



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**FRANCISCO FELIPE MAIA DA SILVA**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
ANTIBACTERIANO E ANTIOXIDADE DE DERIVADOS DO EUGENOL E  
PROCESSOS BIOCATALÍTICOS USANDO CASCA DA LARANJA**

**FORTALEZA  
2017**

FRANCISCO FELIPE MAIA DA SILVA

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
ANTIBACTERIANO E ANTIOXIDANTE DE DERIVADOS DO EUGENOL E  
PROCESSOS BIOCATALÍTICOS USANDO CASCA DA LARANJA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos.

FORTALEZA  
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S58s Silva, Francisco Felipe Maia da.  
Síntese, caracterização estrutural e avaliação do potencial antibacteriano e antioxidante de derivados do eugenol e processos biocatalíticos usando casca da laranja / Francisco Felipe Maia da Silva. – 2017.  
183 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Prof. Dr. Telma Leda Gomes de Lemos .  
Coorientação: Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte.
1. Síntese. 2. Derivados. 3. Eugenol. 4. Antibacteriano. 5. Biocatálise. I. Título.

CDD 540

---

FRANCISCO FELIPE MAIA DA SILVA

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
ANTIBACTERIANO E ANTIOXIDADE DE DERIVADOS DO EUGENOL E  
PROCESSOS BIOCATALÍTICOS USANDO CASCA DA LARANJA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Química da Universidade Federal do Ceará,  
como requisito parcial à obtenção do título de  
Doutor em Química. Área de concentração:  
Química Orgânica.

Aprovada em: 08/03/2017.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte (Co-orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Ângela Martha Campos Arriaga  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Nilce Viana Gramosa Pompeu de Sousa Brasil

---

Profa. Dra. Selene Maia de Moraes  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

## AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente a minha mãe Ozenira e ao meu pai José Felipe, aos meus irmãos em especial a Aline, Alzenádia e Amanda que sempre estiveram ao meu lado e fundamentaram a base do meu ser como ser humano.

A minha esposa, Danielle Queiroz, que se mostrou sempre mais que uma amiga, mais que uma companheira e motivadora nos momentos de desânimos e dificuldades, assim como pela compreensão da minha ausência em decorrência das atividades experimentais exigidas na Pós-Graduação.

A todos os meus professores e professoras que tive em minha vida, desde o ensino infantil até a obtenção do título de doutor, cada um desses profissionais deixaram ensinamentos que vão além do conhecimento acadêmico.

A minha orientadora, Dra. Telma Leda Gomes de Lemos, pela confiança, pela amizade, apoio, pelos ensinamentos e pela orientação que culminou nesse trabalho. Professora cuja a trajetória de vida e profissional me inspira e serve de exemplo a futuros profissionais.

Ao professor Dr. Francisco de Queiroz Monte, meu co-orientador, que não dispensou esforços ao apoiar meu trabalho, dando contribuição fundamental e decisiva para a conclusão do mesmo. Professor que aprendi a admirar para além da sua brilhante atuação profissional, sendo portador de uma autenticidade ímpar nos dias de hoje.

Aos professores participantes da banca examinadora, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos amigos e colegas do LBPN por estarem presentes no cotidiano das atividades experimentais, sendo decisivos para realização desse trabalho, especialmente ao André Martins, Gisele Rocha, Bruna Marques, Patrícia Georgina, Iolanda Frota, Felipe Maia, Daniele Alves, Jennifer Cavalcante, Juliana Maria, Márcia Cleane e Emerson Yvay.

Ao IFRN, gestores, colegas e discentes dessa instituição pelo apoio e compreensão da minha ausência em determinados momentos.

Aos amigos e colegas do LABS em especial a Carol, Daniela, Thiago, Aquino e ao Reinaldo pelo apoio e parceria durante a caminhada.

Aos colegas da turma de doutorado, pela amizade construída e pelos conhecimentos compartilhados

A UFC e ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade de me qualificar profissionalmente nesta instituição.

Ao CNPq e FUNCAP pelo apoio financeiro.

*“Se alguém varre as ruas para viver, deve  
varrê-las como Michelângelo pintava, como  
Beethoven compunha, como Shakespeare  
escrevia”.*

(Martin Luther King)

## RESUMO

O uso de produtos naturais como fonte terapêutica ainda consiste no principal meio para obtenção de fármacos que são utilizados no combate de várias enfermidades que atinge o homem e outros seres vivos. O eugenol, é uma substância natural que tem despertado o interesse de vários pesquisadores no mundo por apresentar uma diversidade de propriedades biológicas, incluindo: Antioxidante, antimicrobiano, anestésico, analgésico, hepatoprotetor, anticoagulante entre outras. Com isso, o presente trabalho objetivou a síntese de derivados do eugenol com posterior análise de suas atividades antioxidantes e antibacterianas. Também foi realizado estudo visando ampliar o número de derivados produzidos aplicando enzimas presentes na casca da laranja (*Citrus Sinensis*), imobilizadas em matriz de alginato de cálcio como biocatalisador em reações de hidrólise e esterificação. O trabalho resultou na síntese, caracterização e purificação de vinte e um derivados do eugenol, caracterizados utilizando espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e detector de ionização em chama, além de cromatografia líquida de alta eficiência. Na atividade antibacteriana foi observado que dez [4-bromobenzoato de 4-alil-2-metóxfenila (**8**); 4-nitrobenzoato de 4-alil-3-metóxfenila (**9**); cinamato de 4-alil-2-metóxfenila (**10**); 4-(2-hidróxi-3-propil)-2-metóxfenil (**12**); acetato de 1-(4-acetóxi-3-metóxfenil)propano-2-il (**13**); 3-(4-hidróxi-3-metóxfenil)propano-1,2-diol (**14**); diacetato de 3-(4-acetóxi-3-metóxfenil)propano-1,2-di-ila (**15**); 2-metóxi-4-(oxiran-2-ilmetil)fenol (**16**); acetato de 2-metóxi-4-(oxiran-2-ilmetil)fenila (**17**); 4-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-metóxfenol (**18**)] dos vinte e um derivados apresentaram atividade antimicrobiana, inclusive frente a cepas que a molécula do eugenol se mostrou inativa, ampliando com isso o espectro de ação antibacteriano, sendo que os derivados que apresentaram menores Concentração Mínima Inibitória ( $500\mu\text{g/mL}$ ) foram as substâncias 8 e 16. Quanto a atividade antioxidante, foi observado que todos os derivados que foram produzidos a partir da reação de acilação do grupo hidroxil fenólico resultaram em substâncias com ação antioxidante muito inferior ( $\text{IC}_{50} > 200\mu\text{g/mL}$ ) a do eugenol ( $\text{IC}_{50} 4,38\mu\text{g/mL}$ ), demonstrando que o grupo fenol é fundamental para que a molécula apresente a capacidade de captura de radicais livres. Por outro lado, a modificação da ligação dupla através de reação de adição no grupo alila do eugenol, apesar de reduzir um pouco a capacidade antioxidante do mesmo ( $\text{IC}_{50} 4,38\mu\text{g/mL}$  para  $\text{IC}_{50} 20\mu\text{g/mL}$  no produto de hidratação), o efeito é bem inferior ao da mudança estrutural do grupo hidroxil, mostrando que mesmo exercendo algum fator de importância na capacidade de inibição radicalar, o grupo alila não é tão decisivo para essa atividade como grupo hidroxil. O extrato enzimático das cascas da laranja imobilizadas em suporte de alginato de cálcio mostrou-se ativo tanto em reações de hidrólise como em reações de acetilação, apresentando excessos enantioméricos (*ee*) superiores a 98% e quimiosseletividade para grupos hidroxil pertencente a função álcool em detrimento do fenol, bem como regioselectividade para hidrólise de grupos acetóxi, mantendo grupos benzoatos intactos. As enzimas da casca da laranja também se mostraram efetivas em reações de síntese de ésteres derivados de álcoois primários (acetato de benzila) e pouco efetiva frente a álcoois cíclicos. Também foi verificado a capacidade de ação do biocatalisador em diferentes temperaturas (30, 35 e  $40^{\circ}\text{C}$ ), boa condição de reuso do biocatalisador além de possibilidade de armazenamento do mesmo. Com isso o presente trabalho resultou na síntese de derivados com efeitos antibacterianos superiores ao produto de partida, ampliando as possibilidades de uso onde já são relatados efetivos uso do eugenol. Além de um método eficiente e econômico de preparação de um biocatalisador a partir de um resíduo industrial que são as cascas das laranjas.

