccd indicar o consumo do alceno de partida, o tratamento do meio reacional foi feito apenas com lavagens de solução aquosa de bicarbonato de sódio saturado, o que se provou, pela análise do espectro de $^1\text{H-RMN}$, insuficiente para remoção de todo o ácido *m*-clorobenzoico residual. Uma solução seria empregar também lavagens com solução saturada de bissulfito de sódio, como citado anteriormente. Porém, deve-se considerar que o terpineol, e possivelmente o epóxido, são levemente solúveis em água (aproximadamente $2,5 \text{ g.L}^{-1}$).⁸⁹

Como alternativa, pode-se usar como padrão um espectro do epóxido **101** obtido via quimio-enzimática com conversão $>99 \%$, assemelhando a um padrão de via química. Esta proposta será abordada com mais detalhes nos Resultados e Discussão (item **5.1.1**, página 59).

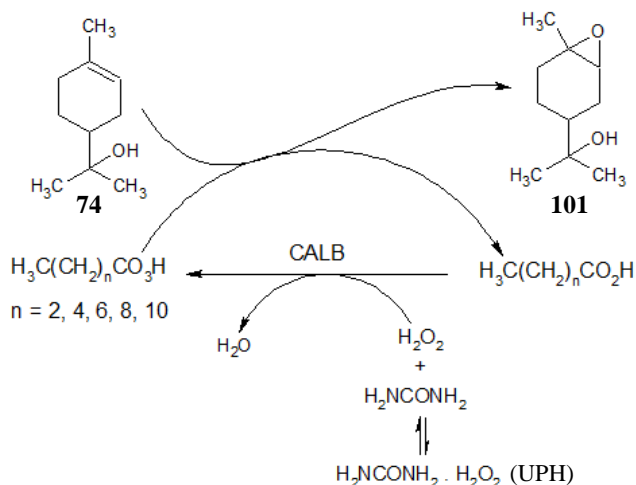
4.2.5 Epoxidação quimio-enzimática do α -terpineol (74)

Para uma reação típica, em um erlenmeyer, foram adicionados 500 mg de **74**, 01 equivalente de ácido hexanoico, 15,0 mL de CH_2Cl_2 , 30,0 mg de lipase (Lipozyme 435 ou de outra lipase) e 1,0 equivalente de UPH. O sistema foi colocado em frascos termostatizados, sob agitação magnética a 300 rpm (**Esquema 25**).

Após 6 h (com exceção do estudo de tempo), filtrou-se por gravidade a fase orgânica, posteriormente sendo extraída com 30,0 mL de solução aquosa saturada de NaHCO_3 (02 x 15,0 mL), seca com MgSO_4 anidro e deixado o solvente evaporar. A seguir a amostra foi analisada por $^1\text{H-RMN}$.

Entre os parâmetros avaliados, estão o tempo (1 – 24 h), solvente orgânico, fonte de lipase, diferentes proporções do α -terpineol e do ácido carboxílico ($\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O}_2$, $n = 4, 6, 8, 10, 12$). O detalhamento de cada experimento, será apresentado nos Resultados e

Discussão. Após o processo de otimização, os melhores resultados de conversão em produto foram obtidos ao se utilizar quantidade equimolar de ácido hexanoico como agente acilante, CH_2Cl_2 como solvente e 06 horas de reação, utilizando a Lipozyme 435 como catalisador.



Esquema 25. Epoxidação quimio-enzimática do α -terpineol (**74**).

4.2.6 Avaliação da solubilidade da himecromona (90)

Observando que **90** não era solúvel em CH_2Cl_2 , foram realizados testes de análises macroscópicas para selecionar qual solvente orgânico seria utilizado nas reações de epoxidação quimio-enzimática deste composto.

Em um tubo de ensaio, pesou-se uma pequena quantidade de **90** (~50 mg), adicionando em seguida ~450 mg de hexano (~0,5 mL), pesando-se o sistema. Utilizando uma pipeta, porções de 05 gotas do co-solvente (tetrahydrofurano, acetona ou acetonitrila) foram adicionadas, agitando-se então em vórtex e pesando-se novamente o conjunto, e fazendo nova adição enquanto **90** permanecia insolúvel.

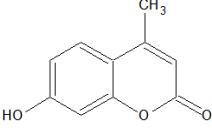
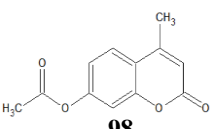
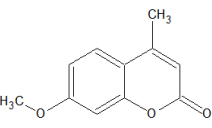
Para cada solvente, o limite do intervalo testado foi definido em função da formação de sistema bifásico, ou quando o co-solvente tornava-se o solvente principal ($\%_{m/m} > 50$).

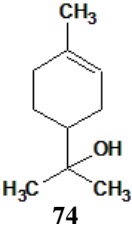
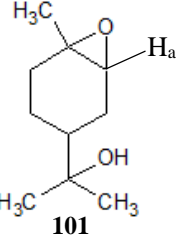
Os resultados da solubilidade de **90** serão apresentados e discutidos no item **5.2.1**, página 84.

4.3 Caracterização dos compostos

Na **Tabela 07** são compiladas as informações de caracterização dos compostos estudados neste trabalho. Os espectros de IV e ^1H -RMN serão apresentados e discutidos nos Resultados e Discussão (seções 5.1.1 e 5.2.1).

Tabela 07. Dados de caracterização dos compostos cumarínicos e terpênicos, relativos a **74** e **90**.

 <p style="text-align: center;">90</p>	<p>R_f: 0,38 (CH₂Cl₂:AcOEt 4:1_{v/v}) p.f.: 191-192 °C (lit.: 190-192 °C) ^{(a), 91}</p> <p>^1H-RMN (400 MHz, CD₃OD): ^{(b),(c)} δ 7.51 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 1H), 6.83 (dd, <i>J</i> = 8.7, 2.4 Hz, 1H), 6.76 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H), 6.08 (q, <i>J</i> = 1.1 Hz, 1H), 2.42 (d, <i>J</i> = 1.1 Hz, 3H).</p> <p>IV (pastilha KBr, cm⁻¹): ^{(b), (d), (e)} 1370 ($\delta_{\text{sm}}\text{CH}_3$, ms); 1451 ($\delta_{\text{asm}}\text{CH}_3$, ms); 1650 ($\nu\text{C}=\text{C}$, Fs); 1693 ($\nu\text{C}=\text{O}_{\text{lactona}}$, Fs); 2811 ($\nu\text{CH}_3$, fs); 3163 ($\nu\text{O}-\text{H}$, ml).</p>
 <p style="text-align: center;">98</p>	<p>R_f: 0,67 (CH₂Cl₂:AcOEt 4:1_{v/v}) p.f.: 156.8-157.9 °C (lit.: 153-155 °C) ^{(a), 87}</p> <p>^1H-RMN (200 MHz, Acetona-d₆) ^{(b), (c)} δ 7.81 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.16 (dd, <i>J</i> = 4.1, 2.2 Hz, 1H), 7.13 (d, <i>J</i> = 2.3 Hz, 1H), 6.30 (q, <i>J</i> = 1.3 Hz, 1H), 2.49 (d, <i>J</i> = 1.3 Hz, 3H), 2.31 (s, 3H).</p> <p>IV (pastilha KBr, cm⁻¹): ^{(b), (d), (e)} 1713-1727 ($\nu\text{C}=\text{O}_{\text{lactona}}$, Fs); 1766 ($\nu\text{C}=\text{O}_{\text{éster}}$, Fs); 1840 - 2200 (overtones); 2935 ($\nu\text{C}-\text{H}_{\text{olefina}}$, fs); 3053 ($\nu\text{C}-\text{H}_{\text{aromático}}$, fs).</p>
 <p style="text-align: center;">99</p>	<p>R_f: 0,29 (CH₂Cl₂:AcOEt 4:1_{v/v}) p.f.: 159.5-162 °C (lit.: 160-161 °C) ^{(a), 88}</p> <p>^1H-RMN (400 MHz, CDCl₃) ^{(b), (c)} δ 7.51 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 6.87 (dd, <i>J</i> = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 6.83 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 1H), 6.15 (q, <i>J</i> = 0.9 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 2.41 (d, <i>J</i> = 0.9 Hz, 3H).</p> <p>IV (pastilha KBr, cm⁻¹): ^{(b), (d), (e)} 857 ($\delta_{\text{oop}}\text{C}-\text{H}$, ms); 1071 ($\nu_{\text{sm}}\text{C}-\text{O}-\text{C}_{\text{éter}}$, ms); 1391 ($\delta_{\text{s}}\text{CH}_3$, ms); 1214 ($\nu_{\text{asm}}\text{C}-\text{O}-\text{C}_{\text{éter}}$, ms); 1609 ($\nu\text{C}=\text{C}$, Fs); 1726 ($\nu\text{C}=\text{O}_{\text{lactona}}$, Fs); 2853 ($\nu\text{CH}_3$, fs); 2921 - 2951 ($\nu\text{C}-\text{H}_{\text{olefina}}$, fs); 3070-3027 ($\nu\text{C}-\text{H}_{\text{aromático}}$, fs).</p>

 <p style="text-align: center;">74</p>	<p>Rf: ~0,63 (acetona:CH₂Cl₂ 1:1 v/v) CG^(f): tempo de retenção (Rt): 10.816 min</p> <p>¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): ^{(b), (c)} δ 5.38 (dd, 3.3, 1.4 Hz, 1H), δ 1.1 – 2.3, H alquílicos ^(g)</p> <p>IV (cela de Si, cm⁻¹): ^{(b), (d), (e)} 918; 1157 (νC-O_{álcool}, ms); 1440 (δC-H_{vinil}, ms); 2833 - 2889 (νC-H_{alquil}, ms); 2922 - 2966 (νC-H_{alceno}, ms); 3383 (νO-H_{intermolecular}, ml)</p>
 <p style="text-align: center;">101</p>	<p>Rf: ~0,83 (acetona:CH₂Cl₂ 1:1) CG^f: R_t = 12.194 min</p> <p>¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): ^{(b), (c)} δ 3.01 (t, 3.3, 5.3 Hz, 1H), δ 1.1 – 2.3, H alquílicos ^(g)</p> <p>IV (cela de Si, cm⁻¹): ^{(b), (d), (e), (h)} 609 (δ_{oop}O-H, ms); 1111 (ν_{asm}C-O-C_{éter}); 1176 (νC-O_{álcool}, ms); 1379 (δO-H_{ip}, ms); 2873 - 2962 (νC-H_{alquil+epóxido}, ms); 3421 (νO-H_{intermolecular}, ml)</p>

(a) Os pontos de fusão experimentais não foram corrigidos.

(b) Análises de dados fundamentadas no livro de identificação espectroscópica de SILVERSTEIN.⁹⁰

(c) Espectro de ¹H-RMN descrito em ppm, com tetrametilsilano (TMS) usado como referência.

(d) As bandas do espectro de IV têm os valores reportados em cm⁻¹, definindo-se também, sua intensidade (f, fraco; m, médio; F, forte), “espalhamento” (s, estreito; l, largo) e movimento relacionado (v: estiramento; δ: torção).

(e) Fonte: Spectra database⁹²

(f) Condições de análise do CG-DIC: 80 °C por 06 minutos, então 15 °C/ min até 280 °C, manter por 1 minuto. T_{injetor}: 280 °C, T_{detector}: 300 °C, fluxo de 1 mL/ min; coluna HP-5 ((5%-fenil)metilpolisiloxano).

(g) Não foi possível realizar a resolução e separação efetiva dos sinais sobrepostos, inviabilizando análise de acoplamentos e multiplicidade destes.

(h) Banda em 1712 cm⁻¹ referente à C=O de ácido hexanoico residual.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção do trabalho apresenta os resultados dos estudos da epoxidação quimio-enzimática do terpineol, himecromona e seus derivados. Para tal, fez-se a divisão em dois capítulos, sendo o primeiro correspondente a caracterização e estudos referentes a epoxidação quimio-enzimática do terpineol, tais como efeito do agente acilante, solvente e procedência da lipase.

No segundo, estará sendo apresentado a caracterização e os estudos referentes à himecromona (**90**) e seus derivados **98** e **99**, abordando as diversas reações de epoxidação que foram testadas.

Em ambos os estudos, utilizou-se principalmente a técnica de ^1H -RMN, tanto para determinação das conversões em produto das reações, quanto para caracterização dos compostos (reagentes e produtos).

Adicionalmente, utilizou-se de CG-DIC como técnica auxiliar em alguns estudos para a caracterização e cálculo de conversão, cujas condições de operação estão descritas no item **4.1**, página 51. Foram também obtidos e analisados os espectros de infravermelho para caracterização dos compostos.

5.1 Epoxidação quimio-enzimática do terpineol

5.1.1 Caracterização do terpineol 74 e do respectivo óxido 101

Antes de se preparar o epóxido, fez-se a caracterização do alceno de partida, no caso terpineol (**74**), principalmente para identificar o deslocamento do hidrogênio da insaturação, necessário para o cálculo da conversão através de ^1H -RMN (**Figura 09**).

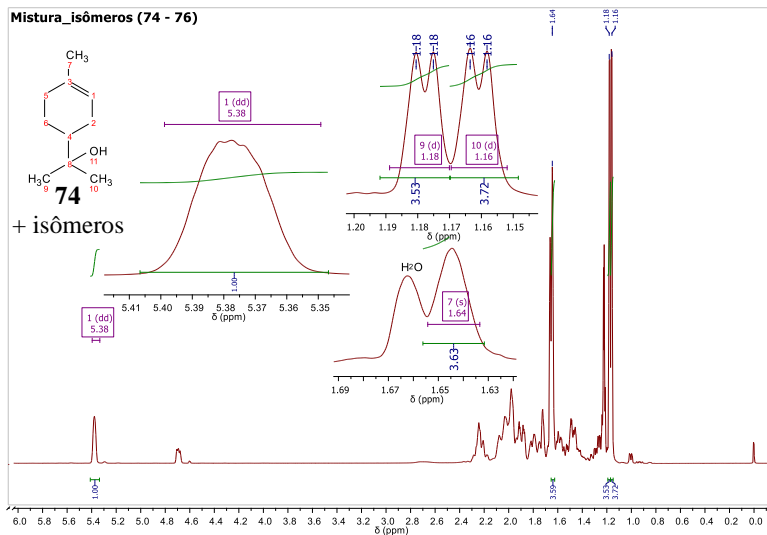


Figura 09. Espectro de ^1H -RMN do terpineol, como mistura de isômeros 74 – 76, com 65 % de 74 (400 MHz, CDCl_3).

Neste espectro, o hidrogênio pertencente a ligação $\text{C}=\text{C}$ apresenta um sinal em 5,38 ppm. Os outros picos, entre 1,2 e 2,4 ppm, correspondem aos prótons alifáticos, mas que, por semelhança magnética, não puderam ser distinguidos com a resolução disponível do aparelho.

Destes picos alifáticos, poder-se-ia inferir, com certa segurança, que os dupletos em 1,16 e 1,18 ppm, seriam referentes às metilas (C9 e C10) próximas à hidroxila, em função de sua área relativa em relação ao próton ligado ao alceno de aproximadamente 3:1.

Estas metilas, por não apresentarem hidrogênios na sua vizinhança, deveriam apresentar-se como simpletos. Ao serem observadas como dupletos, estes acoplamentos extras poderiam indicar tanto a presença de acoplamentos 4J com o hidrogênio de C4 (condizente pelas constantes de acoplamento na ordem de 2 Hz) ou serem resultantes de concentração elevada da amostra.⁹⁰

Sabendo ainda que este reagente é constituído de uma mistura de isômeros, apresentando sinais próximos, e que isto poderia gerar uma falsa interpretação de multiplicidade dos sinais, decidiu-se

utilizar um reagente com maior teor de alfa-terpineol, sendo este de 90 %. O espectro de ^1H -RMN de **74** está apresentado na **Figura 10**.

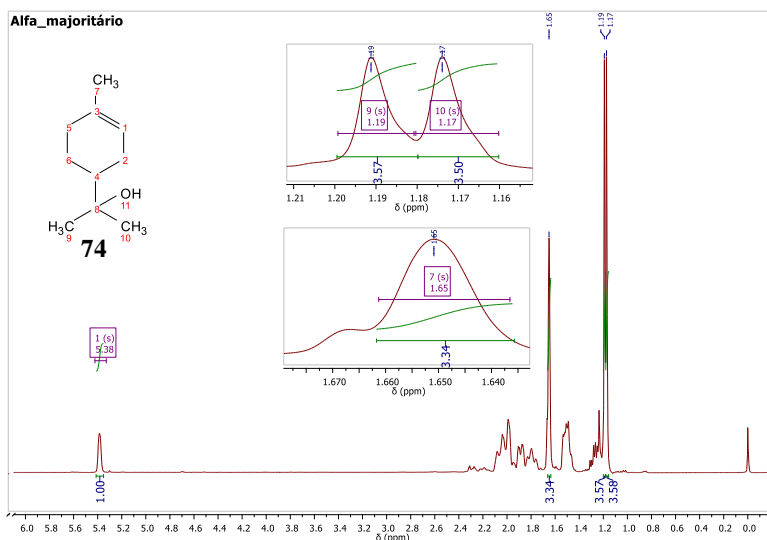


Figura 10. Espectro de ^1H -RMN do terpineol, sendo 90 % na forma alfa (**74**) (400 MHz, CDCl_3).

Neste espectro, com menos picos que o da **Figura 09**, comprovam-se os sinais definidos anteriormente para o hidrogênio da ligação C=C e as metilas, apesar da resolução ainda ser insuficiente para definir os outros hidrogênios. Este resultado, contudo, é esperado, em função da assimetria gerada pela presença do grupo 2-hidroxi-isopropílico. Este grupo é volumoso, favorecendo seu posicionamento em equatorial, aumentando a rigidez conformacional da molécula e diferenciando magneticamente os hidrogênios metilênicos geminais do cicloexeno (**Figura 11**).^{21,90}

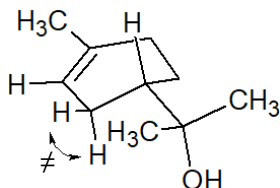


Figura 11. Representação tridimensional de **74**, com detalhe da não-equivalência magnética em hidrogênios metilênicos geminais.

Utilizando, então, este reagente, fez-se o preparo do correspondente epóxido, inicialmente utilizando *m*-CPBA, em função deste ser um reagente clássico e de fácil manuseio, como agente oxidante, como descrito em 4.2.4, página 54. Após separação do meio reacional, obteve-se o espectro de ^1H -RMN (Figura 12).

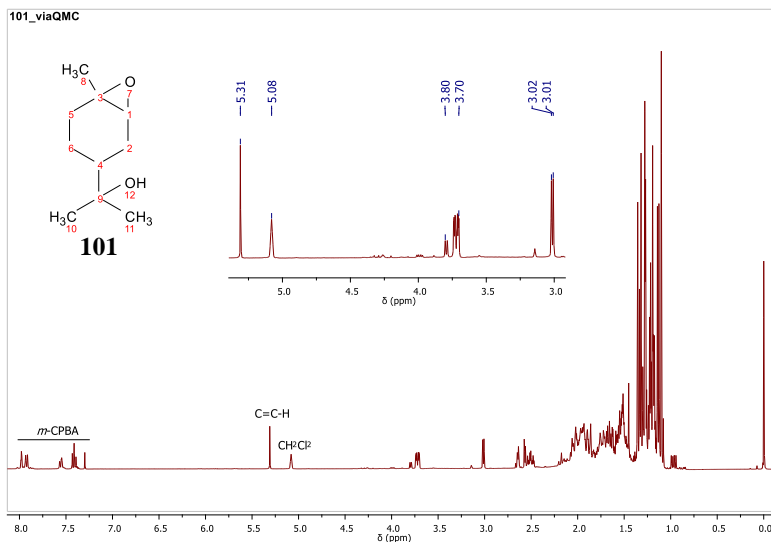


Figura 12. Espectro de ^1H -RMN do produto de reação de **74** com *m*-CPBA (400 MHz, CDCl_3). [Condições reacionais: **74** (8,3 mmol), *m*-CPBA (12,5 mmol), CH_2Cl_2 (50,0 mL), 48 h, refluxo]

Apesar do procedimento experimental desta reação ser simples, observam-se no espectro vários sinais de impurezas, mesmo após o devido tratamento pós-reacional. Destes sinais, alguns têm sua origem conhecida, como os de deslocamento entre 7,0 – 8,0 ppm, referente ao *m*-CPBA residual, que, apesar de poder ser removido com outras lavagens, este procedimento não foi realizado em função da solubilidade de **74** (e presumidamente **101**) no meio aquoso. Na região entre 1,0 – 2,0 ppm, além dos sinais alquílicos de **74** e **101**, também observam-se outros sinais de hidrocarbonetos, apesar da origem destes ser desconhecida. O sinal em 3,7 ppm também não pode ser identificado, e ressalta-se a presença do pico em 5,3 ppm, referente ao CH_2Cl_2 residual e em 5,1 ppm, do hidrogênio da ligação C=C de **74**, indicando que a reação não ocorreu totalmente.

Tentando evitar estes problemas de contaminação, preferiu-se então preparar o epóxido padrão através de uma reação quimio-enzimática, obtida após otimização das condições reacionais com a Lipozyme 435 (apresentada na sequência deste capítulo). Após separação e purificação, o epóxido **101** foi obtido com conversão > 99 %, e o espectro está apresentado na **Figura 13**.

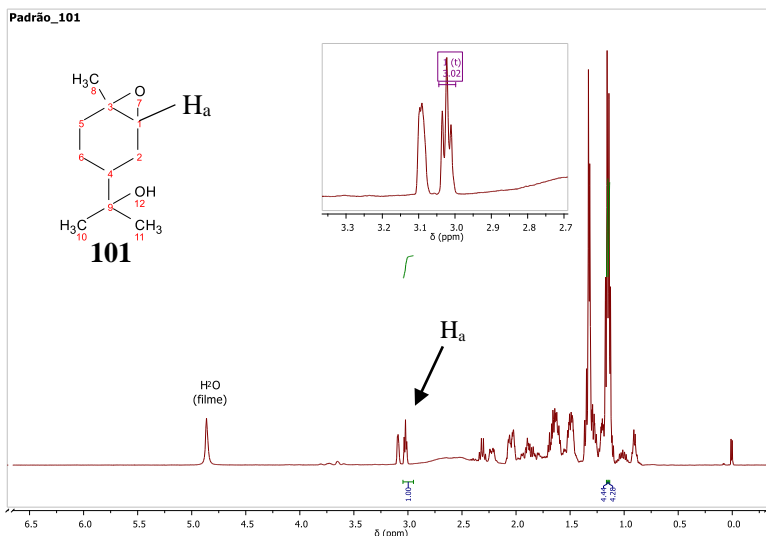


Figura 13. Espectro de ^1H -RMN de **101** obtido via epoxidação quimio-enzimática de **74** (400 MHz, CDCl_3). [Condições reacionais: **74** (3,24 mmol), ácido hexanoico (3,24 mmol), UPH (10,8 mmol), Lipozyme 435 (30 mg), CH_2Cl_2 (15,0 mL), 25 °C, 6 h, 300 rpm]

Neste espectro, a ausência de sinal do hidrogênio olefínico em 5,38 ppm indica o consumo de **74**, enquanto que o tripleto em $\delta = 3,0$ ppm, corresponderia ao próton ligado ao anel do epóxido, indicando a formação do produto **101**. Além disso, a ausência de sinais na região de 4,0 - 4,5 ppm confirma que não ocorreu a esterificação do ácido hexanoico (possível reação paralela biocatalisada) com o álcool, devido este ser terciário e impedido por efeito estereo, tornando-o pouco reativo para reações de esterificação.⁰⁷

Para o cálculo das conversões, considerou-se a porcentagem relativa à área do sinal do hidrogênio do epóxido ($\delta \approx 3,00$ ppm) em relação a do terpeno de partida ($\delta \approx 5,4$ ppm), como demonstrado na **Figura 14**.⁹⁰

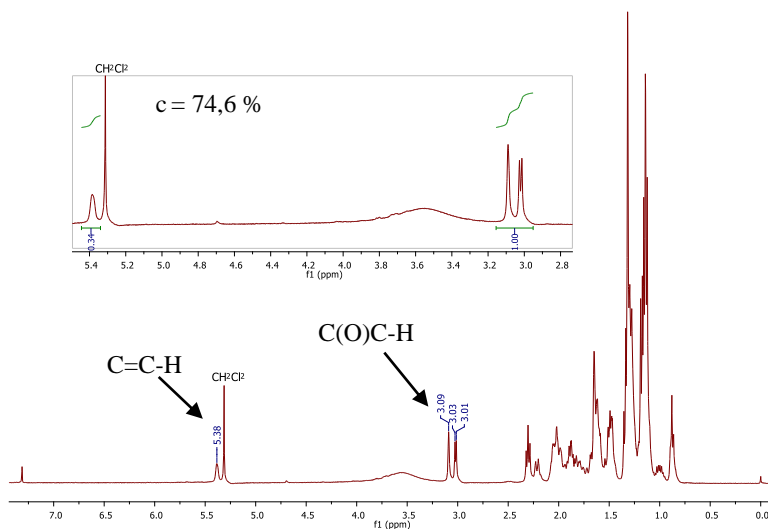


Figura 14. Exemplo para o cálculo da conversão em **101** utilizando ¹H-RMN de uma reação típica de epoxidação de **74** (400 MHz, CDCl₃). [Condições reacionais: **74** (3,24 mmol), ácido octanoico (3,24 mmol), UPH (10,8 mmol), Lipozyme 435 (30 mg), CH₂Cl₂ (15,0 mL), 25 °C, 6 h, 300 rpm]

Adicionalmente ao RMN, fez-se uso de CG para auxiliar a determinar a formação de produto. A mistura isomérica de terpineol (65 % de **74**, empregada inicialmente) foi analisada, e comparando as áreas relativas com composição informada pelo fabricante (seção **4.1**, página 49), fez-se a determinação dos tempos de retenção para cada isômero, sendo estes de 10,8, 10,1 e 10,9 min para as formas α , β e γ , respectivamente (**Figura 15**).

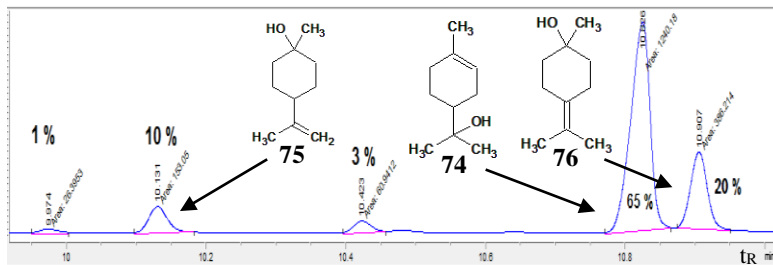


Figura 15. Cromatograma de CG-DIC do terpineol na sua mistura de isômeros. [Condições de análise descritas na página 51]

Fez-se então a análise por CG de **74** com pureza de 90 %, onde o componente minoritário constitui-se unicamente de **76**, obtendo o cromatograma da **Figura 16a**, no qual se observa boa repetitividade nos tempos de retenção em relação à mistura isomérica.