**Palavras-chave:** Eugenol. Derivados. Antibacteriano. Antioxidante. Biocatalisador. Síntese.

## ABSTRACT

The use of natural products as a therapeutic source still consists of the main means to obtain drugs that are used in the fight against various diseases that affect man and other living things. Eugenol is a natural substance that has aroused the interest of several researchers in the world to present a diversity of biological properties, including: Antioxidant, antimicrobial, anesthetic, analgesic, hepatoprotective, anticoagulant among others. With this, the present work aimed at the synthesis of eugenol derivatives with subsequent analysis of its antioxidant and antibacterial activities. A study was also carried out aiming at increasing the number of derivatives produced by applying enzymes present in the orange peel (*Citrus Sinensis*), immobilized in a calcium alginate matrix as a biocatalyst in hydrolysis and esterification reactions. The work resulted in the synthesis, characterization and purification of twenty-one eugenol derivatives, characterized using hydrogen and carbon nuclear magnetic resonance spectroscopy, gas chromatography coupled to mass spectrometry and flame ionization detector, as well as high performance liquid chromatography. In the antibacterial activity it was observed that ten [4-allyl-2-methoxyphenyl 4-bromobenzoate (**8**); 4-allyl-3-methoxyphenyl 4-nitrobenzoate (**9**); 4-allyl-2-methoxyphenyl cinnamate (**10**); 4-(2-hydroxypropyl)-2-methoxyphenyl (**12**); 1-(4-acetoxy-3-methoxyphenyl) propano-2-yl acetate (**13**); 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propane-1,2-diol (**14**); 3-(4-acetoxy-3-methoxyphenyl) propane-1,2-diyl diacetate (**15**); 2-methoxy-4-(oxiran-2-ylmethyl) phenol (**16**); 2-methoxy-4-(oxiran-2-ylmethyl)-phenyl acetate (**17**); 4-((2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methyl)-methoxyphenol (**18**)] of the twenty-one derivatives showed antimicrobial activity, including against strains that the eugenol molecule was inactive, thus amplifying the spectrum of antibacterial action, and the derivatives with lower Minimal Inhibitory Concentration ( $500 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) were substances **8** and **16**. As for the antioxidant activity, it was observed that all derivatives that were produced from the acylation reaction of the phenolic hydroxy group resulted in substances with a much lower antioxidant action ( $\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) than eugenol ( $\text{IC}_{50} 4.38 \mu\text{g} / \text{mL}$ ), demonstrating that the phenol group is fundamental for the molecule to have the capacity to capture free radicals. On the other hand, the modification of the double bond by addition reaction in the allyl group of eugenol, although slightly reducing the antioxidant capacity of the same ( $\text{IC}_{50} 4.38 \mu\text{g} / \text{mL}$  for  $\text{IC}_{50} 20 \mu\text{g} / \text{mL}$  in the hydration product), the effect is much lower than that of the structural change of the hydroxyl group, showing that even though it exerts some importance factor in the radical inhibition capacity, the allyl group is not as decisive for this activity as the hydroxyl group. The enzymatic extract from the orange peels immobilized on calcium alginate support was active both in hydrolysis reactions and in acetylation reactions, presenting enantiomeric excesses (*ee*) above 98% and chemoselectivity to hydroxy groups belonging to the alcohol function in detriment of the phenol, as well as regioselectivity for hydrolysis of acetoxy groups, maintaining intact benzoate groups. Orange peel enzymes have also been shown to be effective in ester synthesis reactions derived from primary alcohols (benzyl acetate) and poorly effective against cyclic alcohols. It was also verified the ability of the biocatalyst to work at different temperatures (30, 35 and 40 °C), good condition of reuse of the biocatalyst, besides the possibility of storage of the same. Orange peel enzymes have also been shown to be effective in ester synthesis reactions derived from primary alcohols (benzyl acetate) and poorly effective against cyclic alcohols. It was also verified the ability of the biocatalyst to work at different temperatures (30, 35 and 40 °C), good condition of reuse of the biocatalyst, besides the possibility of storage of the same.

**Keywords:** Eugenol. Derivatives. Antibacterial. Antioxidant. Biocatalyst. Synthesis.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	- Taxol - Substância de origem natural utilizada no tratamento do câncer.....	25
<b>Figura 2</b>	- Fidaxomicina - Substância de origem natural utilizada como antibacteriano .....	25
<b>Figura 3</b>	- Derivados de produtos naturais usados como antimicrobiano.....	26
<b>Figura 4</b>	- Origem de drogas usadas como anti-infecciosos no mundo.....	27
<b>Figura 5</b>	- Estrutura química do glicosídeo cardiotônico isolado de <i>Digitalis lanata</i> spp. ....	27
<b>Figura 6</b>	- Estrutura Química da quinina e quinidina isolados do vegetal cinchona. ....	28
<b>Figura 7</b>	- Reação de síntese de derivados do ácido litocólico .....	28
<b>Figura 8</b>	- Síntese de derivados da biflorina, substância isolada da planta <i>Capraria biflora</i> L .....	29
<b>Figura 9</b>	- Estrutura da molécula do eugenol.....	30
<b>Figura 10</b>	- Estruturas químicas da molécula do eugenol e análogos.....	30
<b>Figura 11</b>	- Esquema reacional usado para síntese de tosilatos derivados do eugenol.....	31
<b>Figura 12</b>	- Estruturas químicas da molécula do eugenol e derivados avaliados frente a capacidade antifúngica .....	32
<b>Figura 13</b>	- Éster derivado do eugenol com ácido acetilsalicílico .....	33
<b>Figura 14</b>	- Derivados do eugenol testados frente ao potencial citotóxico.....	36
<b>Figura 15</b>	- Representação de reação de acilação catalisada por enzima Lipase PS-30 .....	39
<b>Figura 16</b>	- Reação de acilação de compostos organofluór catalisada pela enzima CALB.....	40
<b>Figura 17</b>	- Representação de reação de redução catalisada por células vegetais de <i>Daucus carota</i> . ..	41
<b>Figura 18</b>	- Representação de reação de redução de grupos nitros por células vegetais de lentilha ( <i>Lens culinaris</i> ) .....	42
<b>Figura 19</b>	- Reação catalisada pelas enzimas presentes na água do coco.....	43
<b>Figura 20</b>	- Processos biocatalíticos catalisados por <i>Citrus aurantium</i> .....	44
<b>Figura 21</b>	- Estrutura da penicilina.....	46
<b>Figura 22</b>	- Estrutura química da Tigeciclina .....	47
<b>Figura 23</b>	- Reação de esterificação do eugenol com anidridos de ácidos .....	53
<b>Figura 24</b>	- Espectro de infravermelho do eugenol (A) e do acetato de eugenila (B).....	54
<b>Figura 25</b>	- Espectro de massa do eugenol .....	55
<b>Figura 26</b>	- Espectro de massas do acetato de eugenila (1) .....	55
<b>Figura 27</b>	- Espectro de RMN 1H (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) do acetato de eugenila (1).....	56
<b>Figura 28</b>	- Espectro de RMN 13C (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) do acetato de eugenila (1). ....	57
<b>Figura 29</b>	- Espectro de Infravermelho do butanoato de eugenila. ....	58
<b>Figura 30</b>	- Espectro de massa do butanoato de eugenila (2) .....	58
<b>Figura 31</b>	- Espectro de RMN 1H (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) do butanoato de eugenila (2).....	59
<b>Figura 32</b>	- Espectro de RMN 13C (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) do butanoato de eugenila (2).....	60

<b>Figura 33</b>	- Espectro de infravermelho do hexanoato de eugenila (3) .....	61
<b>Figura 34</b>	- Espectro de massas do hexanoato de eugenila (3) .....	61
<b>Figura 35</b>	- Espectro de RMN 1H (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) do hexanoato de eugenila (3) .....	62
<b>Figura 36</b>	- Espectro de RMN 13C (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) do hexanoato de eugenila (3) .....	63
<b>Figura 37</b>	- Esquema reacional dos ésteres derivados do eugenol (4-9) através de esterificação com ácidos carboxílicos. ....	63
<b>Figura 38</b>	- Estruturas químicas dos ésteres derivados do eugenol formados (4-9).....	65
<b>Figura 39</b>	- Reação de síntese dos ésteres (10-11) derivados do eugenol com o ácido cinâmico e ibuprofeno.....	66
<b>Figura 40</b>	- Espectro de massa do benzoato de eugenila (4).....	66
<b>Figura 41</b>	- Espectro de RMN 1H (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) do Benzoato de eugenila (4) .....	67
<b>Figura 42</b>	- Espectro de RMN 13C (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) do benzoato de eugenila (4). ....	68
<b>Figura 43</b>	- Espectro de massas do 4-metilbenzoato de 4-alil-2-metoxifenil (5).....	68
<b>Figura 44</b>	- Espectro de RMN 1H (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) do 4-metilbenzoato de 4-alil-2-metóxfenil (5).....	69
<b>Figura 45</b>	- Espectro de RMN 13C (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) do 4-metilbenzoato de 4-alil-2-metóxfenila (5).....	70
<b>Figura 46</b>	- Espectro de massas do 4-fluorobenzoato de 4-alil-2-metoxifenila (6).....	70
<b>Figura 47</b>	- Espectro de RMN 1H (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) do 4-flúorobenzoato de 4-alil-2-metóxfenila (6).....	71
<b>Figura 48</b>	- Espectro de RMN 13C (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) do 4-flúorbenzoato de 4-alil-2-metóxfenila (6).....	72
<b>Figura 49</b>	- Espectro de massas do 4-clorobenzoato de 4-alil-2-metóxfenil (7).....	72
<b>Figura 50</b>	- Espectro de RMN 1H (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) do 4-clorobenzoato de 4-alil-2-metóxfenila (7).....	73
<b>Figura 51</b>	- Espectro de RMN 13C (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) do 4-clorobenzoato de 4-alil-2-metóxfenila (7).....	74
<b>Figura 52</b>	- Espectro de massas do 4-bromobenzoato de 4-alil-2-metoxifenila (8) .....	74
<b>Figura 53</b>	- Espectro de RMN 1H (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) do 4-bromobenzoato de 4-alil-2-metoxifenila (8).....	75
<b>Figura 54</b>	- Espectro de RMN 13C (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) do 4-bromobenzoato de 4-alil-2-metoxifenil (8).....	76
<b>Figura 55</b>	- Espectro de massa do 4-nitrobenzoato de 4-alil-3-metoxifenila (9) .....	76
<b>Figura 56</b>	- Espectro de RMN 1H (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) do 4-nitrobenzoato de 4-alil-2-metóxfenila (9).....	77