Comparando este cromatograma com o obtido após a reação de epoxidação quimio-enzimática (**Figura 16b**), pode-se observar o consumo total do terpineol **74**, e a presença do pico do epóxido **101** em $T_R = 12,2$ min.

Nota-se também a ausência do pico correspondente à **76**, indicando a possível formação do correspondente epóxido. Este epóxido, entretanto, é tetrassubstituído e não apresenta sinais no ^1H -RMN na região de caracterização do grupo ($\delta \approx 3,0$ ppm). Portanto, o pico em 3,0 ppm deve corresponder unicamente ao epóxido **101** derivado de **74**, não inviabilizando a análise das conversões de **74** através desta técnica.

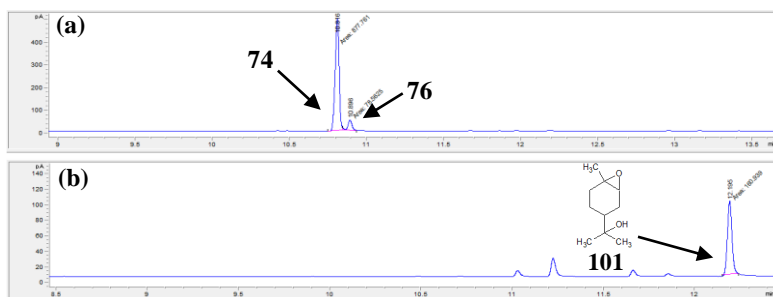


Figura 16. Cromatogramas de CG-DIC de a) terpineol (isômero α , 90 %) e b) Produto de reação quimio-enzimática. Condições de análise descritas na pág. 51. [Condições reacionais: **74** (3,24 mmol), ácido hexanoico (3,24 mmol), UPH (10,8 mmol), Lipozyme 435 (30 mg), CH_2Cl_2 (15,0 mL), 25 °C, 6 h, 300 rpm].

Apesar do CG-DIC ser uma técnica auxiliar importante (e viável) para confirmação dos resultados obtidos com $^1\text{H-RMN}$, esta não foi usada ao longo do trabalho devido a problemas relacionados ao equipamento.

Obteve-se também o espectro de IV do terpineol, onde foram observadas algumas bandas para caracterização dos principais grupos funcionais. Entre as mais importantes, tem-se a de estiramento de O-H da hidroxila ($\sim 3380\text{ cm}^{-1}$) e de C-H de alcanos e alcenos ($2830\text{-}2966\text{ cm}^{-1}$). Em função do comprimento da ligação C-H de alcenos ser menor (mais energética) que dos alcanos, a banda de IV correspondente ao alceno apresenta um número de onda maior. Contudo, neste caso, apresenta-se juntamente a dos alcanos. A presença da ligação C=C também pode ser confirmada através da banda referente à torção C-H vinílica em 1440 cm^{-1} , presente (como fragmento) na molécula (**Figura 17**). Estes dados são concordantes com os citados na literatura para estes grupos funcionais.^{20,90}

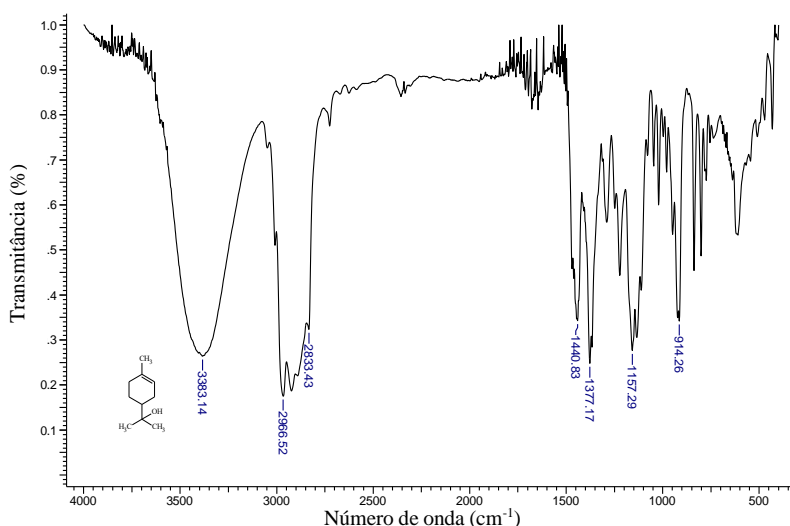


Figura 17. Espectro de IV do alfa-terpineol (**74**, 90 %) (filme sobre cela de Si).

No espectro do correspondente epóxido, tem-se a presença de algumas bandas observadas no reagente, tais como as de hidroxila ou da cadeia alifática, em ~ 3420 e $\sim 2870\text{ cm}^{-1}$, respectivamente. (**Figura 18**).

As bandas observadas entre ~ 2830 e ~ 2970 cm^{-1} correspondem aos estiramentos simétricos e assimétricos de metilas e metilenos de ciclos não-tensionados, não sendo possível discerni-los em função da sobreposição dos sinais.⁹⁰

A formação do epóxido também foi comprovada pela presença de bandas na região entre 810-950 e em ~ 1250 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento simétrico e assimétrico do heterociclo. A banda em 1712 cm^{-1} (região típica de carbonilas), por sua vez, é provavelmente originada devido ao ácido hexanoico residual, cujos sinais no ^1H -RMN apresentam-se entre os sinais alifáticos do anel do ciclohexano de **74**, dificultando o discernimento destes e a efetiva caracterização, sendo que estes valores reportados estão em acordo com a literatura.⁹⁰

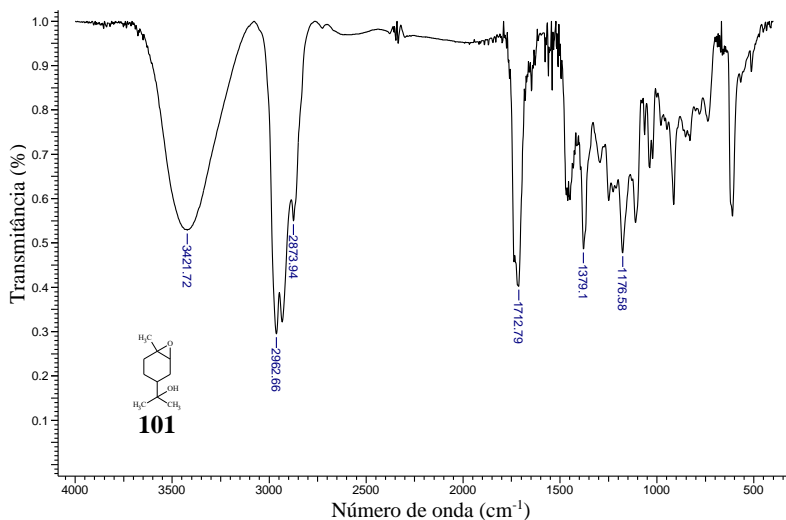
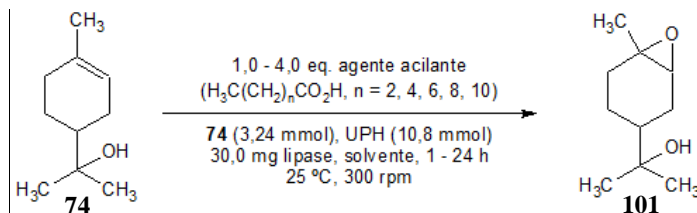


Figura 18. Espectro de IV do α -terpineol epoxidado (**101**) (filme sobre cela de Si).

Com ambos reagente e produto caracterizados, a seguir serão descritos os estudos da epoxidação quimio-enzimática, onde se fez a otimização univariada de alguns parâmetros reacionais, sendo estes a origem da lipase, agente acilante empregado (e de forma mais extensa a sua proporção em relação ao alceno), tempo de reação e o solvente orgânico. As diversas condições testadas, estão compiladas de forma genérica no **Esquema 26**.



Esquema 26. Epoxidação quimio-enzimática de **74** em diferentes condições reacionais.

5.1.2 Influência da procedência da lipase

Nos primeiros estudos de epoxidação quimio-enzimática de **74**, avaliou-se a diversidade de lipases que poderiam catalisar esta reação, variando-se a procedência destas. A escolha das enzimas avaliadas, em sua maioria, foi baseada no uso destas lipases na epoxidação quimio-enzimática do α -pineno, β -pineno, 3-careno, citrionelal, eugenol e β -cariofileno (também pertencentes a classe dos terpenos), como os realizados por Münsfelt e Silva.^{93,94}

Inicialmente, os reagentes foram utilizados em quantidades equivalentes. Os resultados de conversão ao correspondente epóxido estão apresentados na **Tabela 08**.

Tabela 08. Influência da procedência da lipase na epoxidação de **74**.^(a)

Entrada	Enzima	Conversão (%) ^b
1	Lipozyme 435	> 99
2	Lipozyme RM IM	n.d.
3	AK Amano 20	n.d.
4	AY Amano 30	n.d.
5	AYS	n.d.
6	F-AP15	n.d.
7	A Amano 12	n.d.
8	AS	n.d.
9	M Amano 10	n.d.
10	PSC Amano I	n.d.
11	PS-C Amano II	n.d.
12	<i>Candida cylindracea</i> ^(c)	n.d.
13	<i>Chromobacterium viscosum</i> ^(d)	n.d.
14	Lipoprotein da Genzyme	>99
15	--- // --- (reação controle)	n.d.

(a) Condições reacionais: **74** (3,24 mmol), ácido hexanoico (3,24 mmol), UPH (10,8 mmol), lipase (30 mg), CH_2Cl_2 (15,0 mL), 25 °C, 6 h, 300 rpm. (b) Determinada por ¹H-RMN. (c) Utilizou-se 18,0 mg, correspondente a uma única reação. (d) Utilizou-se 3,4 mg, correspondente a uma única reação. n.d.: não detectado.

De todas as reações testadas, apenas aquelas utilizando a Lipozyme 435 e a Lipoprotein da Genzyme formaram o epóxido **101** de forma satisfatória (entradas 1 e 14). Resultados similares foram obtidos por Münsfelt na tentativa de epoxidar o α -pineno, onde apenas as lipases 435 e RM IM foram eficazes. Entretanto, o tempo de reação foi maior (8 h) e as conversões moderadas ou baixas, sendo de 60,0 e 9,0 % ao se utilizar a Lipozyme 435 e a RM IM, respectivamente.⁹³

No trabalho de Silva, as lipases AK Amano 20, AY Amano 30, AYS e F-AP15 foram empregadas para epoxidação do β -cariofileno, na forma livre e imobilizada (com objetivo de preservar a enzima em meio orgânico). Neste estudo, após 24 h, todas as reações apresentaram conversões baixas (2 - 15 % quando a enzima foi imobilizada e de 3 - 25 % na forma livre).⁹⁴ De forma comparativa e com o relato da formação de produto com a enzima livre, descarta-se a inativação destas, em função do solvente, na reação desenvolvida no trabalho atual.

Os resultados obtidos não indicam a correlação entre atividade e conversão ao produto **101**. Na reação controle, ou seja, na ausência de lipase, não foi observada a formação de produto. Portanto, apesar da escolha da lipase ser limitada, esta é indispensável para o sucesso da reação.

Para os próximos estudos, utilizou-se então a Lipozyme 435, em função da excelente conversão obtida e pela pequena quantidade em estoque da Lipoprotein da Genzyme. Porém, salienta-se que a Lipoprotein da Genzyme estava estocada por ~20 anos, indicando a alta atividade e estabilidade por um longo período de tempo.

5.1.3 Influência do agente acilante (e sua proporção)

As lipases são seletivas com relação ao tamanho da cadeia alquílica dos agentes acilantes, em função da “eficiência” que estas interagem com o sítio-ativo. Avaliou-se então o efeito do ácido carboxílico empregado, variando o tamanho de sua cadeia e a proporção deste em relação ao terpineol (**74**), considerando que a formação do perácido depende da concentração de ácido carboxílico.⁰⁷

Neste estudo, foram usados os ácidos butanoico, hexanoico, octanoico, decanoico e dodecanoico nas proporções de 1:1, 1:2 e 1:4 com relação ao terpineol. Os dados de conversão ao epóxido **101** estão apresentados na **Tabela 09**.

Tabela 09. Conversão do terpineol **74** em seu epóxido **101** em função do agente acilante e usando diferentes proporções em relação a **74**. ^{(a), (b)}

Ácido carboxílico	Proporção (mols) 74 : ácido carboxílico		
	1:1	1:2	1:4
Butanoico	67,6	85,5	98,7
Hexanoico	> 99	> 99	> 99
Octanoico	73,3	63,8	74,6
Decanoico	53,0	78,7	83,5
Dodecanoico	63,1	81,2	>99

(a) Condições reacionais: **74** (3,24 mmol), UPH (10,8 mmol), Lipozyme 435 (30 mg), CH₂Cl₂ (15,0 mL), 25 °C, 6 h, 300 rpm. (b) Conversão determinada por ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃).

Ao usar ácido butanoico e dodecanoico, observaram-se conversões ao produto **101** entre ~60 e >99 %. Empregando-se o ácido decanoico, foram obtidas conversões entre ~50 e ~85 %. Nestes casos, as conversões observadas foram de moderadas a boas, aumentando de forma diretamente proporcional à quantidade de ácido carboxílico utilizada.

Entretanto, ao usar o ácido hexanoico, não foi observada variação na conversão ao epóxido para todas as proporções entre **74** e o doador acila, sendo em todos os estudos >99 %. Ao usar o ácido octanoico, as conversões foram menores (63,8 – 74,6 %), e também não apresentaram grande influência em relação a quantidade de agente acilante.