<b>Figura 57</b>	- Espectro de RMN 13C (CDCl3, 300MHz) do 4-nitrobenzoato de 4-alil-2-metóxi-fenila (9).....	78
<b>Figura 58</b>	- Espectro de massas do cinamato de 4-alil-2-metóxi-fenila (10).....	78
<b>Figura 59</b>	- Espectro de RMN 1H (CDCl3, 300MHz) do cinamato de 4-alil-2-metóxi-fenila (10)....	79
<b>Figura 60</b>	- Espectro de RMN 13C (CDCl3, 300MHz) do cinamato de 4-alil-2-metóxi-fenila (10) ..	80
<b>Figura 61</b>	- Espectro de massas de 2-(4-isopropilfenil)propanoato de 4-alil-2-metóxi-fenila (11).....	80
<b>Figura 62</b>	- Espectro de RMN 1H (CDCl3, 300MHz) do 2-(4-isopropilfenil) propanoato de 4-alil-2-metóxi-fenila (11).....	81
<b>Figura 63</b>	- Espectro de RMN 13C (CDCl3, 300MHz) do 2-(4-isopropilfenil) propanoato de 4-alil-2-metóxi-fenila (11).....	82
<b>Figura 64</b>	- Esquema reacional da síntese de derivados do eugenol por meio de reação de adição a dupla ligação seguido de acetilação. ....	83
<b>Figura 65</b>	- Espectro de massa de 4-(2-hidróxi-propil)-2-metóxi-fenol (12).....	84
<b>Figura 66</b>	- Espectro de RMN 1H (CDCl3, 300MHz) de 4-(2-hidróxi-propil)-2-metóxi-fenol (12). .	84
<b>Figura 67</b>	- Espectro de RMN 13C (CDCl3, 300MHz) de 4-(2-hidróxi-propil)-2-metóxi-fenol (12). .	85
<b>Figura 68</b>	- Espectro de massa do acetato de 4-(2-acetóxi-propil)-2-metóxi-fenila (13).....	85
<b>Figura 69</b>	- Espectro de RMN 1H (CDCl3, 300MHz) do acetato de 4-(2-acetóxi-propil)-2-metóxi-fenol (13).....	86
<b>Figura 70</b>	- Espectro de RMN 13C (CDCl3, 300MHz) do acetato de 4-(2-acetóxi-propil)-2-metóxi-fenol (13).....	87
<b>Figura 71</b>	- Espectro de massa do 3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)propano-1,2-diol (14) .....	87
<b>Figura 72</b>	- Espectro de RMN 1H (CDCl3, 300MHz) do 3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)propano-1,2-diol (14).....	88
<b>Figura 73</b>	- Espectro de RMN 13C (CDCl3, 300MHz) do 3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)propano-1,2-diol (14).....	89
<b>Figura 74</b>	- Espectro de massas do diacetato de 3-(4-acetóxi-3-metóxi-fenil) propano-1,2-di-ila (15).....	89
<b>Figura 75</b>	- Espectro de RMN 1H (CDCl3, 300MHz) do diacetato de 3-(4-acetóxi-3-metóxi-fenil)propano-1,2-di-ila (15). ....	90
<b>Figura 76</b>	- Espectro de RMN 13C (CDCl3, 300MHz) do diacetato de 3-(4-acetóxi-3-metóxi-fenil)propano-1,2-di-ila (15). ....	91
<b>Figura 77</b>	- Espectro de massas do 2-metóxi-4-(oxiran-2-ilmetil)fenol (16).....	91
<b>Figura 78</b>	- Espectro de RMN 1H (CDCl3, 300MHz) de 2-metóxi-4-(oxiran-2-ilmetil)fenol (16)...	92
<b>Figura 79</b>	- Espectro de RMN 13C (CDCl3, 300MHz) do 2-metóxi-4-(oxiran-2-ilmetil)fenol (16).	93
<b>Figura 80</b>	- Espectro de massas do acetato de 2-metóxi-4-(oxiran-2-ilmetil) fenila (17) .....	93

<b>Figura 81</b>	- Reação de síntese de cetais a partir de derivado do eugenol (14) produzindo os derivados 18, 19, 20 e 21.....	94
<b>Figura 82</b>	- Espectro de massa de 4-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-metóxfenol (18). .....	94
<b>Figura 83</b>	- Espectro de RMN 1H (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) do 4-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-metóxfenol (18).....	95
<b>Figura 84</b>	- Espectro de RMN 13C (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) do 4-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-metóxfenol (18).....	96
<b>Figura 85</b>	- Espectro de massas do acetato de 4-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-metóxfenila (19).....	96
<b>Figura 86</b>	- Reação de formação de cetais a partir do derivado 14 e do benzaldeído produzindo 20. ....	97
<b>Figura 87</b>	- cromatograma dos cetais produzidos a partir do derivado 14 e do benzaldeído.....	97
<b>Figura 88</b>	- Espectro de massas do 4-((2-metil-2-fenil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-metóxfenol (20). ..	98
<b>Figura 89</b>	- Etapas envolvidas na avaliação do halo de inibição apresentado pelos derivados sintetizados a partir do eugenol.....	101
<b>Figura 90</b>	- Ensaio experimental para determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos derivados que apresentaram halos de inibição no teste por disco difusão. ....	111
<b>Figura 91</b>	- Reação bioquímica baseada na redução do corante resazurina utilizada para identificação de atividade bacteriana.....	111
<b>Figura 92</b>	- Processo de obtenção do extrato aquoso da casca da laranja.....	118
<b>Figura 93</b>	- Esferas de alginato de cálcio sendo formadas (esquerda) e esferas após separação da solução (direita).....	119
<b>Figura 94</b>	- Gráfico comparando o teor de proteínas do extrato e do sobrenadante do processo de imobilização das proteínas em alginato de cálcio. ....	120
<b>Figura 95</b>	- Reação de síntese do acetato de para-nitrofenila .....	121
<b>Figura 96</b>	- Reação de hidrólise do APNP com o biocatalisador para determinação da atividade enzimática.....	121
<b>Figura 97</b>	- Atividade hidrolítica do ECLI em diferentes solventes .....	122
<b>Figura 98</b>	- Estabilidade térmica do ECLI em diferentes temperaturas .....	123
<b>Figura 99</b>	- Atividade hidrolítica do ECLI frente a diferentes concentrações do substrato (APNP).....	123
<b>Figura 100</b>	- Reação de síntese do 4-acetóxi benzoato de metila .....	124
<b>Figura 101</b>	- Espectro de massa do 4-acetóxi benzoato de metila .....	124
<b>Figura 102</b>	- Hidrólise regioselectiva do ECLI frente ao 4-acetóxi benzoato de metila .....	125
<b>Figura 103</b>	- Reação de hidrólise regioselectiva do 4-acetóxi benzoato de metila com ECLI .....	125
<b>Figura 104</b>	- Esquema reacional da reação de hidrólise do éster racêmico (RS)- acetato de 1-feniletila.....	126

<b>Figura 105</b> - Cromatograma (CG-DIC) da reação de hidrólise do (RS)-acetato de 1-feniletila catalisada por ECLI.....	127
<b>Figura 106</b> - Esquema reacional da síntese dos substratos (RS)-1-feniletanol e (RS)-acetato de 1-feniletila.....	127
<b>Figura 107</b> - Cromatograma (CG-DIC) do padrão (RS)-acetato de 1-feniletila obtido por via química.....	128
<b>Figura 108</b> - Cromatograma (CG-DIC) do padrão (RS)-1-feniletanol obtido por via química.....	128
<b>Figura 109</b> - Reação de esterificação do (RS)-1-feniletanol catalisada por ECLI.....	129
<b>Figura 110</b> - Esquema reacional de reação de esterificação do (RS)-1-feniletanol catalisada com ECLI na presença de solvente (hexano) e na ausência de solvente.....	130
<b>Figura 111</b> - Cromatograma (CG-DIC) da reação de esterificação do (RS)-1-feniletanol catalisada por ECLI em sistema livre de solvente.....	131
<b>Figura 112</b> - Cromatograma (CG-DIC) da reação de esterificação do (RS)-1-feniletanol catalisada por ECLI em sistema com solvente (hexano).....	131
<b>Figura 113</b> - Efeito do uso de PM na reação de esterificação catalisada pelo ECLI.....	133
<b>Figura 114</b> - Capacidade de reuso do ECLI em reações de transesterificação.....	134
<b>Figura 115</b> - Gráfico da atividade hidrolítica do ECLI fresco e após armazenamento de 60 dias.....	134
<b>Figura 116</b> - Compostos submetidos a reação de acilação catalisada por ECLI em meio orgânico.....	135
<b>Figura 117</b> - Cromatograma em CLAE com coluna quiral do derivado 12.....	136
<b>Figura 118</b> - Cromatograma CLAE da reação de acilação do derivado 12 com ECLI.....	136
<b>Figura 119</b> - Reação da acetilação quimiosseletiva realizada pelo ECLI com o derivado 12.....	137
<b>Figura 120</b> - Cromatograma CG-EM da reação de esterificação de 12 catalisada pelo ECLI.....	137
<b>Figura 121</b> - Espectro de massa do derivado 12 (A) e do produto resultante da reação de monoacetilação (B) via processo catalítico com ECLI.....	138
<b>Figura 122</b> - Cromatograma CLAE gerado na análise do derivado 14 obtido por via química.....	138
<b>Figura 123</b> - Reação de esterificação do derivado 14 catalisada pelo ECLI.....	139
<b>Figura 124</b> - Espectro de massas do produto da reação do derivado 14 diacetilado catalisada por ECLI.....	139
<b>Figura 125</b> - Esquema reacional dos derivados com grupos fenólicos frente a esterificação catalisada por ECLI.....	140
<b>Figura 126</b> - Esquema do mecanismo de reação para catálise enzimática na esterificação.....	141
<b>Figura 127</b> - Síntese de álcoois racêmicos (22 – 29).....	142
<b>Figura 128</b> - Cromatograma CG-DIC da reação de esterificação de 24 catalisada pelo ECLI.....	143
<b>Figura 129</b> - Cromatograma CG-DIC da análise da reação de esterificação do substrato 26 catalisada por ECLI.....	144
<b>Figura 130</b> - Cromatograma CG-DIC da reação de esterificação de 27 catalisada pelo ECLI.....	145

<b>Figura 131</b> - Reação de esterificação de 27 catalisada pelo ECLI.....	145
<b>Figura 132</b> - Foto ilustrativa do Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) situado no Laboratório de Biotecnologia e Produtos Naturais da UFC .....	148

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APNP	Acetato de para-nitrofenila
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-DIC	Cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização em chamas
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CENAUREM	Centro Nordestino de Aplicações e Uso da Ressonância Magnética Nuclear
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DCM	Diclorometano
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization <i>Transfer</i>
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsufóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
ECL	Extrato da Casca da Laranja
ECLI	Extrato da Casca da Laranja Imobilizado
HEX	Hexano
IV	Infravermelho
IFRN	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte
m/v	Relação massa/volume
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
T <sub>R</sub>	Tempo de retenção

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	- Triagem de vegetais frente a reações de hidrólise de ésteres racêmicos .....	43
<b>Tabela 2</b>	- Número de casos de resistência bacteriana a antibióticos relatados. ....	50
<b>Tabela 3</b>	- Rendimento das reações de esterificação do eugenol com anidridos de ácidos carboxílicos .....	53
<b>Tabela 4</b>	- Rendimento das reações de esterificação do eugenol com diferentes ácidos carboxílicos .....	64
<b>Tabela 5</b>	- Halos de inibição (mm) apresentados pelo eugenol e derivados frente a diferentes bactérias. ....	102
<b>Tabela 6</b>	- Comparação da ação antibacteriana entre o eugenol e o derivado <b>16</b> .....	103
<b>Tabela 7</b>	- Comparação do efeito antibacteriano entre o eugenol e o derivado <b>15</b> .....	104
<b>Tabela 8</b>	- Comparação do efeito antibacteriano entre o eugenol e os derivados <b>4</b> e <b>5</b> . ....	105
<b>Tabela 9</b>	- Comparação do efeito antibacteriano entre o eugenol e o derivado <b>8</b> .....	105
<b>Tabela 10</b>	- Comparação do efeito antibacteriano entre o eugenol e o derivado <b>9</b> .....	106
<b>Tabela 11</b>	- Comparação do efeito antibacteriano entre o eugenol e o derivado <b>10</b> .....	107
<b>Tabela 12</b>	- Comparação do efeito antibacteriano entre o eugenol e o derivado <b>12</b> .....	108
<b>Tabela 13</b>	- Comparação do efeito antibacteriano entre o eugenol e o derivado <b>13</b> .....	108
<b>Tabela 14</b>	- Comparação do efeito antibacteriano entre o eugenol e o derivado <b>13</b> .....	109
<b>Tabela 15</b>	- Comparação do efeito antibacteriano entre o eugenol e o derivado <b>18</b> .....	110
<b>Tabela 16</b>	- Comparação do efeito antibacteriano entre o eugenol e isoeugenol. ....	110
<b>Tabela 17</b>	- Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) dos derivados com atividade antibacteriana. ....	112
<b>Tabela 18</b>	- Capacidade antioxidante dos derivados do eugenol expressos em IC 50.....	114
<b>Tabela 19</b>	- Teor de conversão e excessos enantiomérico da reação de hidrólise do (RS) - acetato de 1 - feniletila em diferentes tempos de reação.....	126
<b>Tabela 20</b>	- Teor de conversão e excessos enantiomérico da reação de esterificação do (RS) - 1-feniletila em diferentes tempos de reação.....	129
<b>Tabela 21</b>	- Conversão e ee apresentados pela reação de esterificação catalisada por ECLI.....	130
<b>Tabela 22</b>	- Teores de conversão e ee na reação de esterificação catalisada por ECLI com diferentes massas de substrato. ....	132
<b>Tabela 23</b>	- Teores de conversão e ee na reação de esterificação catalisada por diferentes massas de ECLI.....	132
<b>Tabela 24</b>	- Teores de conversão e ee dos diferentes substratos submetidos a reação de esterificação catalisada por ECLI.....	143