Observa-se portanto, que a proporção empregada do agente acilante é um fator preponderante na efetividade da conversão ao produto. Porém, esta influência pode ser menor nos casos onde há melhor interação da cadeia alquílica com o sítio-ativo da enzima; haja vista as conversões similares para os ácidos hexanoico e octanoico.

Estes resultados são similares ao reportado por Münsfelt para a epoxidação do α -pineno, empregando uma série de ácidos *n*-alquílicos com cadeia carbônica entre 02 e 18 carbonos como agentes acilantes. Entre os ácidos utilizados, o melhor resultado também foi obtido com o ácido hexanoico (~60 %), havendo uma diminuição na conversão ao produto ao se utilizar os ácidos octanoico (C₈H₁₆O₂) e decanoico (C₁₀H₂₀O₂).⁹³

Adicionalmente aos dados de conversão obtidos, notou-se que o emprego de ácidos carboxílicos de cadeia longa (decanoico e dodecanoico) forma emulsões durante o tratamento com solução aquosa de NaHCO_3 , em função do seu caráter anfifílico em meio básico, com propensão a formação de sais de ácidos carboxílicos de cadeias longas (sabões).

Desta forma, decidiu-se por utilizar o ácido hexanoico em quantidade equimolar a **74**, onde foram obtidas excelentes conversões (>99 %). Nestas condições, também evita-se o desperdício de reagentes.

5.1.4 Influência do tempo de reação

Nos estudos relatados até o momento, puderam ser observadas excelentes conversões ao epóxido **101**, sendo em alguns casos, de até >99 %, em 6 h de reação. Na tentativa de aumentar a eficiência do processo, foi verificado se estes valores podiam ser obtidos em tempos menores. Os resultados de conversão em função do tempo estão apresentados na **Figura 19**.

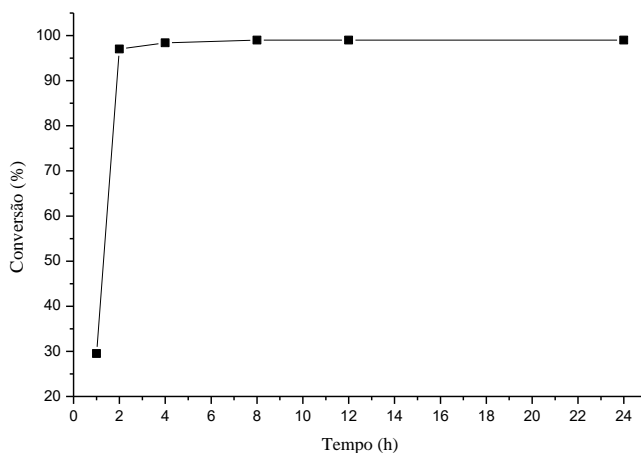


Figura 19. Influência do tempo para a preparação do epóxido do terpineol (**101**). [Condições de reação: **74** (3,24 mmol), ácido hexanoico (3,24 mmol), UPH (10,8 mmol), Lipozyme 435 (30 mg), CH_2Cl_2 (15,0 mL), 25 °C, 300 rpm. Conversão determinada por $^1\text{H-RMN}$]

Após 1 h de reação, a conversão ao epóxido foi de 29,5 %, e após 2 e 4 h foram de 97,0 e 98,4 %, respectivamente. A variação

elevada na conversão observada entre 1 - 2 h de reação pode ser justificada considerando que neste intervalo está inserido o tempo necessário para se alcançar o equilíbrio, e só então ocorrer saturação do complexo enzima-substrato.¹⁹

As reações realizadas entre 8 - 24 h, tempos maiores que o utilizado anteriormente, tiveram o intuito de testar a degradabilidade do produto (como por exemplo, abertura do anel). As conversões foram >99 %, e portanto esta hipótese foi afastada, comprovando a alta estabilidade de **101** nas condições reacionais.

Em 4 h de reação, a conversão foi de 98,4 %, um pouco menor que a obtida em 6 h (>99 %). Entretanto, ao ser considerado o erro intrínseco à técnica, ambos os valores praticamente equivalem-se. Considerando a pequena diferença de tempo e os resultados obtidos, preferiu-se empregar 6 h para o próximo estudo, que está relacionado ao efeito do solvente orgânico.

5.2.4 Influência do solvente orgânico

Após o estudo do tempo de reação, fez-se a avaliação do solvente orgânico empregado em função destes terem efeito considerável na capacidade catalítica da enzima. Para medir quantitativamente a polaridade de solventes, Laane *e col.* os classificaram em função da partição destes no sistema 1-octanol-água, definindo como $\log P$. Através deste parâmetro, observou-se que enzimas apresentam atividade mediana nos solventes com $\log P$ entre 2,0 e 4,0 e elevada quando $\log P > 4,0$, enquanto que solventes de $\log P < 2,0$ causam distorções na enzima e podem remover a água essencial, reduzindo a atividade enzimática.⁹⁵

Esta observação está de acordo com a propriedade da “tampa” presente em algumas lipases, como a Lipozyme 435, empregada na reação estudada, que por ser lipofílica, o acesso dos reagentes ao sítio ativo é facilitado na presença de solventes apolares.^{7,24}

No estudo de Skjøt *e col.*, por exemplo, observou-se que ao usar a CALB obtiveram-se conversões moderadas ou satisfatórias na hidrólise em meio aquoso de uma série de ésteres alifáticos, tais como benzoato de etila, (*R,S*)-2-fenilpropanoato de etila e acetato de (*R,S*)-2-etilexila (conversões de 91, 41 e 58 %, respectivamente), mas com baixa enantiosseletividade ($E = 1,1; 1,0$ e 3,9). Ao ser realizada a esterificação do (*R,S*)-3-hexanol para o respectivo acetato, utilizando

a mesma enzima e em hexano, obteve-se o produto com ótica enantiosseletividade ($E > 50$).²³

Os resultados obtidos de conversão ao produto **101**, em função do solvente, são descritos na **Tabela 10**.

Tabela 10. Influência do solvente orgânico para a preparação de **101**.^(a)

Entrada	Solvente orgânico	Log <i>P</i>	Conversão (%) ^(b)
01	Heptano	4,0	9,9
02	Hexano	3,5	n.d.
03	Ciclohexano	3,2	14,5
04	Tolueno	2,5	45,6
05	CHCl ₃	2,0	47,6
06	<i>t</i> -BuOH	1,45	8,2
07	CH ₂ Cl ₂	1,25	>99,0
08	MTBE	0,94	30,6
09	DEE	0,85	71,1
10	AcOEt ^(c)	0,68	95,2
11	THF	0,49	5,7
12	Acetona	-0,23	8,0
13	MeCN	-1,0	>99,0
14	DMF	-1,0	n.d.
15	1,4-Dioxano	-1,1	26,5
16	DMSO	-1,3	n.d.

(a) Condições da reação: **74** (3,24 mmol), ácido hexanoico (3,24 mmol), UPH (10,8 mmol), Lipozyme 435 (30 mg), solvente (15,0 mL), 25 °C, 6 h, 300 rpm. (b) Determinada por ¹H-RMN. (c) Neste caso, não foi usado ácido hexanoico. n.d.: não-detectado.

Entre os solventes testados, as conversões em **101** foram baixas ao usar tanto solventes polares, como acetona (8,0 %, log *P* = -0,23) e THF (5,7 %, log *P* = 0,49), quanto alguns apolares como heptano (9,9 %, log *P* = 4,0) e ciclohexano (14,5 %, log *P* = 3,2). O epóxido **101** não foi detectado ao usar hexano, dimetilformamida ou dimetilsulfóxido (log *P* = 3,5, -1,0 e -1,3, respectivamente), sendo que ao usar estes dois últimos, houve dificuldade em isolar o resíduo reacional. Não foi observado, então, aparente correlação entre a polaridade do solvente e a conversão a **101**.

Resultados medianos e satisfatórios foram obtidos ao utilizar solventes de polaridade moderada com log *P* entre 0,68 e 2,5, entre estes o tolueno (45,6 %, log *P* = 2,5), CHCl₃ (47,6 %, log *P* = 2,0),

éter etílico (71,1 %, $\log P = 0,85$) e éter *t*-butilmetílico (30,6%, $\log P = 0,94$). Contudo, neste grupo, apenas ao se usar CH_2Cl_2 é que a conversão foi >99 %.

Dos solventes polares ($\log P < 2,0$) testados, a conversão observada na reação realizada em acetonitrila foi uma exceção, sendo ótima (>99 %). Como explicação, sugere-se que esta, ao solubilizar a ureia, libera uma maior quantidade (mas ainda aceitável) de H_2O_2 no meio, aumentando sua concentração e deslocando o equilíbrio químico em direção a formação do peroxiácido.

De modo geral, os resultados observados seguem um comportamento esperado, dadas as interações que estes solventes apresentam com a enzima e com os reagentes. O hexano, por exemplo, interage apenas hidrofobicamente com a lipase, acarretando em uma rigidez estrutural desta e dificultando a entrada de reagentes no sítio-ativo, apesar da conformação mais acessível em função do deslocamento da “tampa”. Os solventes muito polares/ hidrofílicos podem tanto remover a “água essencial” da enzima ou aumentar demasiadamente a liberdade conformacional desta, alterando a estrutura tridimensional do sítio-ativo, inativando-o.⁰⁷

^A baixa conversão observada ao se utilizar *t*-BuOH (8,2 %, $\log P = 1,45$), poderia ser justificada ao se avaliar o mecanismo da reação de Prilezhaev (**Esquema 09**, página 34), onde se observa a formação de um estado de transição polar, cuja estabilização reduz sua energia, favorecendo a formação do produto. Como o *t*-BuOH é estericamente impedido, prejudica-se a estabilização do estado de transição, e por conseguinte desfavorece a síntese.²⁰ Contudo, ao se comparar este solvente com o MTBE, onde a conversão foi relativamente maior (8,2 vs. 30,6 %, respectivamente), sugerir-se-ia a existência de um efeito causado pelo solvente ser prótico ou não, podendo, por exemplo, estabilizar mais os reagentes (como a ácido carboxílico ou o peroxiácido) do que o estado de transição, também desfavorecendo a formação do produto.²⁰

Confirma-se então que solventes razoavelmente polares sejam os mais recomendados, com ressalvas aos casos que causem a remoção da água essencial ou desestruturação da lipase e/ou estado(s) de transição, como comentado acima.

De forma complementar, a avaliação do solvente empregado pode ser também realizada em função de um parâmetro verde, de acordo com um estudo realizado pela empresa farmacêutica

GlaxoSmithKline, inicialmente publicado em 1999 (à época, SmithKline Beecham) e recentemente atualizado.⁹⁶

Através deste parâmetro, diversas variáveis são compiladas em um valor quantificado, entre elas, o resíduo gerado (e seu tratamento), impacto ambiental, riscos à saúde e à segurança.

Com exceção da própria água, a classe de álcoois apresenta-se como uma das mais verdes. Entretanto, poderiam gerar o produto de esterificação, dada as condições reacionais empregadas neste trabalho (onde ácidos carboxílicos são agentes acilantes).

O CH_2Cl_2 , da classe dos compostos halogenados, por sua vez, é considerado um solvente “problemático”, principalmente pela necessidade de ser incinerado após o uso e por ser altamente volátil. Contudo, possui excelente reciclabilidade, com impacto ao meio aquático e à saúde toleráveis. O hexano (relativamente melhor avaliado), por comparação, apresenta excelente combustão (eficiência energética), mas falha nos quesitos de impacto aquático, à saúde e inflamabilidade de forma equiparável ou pior que o CH_2Cl_2 .⁹⁶

Considerando os solventes tipicamente disponíveis de um laboratório e a inviabilidade de empregar álcoois na reação estudada, o CH_2Cl_2 apresenta-se como um solvente razoável (ou bom, relevado o problema de incineração). Porém, o acetato de etila, no aspecto ambiental, é melhor que o solvente halogenado em praticamente todos os aspectos, excetuando a reciclabilidade. Sendo mínima a diminuição da conversão a produto nos casos destes solventes (>99 vs 95,2 %), conclui-se que o acetato de etila é o melhor solvente para a reação estudada, além de dispensar o uso do ácido carboxílico como aditivo (o solvente então, passa a ser solvente e reagente, como evidenciado no **Esquema 11**, página 36).

Terminados os testes com o α -terpineol (**74**), iniciaram-se então os estudos referentes aos derivados cumarínicos.

5.2 Estudos da epoxidação quimio-enzimática da himecromona e derivados

5.2.1 Caracterização da himecromona (90) e seus derivados

De maneira similar, para a caracterização da himecromona (**90**) e para os derivados **98** e **99** foram usados os mesmos métodos espectroscópicos usados na caracterização do terpineol (**74**) e do correspondente epóxido **101**.

Contudo, em função do elevado ponto de fusão/ebulição de **90**, **98** e **99**, não se pode aplicar a técnica de CG. Tentativas de analisar estes compostos, usando os mais diversos programas de temperatura e fluxo, resultaram apenas em um pico mal resolvido e de cauda longa.

Obteve-se então, inicialmente, o espectro de ^1H -RMN de **90** em metanol deuterado (**Figura 20**).