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>24</b>
2.1	O USO DE PRODUTOS NATURAIS E SEUS DERIVADOS COMO FONTE TERAPÊUTICA.....	24
2.2	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO EUGENOL E DERIVADOS .....	29
2.2.1	<b>Atividade antimicrobiana</b> .....	30
2.2.2	<b>Atividade de inibição de agregação plaquetária</b> .....	32
2.2.3	<b>Atividade hepatoprotetora</b> .....	33
2.2.4	<b>Atividade anti-aterogênica</b> .....	33
2.2.5	<b>Atividade antihiperlipidêmica</b> .....	33
2.2.6	<b>Atividade antiviral</b> .....	34
2.2.7	<b>Atividade anestésica</b> .....	34
2.2.8	<b>Atividade antioxidante</b> .....	35
2.2.9	<b>Atividade anti-inflamatória</b> .....	36
2.3	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	37
2.4	PROCESSOS BIOCATALÍTICOS: CATÁLISE ENZIMÁTICA .....	38
2.4.1	<b>Uso de fontes vegetais como biocatalisadores</b> .....	40
2.5	MICRO-ORGANISMOS: IMPORTÂNCIA, CONTROLE E PATOGENICIDADE	45
<b>3</b>	<b>OBJETIVO (S)</b> .....	<b>51</b>
3.1	GERAL .....	51
3.2	ESPECÍFICOS .....	51
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
4.1	SÍNTESE DE ÉSTERES DERIVADOS DO EUGENOL .....	53
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS 1-3.....	54
4.2.1	<b>Acetato de eugenila (1)</b> .....	54
4.2.2	<b>Butanoato de eugenila (2)</b> .....	57
4.2.3	<b>Hexanoato de eugenila (3)</b> .....	60
4.2.4	<b>Benzoato de eugenila (4)</b> .....	66
4.2.5	<b>4-Metilbenzoato de 4-alil-2-metoxifenil (5)</b> .....	68
4.2.6	<b>4-Fluorobenzoato de 4-alil-2-metoxifenil (6)</b> .....	70
4.2.7	<b>4-clorobenzoato de 4-alil-2-metóxifenil (7)</b> .....	72

4.2.8	4-bromobenzoato de 4-alil-2-metoxifenil (8).....	74
4.2.9	Caracterização do 4-nitrobenzoato de 4-alil-3-metoxifenila (9).....	76
4.2.10	Caracterização do cinamato de 4-alil-2-metóxiifenila (10).....	78
4.2.11	Caracterização de 2-(4-isopropilfenil)propanoato de 4-alil-2-metóxiifenila (11) ..	80
4.3	SÍNTESE DE DERIVADOS DO EUGENOL ATRAVÉS DE REAÇÕES DE ADICÃO .....	83
4.3.1	Caracterização 4-(2-hidroxiopropil)-2-metóxiifenol (12) .....	83
4.3.2	Caracterização do acetato de 1-(4-acetoxi-3-metóxiifenil)propano-2-il (13) .....	85
4.3.3	Caracterização do 3-(4-hidróxi-3-metóxiifenil)propano-1,2-diol (14) .....	87
4.3.4	Caracterização do diacetato de 3-(4-acetóxi-3-metóxiifenil)propano-1,2-di-ila (15).....	89
4.3.5	Caracterização do 2-metóxi-4-(oxiran-2-ilmetil)fenol (16).....	91
4.3.6	Caracterização do acetato de 2-metóxi-4-(oxiran-2-ilmetil) fenila (17).....	93
4.3.7	Síntese de derivados do eugenol a partir da reação de formação de cetais com aldeídos e cetonas.....	94
4.3.7.1	Caracterização do 4-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-metóxiifenol (18) .....	94
4.3.7.2	Caracterização do acetato de 4-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-metóxiifenila (19).....	96
4.3.7.3	Caracterização do 4-((2-metil-2-fenil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-metóxiifenol (20).....	97
<b>5</b>	<b>AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES DO EUGENOL E DERIVADOS .....</b>	<b>100</b>
5.1	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS DERIVADOS DO EUGENOL PRODUZIDOS (1-21).....	100
5.2	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS DERIVADOS DO EUGENOL (1-21) PRODUZIDOS.....	113
<b>6</b>	<b>PROCESSOS BIOCATALÍTICOS COM DOS DERIVADOS DO EUGENOL UTILIZANDO AS CASCAS DA LARANJA. ....</b>	<b>118</b>
6.1	PREPARAÇÃO DO BIOCATALISADOR .....	118
6.3	CAPACIDADE HIDROLÍTICA DO ECLI EM DIFERENTES SOLVENTES.....	121
6.4	TERMOESTABILIDADE DO ECLI.....	122
6.5	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE APNP NA VELOCIDADE DA REAÇÃO. .	123
6.6	AVALIAÇÃO DA REGIOSSELETIVIDADE DO ECLI .....	124
6.7	ENANTIOSELETIVIDADE DO ECLI EM REAÇÕES DE HIDRÓLISE E ESTERIFICAÇÃO.....	125

<b>6.7.1</b>	<b>Efeito do tempo na reação de hidrólise do (RS)- acetato de 1-feniletila .....</b>	<b>126</b>
<b>6.7.2</b>	<b>Efeito do tempo na reação de acetilação do (RS)-1-feniletanol.....</b>	<b>128</b>
<b>6.7.3</b>	<b>Efeito do solvente na reação de acetilação do (RS)-1-feniletanol.....</b>	<b>129</b>
<b>6.7.4</b>	<b>Efeito da concentração do substrato na reação de acetilação do (RS)-1-feniletanol.....</b>	<b>132</b>
<b>6.7.5</b>	<b>Efeito da quantidade de catalisador na reação de acetilação do (RS)-1-feniletanol.....</b>	<b>132</b>
<b>6.7.6</b>	<b>Efeito do uso de peneira molecular na reação de acetilação do (RS)-1-feniletanol.....</b>	<b>133</b>
<b>6.7.7</b>	<b>Capacidade de reuso do biocatalisador (ECLI).....</b>	<b>133</b>
<b>6.7.8</b>	<b>Capacidade de armazenamento. ....</b>	<b>134</b>
<b>6.7.9</b>	<b>Reações biocatalíticas com EICL frente aos derivados racêmicos do eugenol... </b>	<b>135</b>
<b>6.8</b>	<b>USO DO BIOCATALISADOR EM REAÇÕES COM ÁLCOOIS PRIMÁRIOS SECUNDÁRIOS. ....</b>	<b>141</b>
<b>7</b>	<b>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>147</b>
<b>7.1</b>	<b>MÉTODOS DE SEPARAÇÃO E ANÁLISES.....</b>	<b>147</b>
<b>7.2</b>	<b>CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....</b>	<b>147</b>
<b>7.3</b>	<b>CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO .....</b>	<b>147</b>
<b>7.4</b>	<b>CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) .....</b>	<b>148</b>
<b>7.5</b>	<b>CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO DOS SUBSTRATOS.....</b>	<b>148</b>
<b>7.6</b>	<b>CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-EM) E CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A DETECTOR DE IONIZAÇÃO EM CHAMA (CG-DIC).....</b>	<b>157</b>
<b>7.7</b>	<b>RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO E CARBONO (RMN <sup>1</sup>H).....</b>	<b>158</b>
<b>7.8</b>	<b>ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (IV) .....</b>	<b>159</b>
<b>7.9</b>	<b>ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLENTA-VISÍVEL (UV-VIS) 159</b>	
<b>7.10</b>	<b>SÍNTESE DOS DERIVADOS DO EUGENOL .....</b>	<b>159</b>
<b>7.11</b>	<b>PREPARAÇÃO DO BIOCATALISADOR .....</b>	<b>165</b>
<b>7.12</b>	<b>OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA DA LARANJA (EACL).....</b>	<b>166</b>
<b>7.13</b>	<b>PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS PRESENTES NO EXTRATO DA CASCA DA LARANJA IMOBILIZADO (ECLI).....</b>	<b>166</b>
<b>7.14</b>	<b>MÉTODO PARA DETERMINAR O TEOR DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>167</b>

7.15	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DO ECLI.....	167
7.16	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE DISCO DIFUSÃO .....	168
<b>7.16.1</b>	<b>Preparação do meio de cultura .....</b>	<b>168</b>
<b>7.16.2</b>	<b>Preparação e atividade antibacteriana .....</b>	<b>169</b>
7.17	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI) DOS DERIVADOS DO EUGENOL.....	169
7.18	Avaliação da capacidade antioxidante.....	171
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>172</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>173</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A obtenção de derivados de produtos naturais através de reações químicas com a finalidade de ampliar determinado efeito terapêutico e/ou minimizar algum efeito colateral de substâncias medicamentosas no organismo é um dos meios mais utilizadas na obtenção de novos compostos com potencial farmacológico. A síntese do ácido acetil salicílico a partir do ácido salicílico visando a redução dos danos provocados na parede intestinal pelo segundo é um exemplo clássico de modificação química aplicada a obtenção de fármacos derivados de produtos naturais (CHIN e FERREIRA, 1999).

O eugenol é uma substância presente em várias espécies vegetais que tem sido utilizado pela medicina tradicional para o combate à várias enfermidades e usado em odontologia para procedimentos cirúrgicos dental. Entre as várias atividades biológicas apresentadas por essa substância, a capacidade em capturar radicais livres e o potencial antimicrobiano são destaques. Essas características têm levado ao interesse constante para obtenção de derivados do eugenol no sentido de aprimorar seu potencial biológico e farmacológico (KAMATOU, VERMAAK e VILJOEN, 2012) (PEREIRA, MENDES e LIMA, 2013) (MARTINS, FARIAS, *et al.*, 2016).

As reações químicas clássicas na obtenção de derivados a partir de substâncias naturais, ainda constituem uma via alternativa e de interesse para síntese de novas substâncias que possam contribuir para solucionar e/ou minimizar problemas de saúde pública. Entre esses desafios estão aqueles ocasionados pelos danos provocados pelos radicais livres e por micro-organismos patogênicos (CETIN-KARACA e NEWMAN, 2015).

O excesso de radicais no organismo está associado a uma série de enfermidades (cardiovasculares, envelhecimento precoce, distúrbios mentais, etc.) e os micro-organismos, destacando-se as bactérias patogênicas, têm demonstrado grande capacidade de adquirir resistência aos antibióticos comerciais, levando muitas vítimas a óbito devido a proliferação das chamadas “superbactérias” (BRONDANI, CAETANO, *et al.*, 2008) (MIHAI e POPA, 2015).

Esses exemplos, afora muitos outros, exige da ciência, em especial da química, o desenvolvimento de processos que visem a obtenção de novas substâncias capazes de inibir/reduzir os danos provocados por esses micro-organismos e radicais livres.

Assim, tendo em vista aspectos de importância econômica, social e medicinal, o presente trabalho, em sua primeira parte, enfocou a síntese, purificação, caracterização e avaliação do potencial antioxidante e antibacteriano de derivados do eugenol a partir da

esterificação do grupo hidroxil do fenol e adição a ligação dupla do grupo alila, utilizando reações químicas convencionais e enzimáticas. Este último caso, aproveitando fontes vegetais de baixo custo e fácil acesso.

Além das reações químicas convencionais, empregadas para produção das mais diversas substâncias com as mais diversas finalidades, outra técnica, também seguida há muito tempo, tem demonstrado enorme potencial para obtenção de produtos químicos de interesse, principalmente fármacos, tendo sua utilização ampliada nas últimas décadas. Trata-se da tecnologia enzimática, que utiliza catalisadores biológicos de fontes naturais variadas (animal, vegetal, microbiana), na síntese de substâncias farmacologicamente ativas (PAQUES e MACEDO, 2006) (DICOSIMO, MCAULIFFE, *et al.*, 2013) (YOUSEFIA, MOHAMMADI e HABIBIC, 2014) (MEZTLER, FAIT, *et al.*, 2014).

No Brasil, e em todo o mundo, existem diversos cultivos e numerosas espécies de vegetais utilizadas com as mais diferentes finalidades, como, alimentícia, cosmética, farmacêutica, entre outras. Estudos recentes mostram que o uso de vegetais locais amplamente disponíveis pode oferecer uma excelente alternativa na obtenção de intermediários “chaves” para a produção de produtos acabados através de transformações químicas catalisadas por vegetais, aliado a importantes implicações ecológicas e econômicas (FERRAZ, BIANCO, *et al.*, 2008) (ASSUNÇÃO, MACHADO, *et al.*, 2008) (ZILINSKAS e SEREIKAITE, 2013) (SILVA, FERREIRA, *et al.*, 2016).