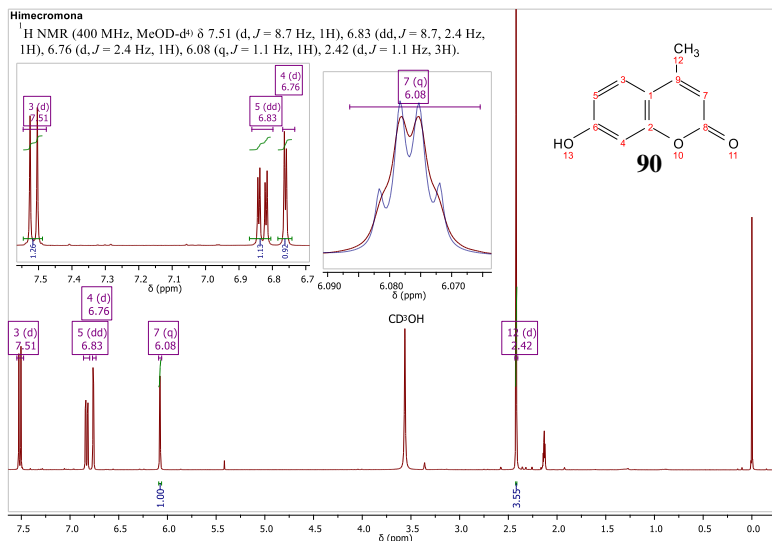


Figura 20. Espectro de ^1H -RMN de **90**; na expansão de H7, observa-se em azul a análise do sinal do hidrogênio olefínico por deconvolução global espectral (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$).

Em função da planaridade e rigidez da molécula, acoplamentos 4J podem ser observados, tal qual o pequeno desdobramento no pico em 2,42 ppm, correspondente aos hidrogênios da metila, que se apresenta como duplete com $J = 1,1$ Hz, acoplando com o H7 do alceno ($\delta = 6,08$ ppm), estando estes valores de acoplamento e deslocamento concordantes com a literatura.⁹⁰

Este acoplamento de longa distância também foi útil para definir os sinais de H3-5 aromáticos (6,7 a 7,6 ppm). Assinala-se o duplo duplete em 6,83 ppm a H5, o único possível a ter dois acoplamentos distintos. Os dupletos restantes são definidos em função da constante de acoplamento com H5, sendo que o pico em 6,76 ppm, com constante de menor valor ($^4J = 2,4$ Hz) se refere ao H4, mais distante de H5; H3 corresponde ao pico em 7,51 ppm ($^3J = 8,7$ Hz).

Destes sinais observados, as áreas relativas (utilizando H7 como referência) apresentam valores dentro do esperado, sendo de 3,55 para os hidrogênios da metila ($3H_{12}$) e entre 0,92 – 1,26 para os hidrogênios arílicos ($3H_{3-5}$). O próton do OH fenólico, por sua vez, está em troca rápida com o solvente empregado, não apresentando sinais no espectro.

Sendo este um composto comercial e conhecido, o espectro de IV de **90** foi obtido da base de dados do Instituto Nacional de Ciência Industrial Avançada e Tecnologia (AIST), e está apresentado na **Figura 21**.⁹²

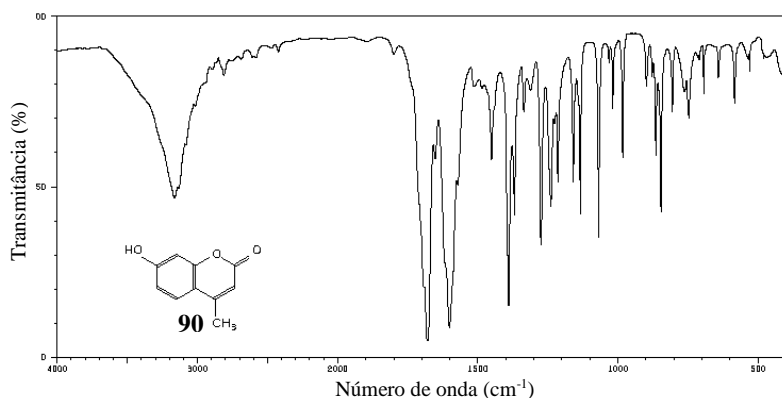


Figura 21. Espectro de IV de **90** (pastilha de KBr).⁹²

Entre as bandas mais importantes, destacam-se as de estiramento de O-H (3160 cm^{-1}), C-H_{CH₃} (2811 cm^{-1}), C=O de δ -lactona (1690 cm^{-1}) e da ligação C=C (1650 cm^{-1}). Com o reagente caracterizado, pode-se preparar alguns derivados e, sequencialmente, realizar a sua caracterização.

Inicialmente fez-se a preparação do derivado **98** a partir da acetilação do grupo fenólico de **90** utilizando um excesso de anidrido acético e NaHCO₃ para formar o íon fenolato, como descrito no item **4.2.1**, página 52. Este composto foi obtido com 80,6 % de rendimento e tem ponto de fusão de $156,8 - 157,9\text{ }^{\circ}\text{C}$, muito próximo ao relatado na literatura ($153 - 155\text{ }^{\circ}\text{C}$),⁸⁷ sendo aceitável ao considerar que o valor experimental não foi corrigido.

O espectro de ¹H-RMN obtido para **98** em acetona deuterada está apresentado na **Figura 22**.

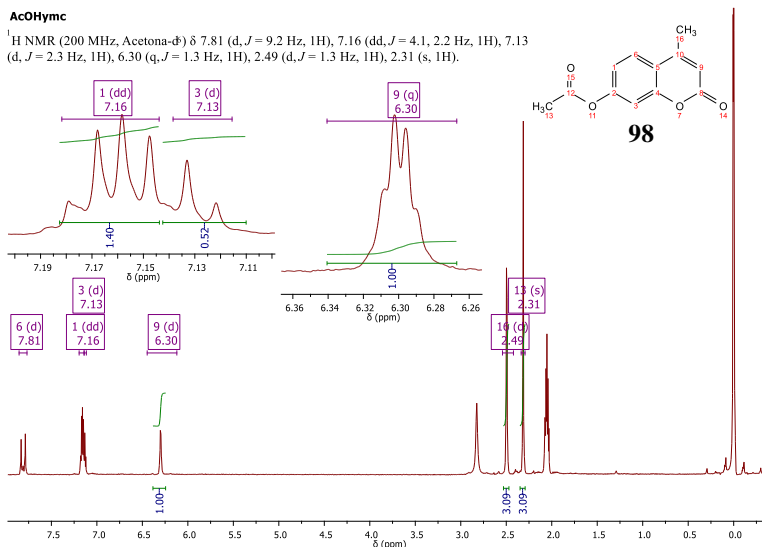


Figura 22. Espectro de ^1H -RMN de **98** (200 MHz, acetona- d_6).

Em função da menor resolução de equipamento empregado, observou-se a sobreposição dos sinais de H1 e H3 ($\delta = 7,12 - 7,18$ ppm), prejudicando a determinação da área de forma individual. Contudo, o padrão de multiplicidade e áreas dos sinais dos hidrogênios arílicos é o mesmo que em **90** (**Figura 20**), facilitando a análise.

A formação de produto é indicada pela presença do simpleto em 2,31 ppm, correspondente a metila do grupo acetila. As áreas dos sinais dos hidrogênios H13 e de H16 (referente a outra metila, em 2,49 ppm), estão em acordo com o previsto. (3,09 em ambos, comparando com 1H₉).

O espectro de IV (**Figura 23**), comparado com o da **Figura 21**, confirma este resultado, ao se observar a redução da intensidade da banda de O-H (~ 3100 cm^{-1}), indicando a formação do composto acetilado.

Comprova-se a inserção do grupo acetil pela presença de uma segunda banda de estiramento C=O (1766 cm^{-1}), correspondente à região de ésteres e mais energética que a carbonila de lactona observada em 1727 (e/ou 1713) cm^{-1} . Uma outra banda, visível em 1197 cm^{-1} , corresponde ao estiramento C-O de acetatos de fenila, corroborando as informações anteriores.⁹⁰

As análises de $^1\text{H-RMN}$ e IV comprovam de forma satisfatória a obtenção do derivado acetilado **98**.

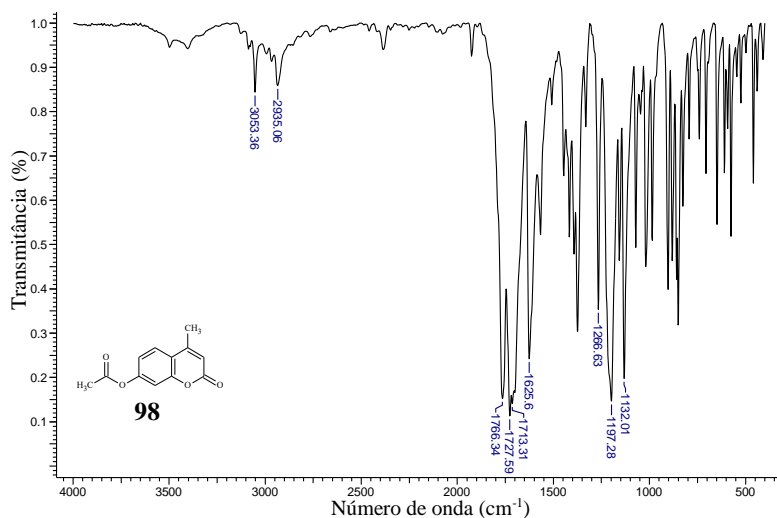


Figura 23. Espectro de IV de **98** (pastilha de KBr).

Um outro derivado preparado a partir da himecromona (**90**) foi o produto eterificado com o grupo metila (**99**). Este composto foi preparado via reação $\text{S}_{\text{N}}2$ típica (síntese de Williamson), com pequeno excesso (2,0 eq.) de K_2CO_3 e de CH_3I (1,5 eq.), conforme descrito no item 4.2.2, página 52. Obteve-se o composto **99**, com rendimento isolado de 51,0 % e ponto de fusão entre 159,5 – 162 °C, concordando com o reportado na literatura (160 – 161 °C).⁸⁸

No espectro de $^1\text{H-RMN}$ (**Figura 24**), pode-se observar diversas semelhanças ao de **90**, com exceção do simpleto em 3,88 ppm, correspondente ao hidrogênios do grupo metila do metóxido (permanecendo a metila vizinha ao alceno em ~2,4 ppm). O sinal em 1,6 ppm, refere-se a água, contaminante e oriunda provavelmente do carbonato de potássio utilizado.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.51 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.87 (dd, $J = 8.8, 2.5$ Hz, 1H), 6.83 (q, $J = 2.5$ Hz, 1H), 6.15 (q, $J = 0.9$ Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 2.41 (d, $J = 0.9$ Hz, 3H).

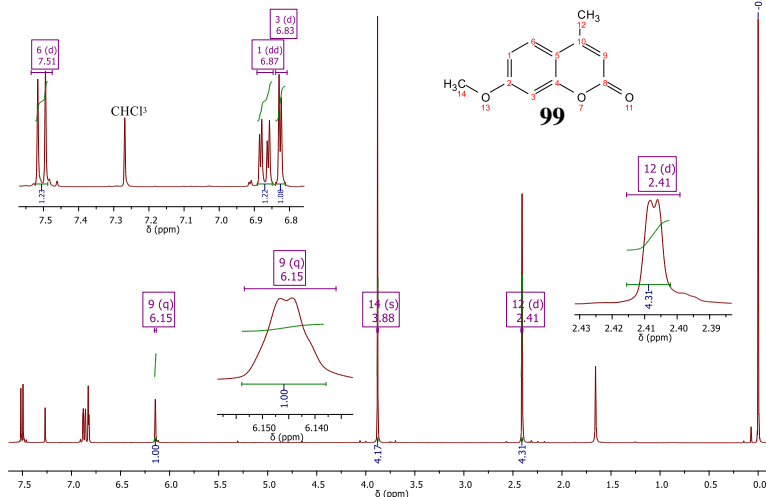


Figura 24. Espectro de ^1H -RMN de **99** (400 MHz, CDCl_3).

No espectro de IV de **99** (**Figura 25**), confirma-se novamente a formação de produto através da ausência da banda de estiramento O-H, além da presença de bandas de estiramento assimétrico de C-O-C de éteres alquil-arílicos em 1213 cm^{-1} , e de estiramento simétrico em 1070 cm^{-1} .

Menciona-se também que as bandas de estiramento C-H alifático apresentam-se bem separadas, com C-H da metila, alceno e de aromáticos em 2853 , $2920\text{-}2951$ e $3026\text{-}3069\text{ cm}^{-1}$, respectivamente. Estes valores são concordantes com os citados na literatura.⁹⁰

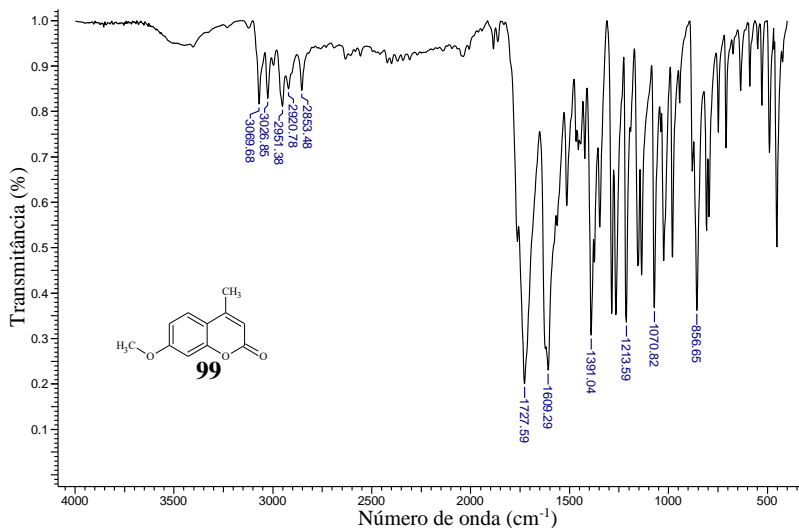


Figura 25. Espectro de IV de **99** (pastilha de KBr).

Completada a caracterização dos compostos cumarínicos por espectroscopia e por ponto de fusão, iniciaram-se os testes para epoxidação quimio-enzimática destes, sendo utilizado primeiramente **90**.

Ao se preparar o epóxido padrão **100a** via química com *m*-CPBA (seção 4.2), utilizando CH_2Cl_2 :EtOH 1:1 como mistura de solventes, sob refluxo, não foi possível obter o produto, sendo identificados no espectro apenas sinais do material de partida (mostrados na **Figura 20**, página 76) e impurezas, como os sinais na região de aromáticos, pertencentes ao agente oxidante e o sub-produto (**Figura 26**).

Além disso, foi observado o inesperado desenvolvimento de coloração do meio reacional, tentando-se então realizar a recristalização do produto, mas não foi possível encontrar um solvente adequado para este procedimento.

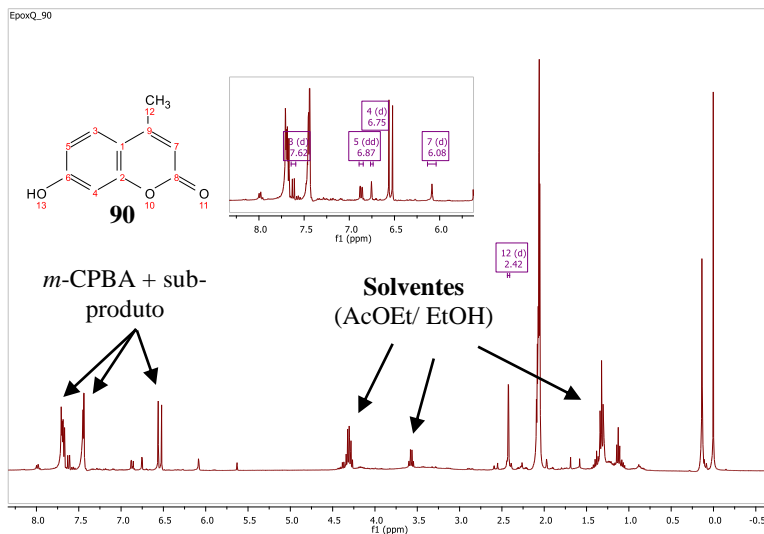


Figura 26. Espectro de ¹H-RMN do produto de epoxidação via química de **90** (400 MHz, acetona-d₆).

Iniciaram-se, então, os testes de epoxidação via quimio-enzimática. Utilizando os mesmos parâmetros iniciais para o teste para epoxidação do α -terpineol, encontrou-se dificuldades na solubilização da himecromona em diversos solventes orgânicos, tais como diclorometano, clorofórmio e hexano. Este fato é justificável pela sua estrutura, que apresenta os grupos fenol e lactona, sendo ambos polares.

Testando-se de modo qualitativo, foi observada a solubilidade deste composto (**90**) em THF, e por conseguinte em solventes de polaridade maior tais como metanol, etanol e acetona. Porém, estes últimos podem causar desnaturação da lipase, distorcendo o sítio-ativo e desativando o catalisador.

Para contornar este problema, foram testadas misturas binárias de solventes, constituídas de hexano (apolar e de fácil extração) com alguns solventes polares, de acordo com a metodologia descrita no item **4.2.6** (página 56). A **Tabela 11** descreve os resultados obtidos.

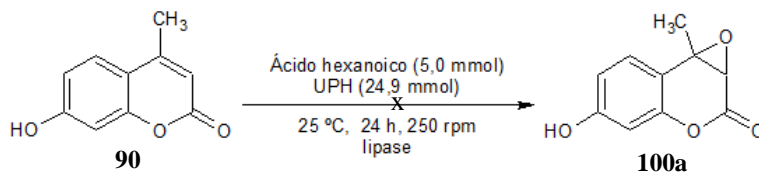
Tabela 11. Avaliação para solubilização de **90** em misturas de hexano e co-solventes.

Entrada	Co-solvente	Intervalo-teste (% m/m co-solvente) ^(a)	Característica macroscópica no ponto-final ^(b)
1	THF	3,0 – 60,4	Não solubiliza 90
2	Acetona	1,2 – 42,7	
3	MeCN	0,9 – 29,0	Forma sistema bifásico sem solubilizar 90
4	MeOH	0,7 – 26,1	Solubiliza em sistema bifásico
5	DMF	4,6 – 17,5	
6	DMSO	4,0 – 12,7	

(a) Calculado pela razão entre massa de co-solvente e massa total de solventes (solvente principal + co-solvente); devendo-se considerar os valores como aproximações, em função da volatilidade dos solventes. (b) Definido como o limite superior do intervalo de solubilidade testado.

Como não é interessante neste estudo a utilização de sistemas bifásicos e, não sendo possível solubilizar **90** nas misturas propostas, decidiu-se utilizar outros solventes mais polares, tais como acetonitrila, tetraidrofurano e acetato de etila, sendo este éster vantajoso por poder também atuar como agente acilante na epoxidação quimio-enzimática de **90**.

Utilizando estes solventes e condições similares (**Esquema 27**) às empregadas para epoxidação de **74**, testou-se então a epoxidação quimio-enzimática de **90**. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 12**.



Esquema 27. Tentativa de epoxidação quimio-enzimática de **90** utilizando solventes orgânicos polares.

Tabela 12. Testes de epoxidação quimio-enzimática da himecromona (**90**).^(a)

Entrada	Solvente	Conversão ^(b) (%)
1	THF	n.d.
2 ^(c)	AcOEt	n.d.
3		n.d.
4 ^(d)	MeCN	n.d.
5 ^{(d), (e)}		n.d.

(a) Condições reacionais: **90** (5,0 mmol), Lipozyme 435 (30 mg), solvente (25,0 mL), 25 °C, 24 h, 250 rpm. (b) Determinada por ¹H-RMN. (c) Neste caso, não utilizou ácido hexanoico. (d) 35 °C, 72 h. (e) Reação com ácido octanoico em substituição ao hexanoico. n.d.: não-detectado.

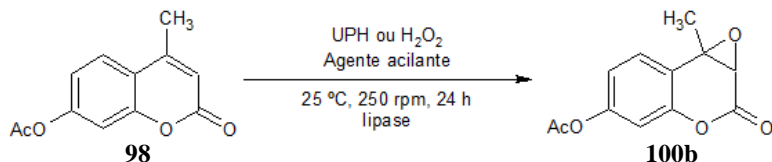
Ao usar tetrahidrofurano, não foi verificada a formação do produto **100a** (entrada 01). O mesmo resultado foi obtido ao utilizar acetato de etila e acetonitrila (entradas 02 e 03).

Em função destes dados, testou-se a reação em condições mais enérgicas, aumentando o tempo e a temperatura (72 h, 35 °C). Notou-se que o uso de acetonitrila favoreceria um aumento da concentração de H₂O₂ disponível no meio (entradas 04 e 05). Verificou-se também se o agente acilante usado (ácido hexanoico ou octanoico) teria alguma influência (entrada 05). No entanto, em todos estes experimentos, novamente não foi detectada a formação de produto.

Em função dos problemas encontrados serem originalmente relacionados a solubilidade, decidiu-se então utilizar o composto derivatizado de **90** na sua forma acetilada (**98**). Espera-se que esta seja mais solúvel em solventes apolares, considerando a substituição do grupo hidroxila por acetila.²⁰

5.2.2 Estudo da epoxidação da 4-metil-7-acetoxicumarina (**98**) e 4-metil-7-metoxicumarina (**99**)

Ao derivatizar **90**, a adição do grupo acetil mostrou-se suficiente para diminuir a polaridade e permitir a solubilização deste composto em CH₂Cl₂. Fez-se assim os testes iniciais, utilizando as condições descritas no **Esquema 28**.



Esquema 28. Tentativas de epoxidação via quimio-enzimática de **98**.

Tabela 13. Tentativas de epoxidação quimio-enzimática de **98**.^(a)

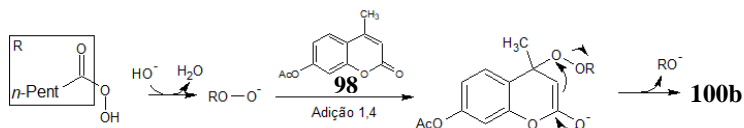
#	Solvente	Agente acilante (ácido carboxílico)	Fonte de peróxido	Conversão ^(b)
1	CHCl ₃	octanoico (5,0 mmol)	UPH (6,25 mmol)	n.d.
2	CH ₂ Cl ₂	octanoico (5,0 mmol)	UPH (6,25 mmol)	n.d.
3 ^(c)	CH ₂ Cl ₂	hexanoico (1,8 mmol)	UPH (6,0 mmol)	n.d.
4 ^(d)	CH ₂ Cl ₂	hexanoico (2,5 mmol)	UPH (8,3 mmol)	n.d.
5 ^(d)	CH ₂ Cl ₂	hexanoico (2,5 mmol)	H ₂ O ₂ (2,5 mmol)	n.d.

(a) Condições reacionais: **98** (1,25 mmol), solvente (15,0 mL), Lipozyme 435 (30 mg). (b) Determinada por ¹H-RMN. (c) **98** (0,9 mmol), Lipozyme 435 (100 mg). (d) 35 °C, 72 h.

Ao utilizar clorofórmio ou diclorometano como solventes, ácido octanoico como agente acilante e fonte de peróxido em excesso, não foi observada formação de produto (entradas 01 e 02). Testou-se então, o ácido hexanoico e uma quantidade maior de UPH e de lipase em relação ao alceno (entrada 03). Verificou-se também o efeito de aumentar o tempo e a temperatura de reação (72 h, 35 °C, entradas 04 e 05) ou utilizar o agente oxidante sem estar na forma de aduto (30 % em meio aquoso, entrada 05). Porém, como pode ser observado na **Tabela 13**, novamente, não foi detectada a presença de **100b**.

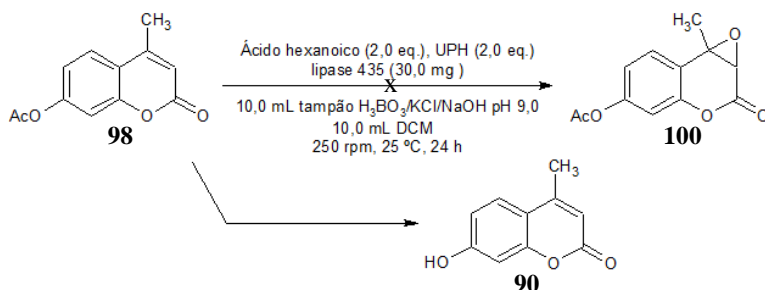
Observa-se que os testes reportados até o momento ocorreram via reação de Prilezhaev (**Esquema 09**, pág. 34), cujo estado de transição apresenta uma transferência de grupos concertada, e que favorece ligações C=C eletronicamente ricas.

Considerando que o grupo olefínico de **90** (e derivados) é eletrodeficiente em função da carbonila vizinha, decidiu-se então testar uma epoxidação nucleofílica (reação de Weitz-Scheffer), onde no lugar de um estado de transição que ocorre na reação de Prilezhaev, tem-se a formação inicial do ânion peróxido a partir da desprotonação do peroxiácido em meio básico, seguida da adição-1,4 à dupla e posterior eliminação do grupo de saída, formando o epóxido e regenerando a ligação dupla da carbonila (**Esquema 29**).⁹⁷



Esquema 29. Proposta mecanística da epoxidação de **98** via Weitz-Scheffer.

Para realizar esta reação, foi utilizado sistema bifásico composto por CH_2Cl_2 e uma solução-tampão alcalina ($\text{pH} = 9,0$) constituída de H_3BO_3 , KCl e NaOH , preparada conforme descrito na literatura.⁹⁸ As demais condições foram similares às usadas anteriormente (**Esquema 30**).



Esquema 30. Tentativa de epoxidação quimio-enzimática de **98** via reação de Weitz-Scheffer.

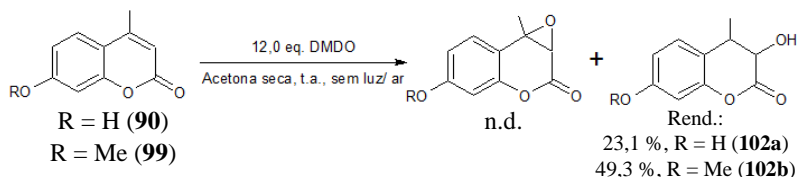
Contudo, esta reação mostrou-se incapaz de formar o produto epoxidado desejado, em função da preferência da lipase em hidrolisar o grupo acetato em **98** adicionado do que formar o perácido, revertendo **98** então para **90**, evidenciado pelo ponto de fusão do sólido obtido, $\sim 190\text{ }^\circ\text{C}$ (lit.: $190\text{ -}192\text{ }^\circ\text{C}$),⁹¹ e solubilidade reduzida em clorofórmio. Provavelmente esta reação de hidrólise, não observada anteriormente, ocorreu também em função da presença do meio alcalino.

Todavia, com interesse nesta nova abordagem e no intuito de evitar a reação paralela de ocorrer futuramente, decidiu-se fazer a substituição do grupo éster pelo éter (pouco reativo frente a hidrólise).

Após sintetizar o material de partida **99**, fez-se novamente a reação usando as mesmas condições descritas no **Esquema 30**. Mais uma vez, foram identificados apenas sinais do material de partida e impurezas no espectro.

Alternativamente, a reação acima pode ser realizada em tempos menores, com o uso de lipases de outras procedências ou bases orgânicas, removendo a fase aquosa.

Em um trabalho realizado por *Ávar e col.*, tentou-se oxidar diversos derivados da 4-metilcumarina, entre eles **90** e **99**, de forma semelhante ao idealizado neste trabalho, mas cujas condições reacionais divergem, ao empregar como agente oxidante o dimetildioxirano (DMDO), em grande excesso (12 equivalentes), com solvente anidro, sem ar e luminosidade (**Esquema 32**).⁹⁹



Esquema 31. Oxidação de **90** e **99** utilizando DMDO (adaptado da ref. 99)

No trabalho de *Ávar*, para estes compostos específicos (**90** e **99**), obteve-se o produto de hidroxilação (**102a-b**), não sendo observado a formação de epóxido. Comprova-se então que, apesar destes alcenos já terem sido testados para reações de epoxidação na literatura, a formação dos compostos **100a/c** não é trivial, de modo que os resultados obtidos neste trabalho reiteram a dificuldade natural apresentada pelos substratos estudados, necessitando de outras condições para efetivamente formar os produtos **100a-c**.

CONCLUSÃO

Este trabalho visou a síntese quimio-enzimática de epóxidos através do uso de lipases para compostos terpênicos (terpineol) e cumarínicos (himecromona e derivados).

Nos estudos com o terpineol, durante o processo de otimização notou-se que poucas enzimas foram capazes de catalisar a epoxidação, sendo, entretanto, essencial para o sucesso da reação. Além disso, foi observado que a proporção do agente acilante empregada influenciou na conversão ao produto, mas este efeito é menos pronunciado ao utilizar ácidos carboxílicos com um tamanho adequado em relação ao sítio-ativo. Ao avaliar o solvente orgânico empregado, notou-se grande influência deste na conversão ao produto, sendo o diclorometano o melhor (c >99 %). Contudo, considerando alguns fatores de impacto (saúde, resíduos, etc.), o acetato de etila mostrou-se superior, apesar de conversão ter sido um pouco menor (95,2 %). Com os estudos realizados, pode-se então obter conversões de nível quantitativo (>99 %) do epóxido do terpeniol, em condições brandas de reação.

Para os compostos cumarínicos, observou-se notória dificuldade, inicialmente em função da solubilidade da himecromona em solventes típicos, tais como AcOEt, CHCl_3 , CH_2Cl_2 e acetona. O problema de solubilidade foi solucionado através da derivatização do reagente, via *O*-acetilação e *O*-metilação.

Foram testadas diversas condições reacionais, tais como fonte de peróxido, temperatura, tempo, solvente e agente acilante. Porém, os correspondentes epóxidos não foram obtidos.

Em geral, demonstrou-se neste trabalho a efetiva viabilidade do uso de lipases para epoxidação de um terpeno (terpineol), além de apresentar tentativas de possíveis métodos para obtenção de oxiranos derivados de alguns compostos cumarínicos.

PERSPECTIVAS

Em função dos resultados ainda em caráter preliminar na epoxidação da himecromona e seus derivados, são sugeridas como próximas etapas deste trabalho:

- Estudar o efeito da adição de DMSO (e similares, como DMF e MeCN) nesta reação;
 - Utilizar outras fontes limpas de peróxido, como o aduto $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$;
 - Verificar o efeito de adição fracionada ou única da fonte de peróxido durante a reação;
 - Avaliar o efeito de substituintes em outras posições da molécula, através da síntese de outros compostos com o núcleo cumarínico;
 - Complementando o item acima, racionalizar através de estudos computacionais os efeitos de densidade eletrônica na C=C com as conversões a produto;
- Além disso, sugere-se, facultativamente, re-otimizar o preparo do óxido do terpineol, utilizando o tempo de 1 h (não-ideal) para as reações. Espera-se assim, facilitar a observação das variações causadas pelas diversas condições impostas ao sistema.
- Adicionalmente, outros compostos podem ser acrescentados aos estudos já realizados, entre estes, outros agentes acilantes (ácidos carboxílicos quirais, ésteres, aminoácidos), e agentes oxidantes ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$).
- Entre outros estudos que poderiam ser realizados, tem-se a verificação da influência de aditivos (como íons metálicos, líquidos iônicos), ou a imobilização das enzimas em suportes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. SOWELL, Thomas. **Basic Economics: A Citizen's Guide to the Economy**, Revised and Expanded. 2. ed. Nova Iorque: Basic Books, 2003, 448 p.
02. ADRIO, Jose; DEMAIN, Arnold. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117-139, 16 jan. 2014.
03. JEGANNATHAN, Kenthorai Raman; NIELSEN, Per Henning. Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. **J. Clean. Prod.**, v. 42, p. 228-240, mar. 2013.
04. OYAMADA, Juzo *et al.* Direct Synthesis of Coumarins by Pd (II)-Catalyzed Reaction of Alkoxyphenols and Alkynoates. **Chem. Lett.**, v. 31, n. 3, p. 380-381, mar. 2002.
05. KAYODE, Bayonle; HART, Abarasi. An overview of transesterification methods for producing biodiesel from waste vegetable oils. **Biofuels**, p.1-19, 11 abr. 2017.
06. HOWELL, Gareth P. Asymmetric and Diastereoselective Conjugate Addition Reactions: C–C Bond Formation at Large Scale. **Org. Proc. Res. Dev.**, v. 16, n. 7, p. 1258-1272, 27 fev. 2012.
07. FABER, Kurt. **Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook**. 6. ed. Nova Iorque: Springer-Verlag, 1997. 436 p.
08. BORNSCHEUER, Uwe T. A radical change in enzyme catalysis. **Nature**, v. 540, n. 7633, p. 345-346, dez. 2016.
09. SANTOS, Jose Cleiton S. dos *et al.* Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. **Chemcatchem**, v. 7, n. 16, p. 2413-2432, 17 jul. 2015.
10. VALIKHANI, Donya *et al.* A Spring in Performance: Silica Nanosprings Boost Enzyme Immobilization in Microfluidic Channels. **ACS App. Mat. Inter.**, v. 9, n. 40, p. 34641-34649, 2 out. 2017.

11. HASAN, Fariha *et al.* Enzymes used in detergents: Lipases, **Afr. J. Biotechnol.**, v. 9, n. 31, p. 4836-4844, 2 abr. 2010.
12. MEMARPOOR-YAZDI, Mina; KARBALAEI-HEIDARI, Hamid Reza; KHAJEH, Khosro. Production of the renewable extremophile lipase: Valuable biocatalyst with potential usage in food industry. **Food Bioprod. Process.**, v. 102, p. 153-166, mar. 2017.
13. DING, Yan *et al.* Efficient lipase-catalyzed Knoevenagel condensation: utilization of biocatalytic promiscuity for synthesis of benzylidene-indolin-2-ones. **Bioproc. Biosyst. Eng.**, v. 39, n. 1, p. 125-131, 6 nov. 2015.
14. ZHAO, Xiaoman *et al.* Ultrasound enhances lipase-catalyzed synthesis of poly (ethylene glutarate). **Ultrason. Sonochem.**, v. 31, p. 506-511, jul. 2016.
15. SOUZA, Rodrigo O.M.A. de *et al.* Michael additions of primary and secondary amines to acrylonitrile catalyzed by lipases. **Tetrahedron Letters**, v. 50, n. 17, p. 2017-2018, abr. 2009.
16. DESAI, Shuchi H. *et al.* Biological conversion of gaseous alkenes to liquid chemicals. **Metab. Eng.**, v. 38, p. 98-104, nov. 2016.
17. JIN, Fan-long; LI, Xiang; PARK, Soo-jin. Synthesis and application of epoxy resins: A review. **J. Ind. Eng. Chem.**, v. 29, p. 1-11, set. 2015.
18. RANGANATHAN, Sumanth; ZEITLHOFER, Sandra; SIEBER, Volker. Development of a lipase-mediated epoxidation process for monoterpenes in choline chloride-based deep eutectic solvents. **Green Chem.**, v. 19, n. 11, p. 2576-2586, 2017.
19. ATKINS, Peter; PAULA, Julio de. The kinetics of complex reactions. In: ATKINS, Peter; PAULA, Julio de. **Atkins' Physical Chemistry**. 8. ed. Nova Iorque: W. H. Freeman, 2006. Cap. 23. p. 839-845.
20. BRUICE, Paula Yurkanis. **Organic Chemistry**. 4. ed. Upper Saddle River: Pearson Edu. Int., 2004. 1228 p.

21. NELSON, David L.; COX, Michael M. Enzymes. In: NELSON, David L.; COX, Michael M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4. ed. Nova Iorque: W.h. Freeman, 2005. Cap. 6. p. 190-234.
22. SINGH, Mrityunjay K.; MANOJ, Narayanan. Crystal structure of *Thermotoga maritima* acetyl esterase complex with a substrate analog: Insights into the distinctive substrate specificity in the CE7 carbohydrate esterase family. **Biochem. Biophys. Res. Co.**, v. 476, n. 2, p. 63-68, jul. 2016.
23. SKJØT, Michael *et al.* Understanding the Plasticity of the α/β Hydrolase Fold: Lid Swapping on the *Candida antarctica* Lipase B Results in Chimeras with Interesting Biocatalytic Properties. **Chembiochem**, v. 10, n. 3, p. 520-527, 13 fev. 2009.
24. SHARMA, Shivika; KANWAR, Shamsher S. Organic Solvent Tolerant Lipases and Applications. **Sci. World J.**, v. 2014, p. 1-15, 2014.
25. PENG, Ren; LIN, Jinping; WEI, Dongzhi. Synthesis of butyl acetate in n-heptane by the recombinant CS-2 lipase immobilized on kieselguhr. **Afr. J. Food Sci. Technol.**, [s.l.], v. 2, n. 3, p.059-066, mar. 2011.
26. SPERANZA, Paula; MACEDO, Gabriela Alves. Biochemical characterization of highly organic solvent-tolerant cutinase from *Fusarium oxysporum*. **Biocatal. Agric. Biotechnol.**, v. 2, n. 4, p.372-376, out. 2013.
27. HULT, Karl; BERGLUND, Per. Enzyme promiscuity: mechanism and applications. **Trends Biotechnol.**, v. 25, n. 5, p. 231-238, maio 2007.
28. TAWFIK, Dan S.; KHERSONSKY, Olga. Enzyme Promiscuity: A Mechanistic and Evolutionary Perspective. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 79, n. 1, p. 471-505, 7 jun. 2010.

29. FENG, Xing-wen *et al.* Lipase-catalysed decarboxylative aldol reaction and decarboxylative Knoevenagel reaction. **Green Chem.**, v. 11, n. 12, p. 1933-1936, 2009.
30. WANG, Zhi *et al.* Lipase-catalyzed Knoevenagel condensation between α , β -unsaturated aldehydes and active methylene compounds. **Chin. Chem. Lett.**, v. 25, n. 5, p. 802-804, maio 2014.
31. LEMOULT, Stephanie C.; RICHARDSON, Paul F.; ROBERTS, Stanley M. Lipase-catalysed Baeyer–Villiger reactions. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1**, n. 2, p. 89-91, 1995.
32. FLOURAT, A. L. *et al.* Chemo-enzymatic synthesis of key intermediates (*S*)- γ -hydroxymethyl- α,β -butenolide and (*S*)- γ -hydroxymethyl- γ -butyrolactone via lipase-mediated Baeyer–Villiger oxidation of levoglucosenone. **Green Chem.**, v. 17, n. 1, p. 404-412, 2015.
33. KAPOOR, Manali; GUPTA, Munishwar Nath. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochem.**, v. 47, n. 4, p. 555-569, abr. 2012.
34. THAKUR, Sumita. Lipases, its sources, Properties and Applications: A Review, **Int. J. Sci. Eng. Res.**, v. 3, n.7, p. 771-799, jul. 2012.
35. REKHA, K. S. S. *et al.* An Overview of Microbial Lipases, **J. Chem. Bio. Phys. Sci.**, v. 2, n. 3, p. 1379-1389, jun. 2012.
36. KANMANI, P.; ARAVIND, J.; KUMARESAN, K. An insight into microbial lipases and their environmental facet. **Int. J. Environ. Sci. Technol.**, v. 12, n. 3, p.1147-1162, 15 maio 2014.
37. RAJENDRAN, Aravindan; PALANISAMY, Anbumathi; THANGAVELU, Viruthagiri. Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 52, n. 1, p. 207-219, fev. 2009.

38. ZHANG, Yan *et al.* Synthesis of chiral oxazolidinone derivatives through lipase-catalyzed kinetic resolution. **J. Mol. Catal. B: Enz.**, v. 122, p. 29-34, dez. 2015.
39. SILVA, Thiago Sabino da *et al.* An unexpected inversion of CAL-B enantioselectivity based on substrate engineering of 2-bromoesters: Effect of (R)-1-phenylethyl moiety. **J. Mol. Catal. B: Enz.**, v. 133, p. S317-S323, nov. 2016.
40. CHEN, Xiao-yang *et al.* Asymmetric synthesis of strongly fluorescent spirooxazino derivatives via multi-enzymatic telescopic reactions. **J. Mol. Catal. B: Enz.**, v. 133, p. S277-S280, nov. 2016.
41. SWAMY, Peraka *et al.* The vicinal functionalization of olefins: a facile route to the direct synthesis of β -chlorohydrins and β -chloroethers. **RSC Adv.**, v. 4, n. 50, p. 26288-26294, 2014.
42. CHUA, Seong-chea; XU, Xuebing; GUO, Zheng. Emerging sustainable technology for epoxidation directed toward plant oil-based plasticizers. **Process Biochem.**, v. 47, n. 10, p. 1439-1451, out. 2012.
43. BURKE, Steven D.; DANHEISER, Rick L. (Ed.). **Handbook of Reagents for Organic Synthesis: Oxidizing and Reducing Agents**. Chichester: John Wiley & Sons, 1999. 564 p. (Handbook of Reagents for Organic Synthesis).
44. VON HOLLEBEN, Maria Luiza Ambros; SCHUCH, Cristina Maria. Ativação do peróxido de hidrogênio para a epoxidação de olefinas não-funcionalizadas, **Quim. Nova**, v. 20, n. 1, p. 58-71, 1997.
45. AZIZI, Mojtaba; MALEKI, Ali; HAKIMPOOR, Farahman. Solvent, metal and halogen-free synthesis of sulfoxides by using a recoverable heterogeneous urea-hydrogen peroxide silica-based oxidative catalytic system. **Catal. Comm.**, v. 100, p. 62-65, set. 2017.
46. GUPTA, Surabhi *et al.* A chemoselective ipso-hydroxylation of arylboronic acids using urea-hydrogen peroxide under catalyst free condition. **Tetrahedron Lett.**, v. 57, n. 23, p. 2506-2510, jun. 2016.

47. MENINNO, Sara; LATTANZI, Alessandra. Organocatalytic Asymmetric Reactions of Epoxides: Recent Progress. **Chem. Eur. J.**, v. 22, n. 11, p. 3632-3642, 19 jan. 2016.
48. BJÖRKLING, Fredrik *et al.* Lipase catalyzed synthesis of peroxycarboxylic acids and lipase mediated oxidations. **Tetrahedron**, v. 48, n. 22, p. 4587-4592, jan. 1992.
49. ANKUDEY, Emanuel G.; OLIVO, Horacio F.; PEEPLES, Tonya L. Lipase-mediated epoxidation utilizing urea-hydrogen peroxide in ethyl acetate. **Green Chem.**, v. 8, n. 10, p. 923-926, 2006.
50. PCHELKA, Beata K.; GELO-PUJIC, Mirjana; GUIBÉ-JAMPEL, Eryka. Chemoenzymatic autocatalytic Baeyer-Villiger oxidation. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1**, n. 17, p. 2625-2628, 1998.
51. YAN, Nan *et al.* Conformation-induced regioselective and divergent opening of epoxides by fluoride: facile access to hydroxylated fluoro-piperidines. **Org. Biomol. Chem.**, v. 14, n. 13, p. 3469-3475, 2016.
52. DHAKSHINAMOORTHY, Amarajothi *et al.* Graphene oxide as an acid catalyst for the room temperature ring opening of epoxides. **Chem. Commun.**, v. 48, n. 44, p. 5443-5445, 2012.
53. LIPSHUTZ, Bruce H. *et al.* Substitution reactions of secondary halides and epoxides with higher order, mixed organocuprates, $R_2Cu(CN)Li_2$: synthetic, stereochemical, and mechanistic aspects. **J. Org. Chem.**, v. 49, n. 21, p. 3928-3938, out. 1984.
54. GERSHENZON, Jonathan; DUDAREVA, Natalia. The function of terpene natural products in the natural world. **Nat. Chem. Biol.**, v. 3, n. 7, p. 408-414, 18 jun. 2007.
55. BROCCAS, Anne-laure *et al.* Polyether synthesis: From activated or metal-free anionic ring-opening polymerization of epoxides to functionalization. **Prog. Pol. Sci.**, v. 38, n. 6, p. 845-873, jun. 2013.

56. FOGASSY, Gabriella *et al.* Catalyzed ring opening of epoxides: Application to bioplasticizers synthesis. **App. Catal. A: General**, v. 393, n. 1-2, p. 1-8, fev. 2011.
57. ADRIANA SILVA NAKAMURA (Brasil). Associação Brasileira da Indústria Química. **Abiquim: Indústria químicas investem em produção a partir de matérias-primas renováveis para aumentar a competitividade.** 2016. Disponível em: <<https://www.quimica.com.br/30490>>. Acesso em: 25 ago. 2017.
58. MENINNO, Sara; LATTANZI, Alessandra. Asymmetric organocatalytic journey into the world of three-membered rings, **Catal. Today**, v. 285, p. 39-48, maio 2017.
59. DAS, Sajal Kumar. Recent Advances in the Intramolecular Reactions of Epoxides with Arenes and Heteroarenes, **Asian J. Org. Chem.**, v. 6, p. 243-256, 23 dez. 2016.
60. FARKAS, Ágnes; HORVÁTH, Györgyi; MOLNÁR, Péter. General features of phenoloids. In: FARKAS, Ágnes; HORVÁTH, Györgyi; MOLNÁR, Péter. **Pharmacognosy 1.** Pécs: University Of Pécs, 2014. Cap. 15. p. 279-308.
61. SARKER, Satyajit D.; LATIF, Zahid; GRAY, Alexandre I. Natural Products Isolation: An Overview. In: SARKER, Satyajit D.; LATIF, Zahid; GRAY, Alexandre I. (Ed.). **Natural Products Isolation.** 2. ed. Totowa: Humana Press, 2006. Cap. 1. p. 1-26. (Methods in Biotechnology).
62. GUO, Zongru. The modification of natural products for medical use, **Acta Pharm. Sin. B**, v. 7, n. 2, p. 119-136, mar. 2017.
63. BARNABEU, Ezequiel *et al.* Paclitaxel: What has been done and the challenges remain ahead, **Int. J. Pharm.**, v. 526, n. 1-2, p. 474-495, jun. 2017.
64. CIPLA LTD. Dharmaraj Ramachandra Rao; Rajendra Narayanrao Kankan. **Process for preparing of paclitaxel.** GB n° WO/2004/007473, 15 jul. 2003, 22 jan. 2004.

65. ZHANG, Lin *et al.* Simultaneous quantitative determination of five alkaloid in *Catharanthus roseus* by HPLC-ESI-MS-MS., **Chin. J. Nat. Med.**, v. 12, n. 10, p. 786-793, out. 2014.
66. FALCÃO, Manuel. A. *et al.* Supercritical fluid extraction of vinblastine from *Catharanthus roseus*. **J. Supercrit. Fluids**, v. 129, p. 9-15, nov. 2017.
67. YOKOSHIMA, Satoshi; TOKUYAMA, Hidetoshi; FUKUYAMA, Tohru. Total synthesis of (+)-vinblastine: Control of the stereochemistry at C18'. **Chem. Rec.**, v. 10, n. 2, p. 101-118, 26 abr. 2010.
68. MIRON, Diogo *et al.* Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 24, n. 6, p. 660-667, nov. 2014.
69. ZHENG, Xiao-Hui *et al.* Protective effect and mechanistic evaluation of linalool against acute myocardial ischemia and reperfusion injury in rats, **RSC Adv.**, v. 7, n. 55, p. 34473-34481, 2017.
70. ADAMS, T. B. *et al.* The FEMA assessment of aliphatic and aromatic terpene hydrocarbons used as flavor ingredients, **Food Chem. Toxicol.**, v. 49, n. 10, p. 2471-2494, out. 2011.
71. DA CAMARA, Claudio A. G. *et al.* Repellent activity of essential oils from two species of *Citrus* against *Tetranychus urticae* in the laboratory and greenhouse, **Crop Protec.**, v. 74, p. 110-115, ago. 2015.
72. GUM ROSIN CO. (China). **What is terpineol?** 2004. Disponível em: <<http://www.gum-rosin.com/news/what-is-terpineol.html>>. Acesso em: 24 jul. 2017.
73. TSENG, Wenjea J; CHEN, Chun-nan. Effect of polymeric dispersant on rheological behavior of nickel-terpineol suspensions. **Mat. Sci. Eng: A**, v. 347, n. 1-2, p. 145-153, abr. 2003.

74. THIELE, Erik S.; SETTER, Nava. Lead Zirconate Titanate Particle Dispersion in Thick-Film Ink Formulations, **J. Am. Ceram. Soc.**, v. 83, n. 6, p. 1407-1412, jun. 2000.
75. VALLINAYAGAM, R *et al.* Performance and emissions of gasoline blended with terpineol as an octane booster, **Renew. Energy**, v. 101, p. 1087-1093, fev. 2017.
76. COTTA, Rafaela. F. *et al.* Heteropoly acid catalysts in upgrading of biorenewables: Cycloaddition of aldehydes to monoterpenes in green solvents, **App. Catal. B: Env.**, v. 217, p. 92,99, nov. 2017.
77. EDWARDS, Mark *et al.* Not quite the last word on the Perkin reaction, **Tetrahedron**, v. 70, n. 40, p. 7245-7252, out. 2014.
78. JOULE, John A.; MILLS, Keith. Benzopyryliums and Benzopyrones: Reactions and Synthesis. In: JOULE, John A.; MILLS, Keith. **Heterocyclic Chemistry**. 5. ed. Chichester: Wiley, 2010. Cap. 12. p. 229-248.
79. NAGY, Nadine *et al.* 4-Methylumbelliferone treatment and hyaluronan inhibition as a therapeutic strategy in inflammation, autoimmunity and cancer, **Front. Immunol.**, v. 6, p. 1-11, 23 mar. 2015.
80. GUTIÉRREZ-SANCHEZ, C. *et al.* Coumarins Preparation by Pechmann Reaction Under Ultrasound Irradiation Synthesis of Hymecromone as Insecticide Intermediate, **Catal. Lett.**, v. 128, n. 3-4, p. 318-322, 21 out. 2008.
81. PÉREZ, Miriam *et al.* Antifouling activity of green-synthesized 7-hydroxy-4-methylcoumarin, **Mar. Env. Res.**, v. 113, p. 134-140, fev. 2016.
82. DESHMUKH, Madhavi *et al.* Efficacy of 4-methyl-7-hydroxy coumarin derivatives against vectors *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*, **Indian J. Exp. Biol.**, v.46, p. 788-792, dez. 2008.

83. ROSA, Gonçalo P. *et al.* A. Chalcone: A Valuable Scaffold Upgrading by Green Methods, **ACS Sustain. Chem. Eng.**, v. 5, n. 9, p. 7467-7480, 31 jul. 2017.
84. LAHYANI, Achraf; TRABELSI, Mahmoud. Ultrasonic-assisted synthesis of flavones by oxidative cyclization of 2'-hydroxychalcones using iodine monochloride, **Ultrason. Sonochem.**, v. 31, p. 626-630, jul. 2016.
85. CAREY, Francis A.; SUNDBERG, Richard J. **Advanced Organic Chemistry: Part A: Structure and Mechanisms**. 5. ed. Nova Iorque: Springer, 2007. 1203 p.
86. Ficha técnica das enzimas, disponíveis em <novozymes.com> e <<https://www.amano-enzyme.co.jp>>. Acesso em 22 jan. 2018.
87. MOGILAIHAH, K. *et al.* Microwave-promoted rapid and efficient method for acetylation of phenols with acetic anhydride using NaF as catalyst under solvent-free conditions, **Orient. J. Chem.**, v. 25, n. 01, p. 187-190, jan. 2009.
88. BORAH, Kalyan Jyoti; BORAH, Ruli. Poly(4-vinylpyridine)-supported sulfuric acid: an efficient solid acid catalyst for the synthesis of coumarin derivatives under solvent-free conditions. **Monats. Chem.**, v. 142, n. 12, p. 1253-1257, 12 ago. 2011.
89. YALKOWSKY, Samuel H.; HE, Yan; JAIN, Parijat (Ed.). Solubility Data. In: YALKOWSKY, Samuel H.; HE, Yan; JAIN, Parijat (Ed.). **Handbook of Aqueous Solubility Data**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 728.
90. SILVERSTEIN, Robert M.; BASSLER, G. Clayton; MORRILL, Terence C. **Spectrometric identification of organic compounds**. 4th ed. Nova Iorque: John Wiley, 1981. 442 p.
91. SHEN, Qiong *et al.* Synthesis and biological evaluation of functionalized coumarins as acetylcholinesterase inhibitors. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 40, n. 12, p. 1307-1315, dez. 2005.

92. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Org.). **Spectral Database for Organic Compounds**. 2018. Disponível em: <<http://sdb.sdb.aist.go.jp>>. Acesso em: 02 mai. 2018.
93. MÜNSFELT, Pamela de Almeida. **Otimização das condições reacionais para a epoxidação quimio-enzimática do α -pineno**. 2017. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.
94. SILVA, Jaqueline Maria Ramos da. **Epoxidação quimio-enzimática do B-cariofileno com lipases imobilizadas em biopolímeros**. 2016. 122 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.
95. LAANE, Colja *et al.* Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 1, p.81-87, jul. 1987.
96. ALDER, Catherine M. *et al.* Updating and further expanding GSK's solvent sustainability guide. **Green Chem.**, v. 18, n. 13, p.3879-3890, 2016.
97. WANG, Zerong (Ed.). Weitz-Scheffer Epoxidation. In: WANG, Zerong (Ed.). **Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents**. John Wiley & Sons, 2009. Cap. 663. p. 2975-2979.
98. MORITA, Tokyo; ASSUMPCÃO, Rosely Maria Viegas. Soluções, Reagentes e Solventes: Reagentes Gerais Especiais. In: MORITA, Tokyo; ASSUMPCÃO, Rosely Maria Viegas. **Manual de Soluções, Reagentes e Solventes: Padronização – Preparação – Purificação**. São Paulo: Edgard Blücher, 1968. Cap. 5, p. 272.
99. ČAVAR, Sanja; KOVAČ, Franci. Oxidative transformations of 4-methylcoumarins using dimethyldioxirane. **J. Heterocyclic Chem.**, v. 49, n. 2, p.261-266, 11 nov. 2011.