Grande parte dos compostos biologicamente ativos possuem estruturas quirais, com um ou mais centros estereogênicos. Assim, a quiralidade tornou-se a força propulsora para a química orgânica de síntese, ou seja, a introdução de quiralidade em uma reação revestiu-se de suma importância. O uso de catalisadores enzimáticos neste aspecto é fundamental visto ser conhecido a habilidade de fontes naturais em induzir quiralidade (BALDASSARRE, BERTONI, *et al.*, 2000) (LIN, YOU e CHENG, 2011) (BORDÓN, VILLALBA, *et al.*, 2015).

Em resumo, os biocatalisadores são relativamente abundantes, de baixo custo e de aspectos químicos altamente desejáveis como, quimiosseletividade, regioseletividade e enantioseletividade. Essas características são de fundamental relevância, pois, frequentemente, apenas um dos estereoisômeros (enantiômeros ou diastereoisômeros) apresenta a propriedade desejada, ao passo que, os processos químicos convencionais, em geral, formam misturas racêmicas e/ou diastereoisoméricas (TAKEMOTO, MATSUOKA, *et al.*, 2000) (BORNSCHEUER, HUISMAN, *et al.*, 2012) (YADAV e THORAT, 2012) (ZHOU, NI, *et al.*, 2014).

Assim, a segunda parte do presente trabalho mostra um esforço no sentido de avaliar vegetais como biocatalisador em reações químicas que permitam obter produtos de interesse tecnológico, principalmente, medicinal. Esta linha de investigação envolveu a aplicação do extrato enzimático das cascas da laranja (*Citrus aurantium*) imobilizadas em alginato de cálcio como catalisador em biotransformações na resolução de misturas racêmicas de derivados do eugenol. Neste caso, aproveitando fontes vegetais de baixo custo e fácil acesso.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Inicialmente, foi traçado um esboço geral sobre a importância dos produtos naturais como agentes terapêuticos ao longo da história até os dias atuais, seu papel central no combate a várias enfermidades, seja, na sua forma *in natura* seja a partir de seus derivados. Em seguida, um panorama geral sobre o desafio contemporâneo da resistência bacteriana e suas consequências, além do papel fundamental dos antioxidantes nos organismos vivos. Finalmente, foram elaboradas considerações sobre o potencial do uso de catalisadores biológicos (enzimas) na síntese de derivados biologicamente ativos.

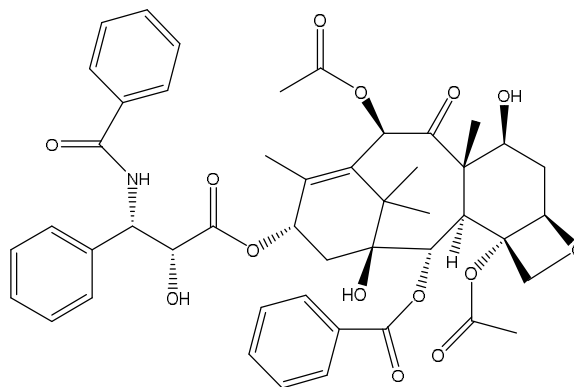
### 2.1 O USO DE PRODUTOS NATURAIS E SEUS DERIVADOS COMO FONTE TERAPÊUTICA

Desde os primórdios da humanidade o ser humano aprendeu a utilizar os produtos naturais não só como fonte de alimento, mais também para o tratamento de enfermidades. A procura de meios visando evitar e curar doenças pela ingestão de vegetais diversos, talvez, tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais com finalidade terapêutica (VEIGA-JUNIOR, PINTO e MACIEL, 2005). Diversas plantas foram utilizadas por inúmeras comunidades como remédio para suas enfermidades e como veneno em suas guerras e caças. Mesmo nos dias atuais, o conhecimento sobre plantas medicinais simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (CALDERON, SILVA-JARDIM, *et al.*, 2009) (CARVALHO, 2004) (AMOROZO, 1996), além de população carentes em países em desenvolvimento.

A importância dos produtos naturais na sociedade contemporânea, principalmente na área científico e tecnológica envolvendo a caracterização de novas substâncias com potencial clínico é atestada pela revisão de Newman e Cragg (2016), que analisaram o conjunto de drogas oficiais registradas entre janeiro de 1991 a dezembro de 2014. Nesta revisão, os autores apontaram que de 136 drogas registradas para o combate ao câncer, 113 (83%) são naturais, ou foram derivadas de produtos naturais. O paclitaxel (Figura 01) exemplifica o potencial farmacológico de substâncias naturais, tendo sido isolado a partir da casca da *Taxus brevifolia* ou Teixo do pacífico e o uso aprovado em 2014 na Índia e no Brasil, onde, com o nome comum de taxol, é comercializado como anticancerígeno (NEWMAN e CRAGG, 2016).



**Figura 1** - Taxol - Substância de origem natural utilizada no tratamento do câncer

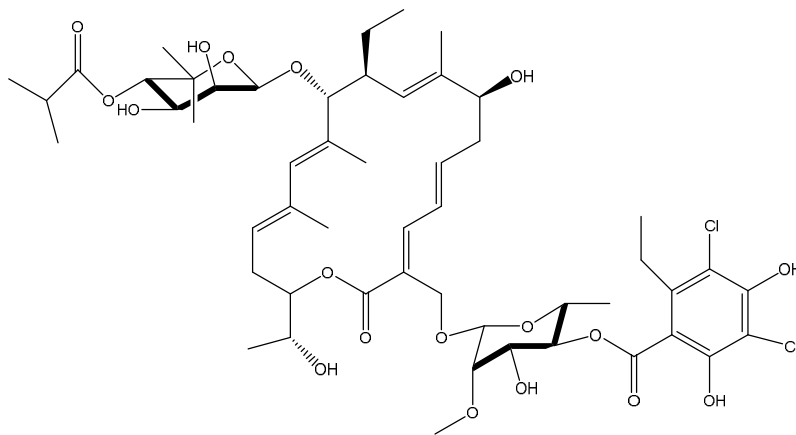


Paclitaxel (Taxol)

Fonte: (NEWMAN e CRAGG, 2016)

Substâncias com potenciais antibacterianos de origem natural também são encontradas na lista de drogas oficiais usadas no combate ao crescimento bacteriano. A fidaxomicina (Figura 2) é um exemplo de substância natural, obtida através da fermentação do actinomiceto *Dactylosporangium aurantiacum*, com uso clínico já consolidado (NEWMAN e CRAGG, 2016).

**Figura 2.** Fidaxomicina - Substância de origem natural utilizada como antibacteriano

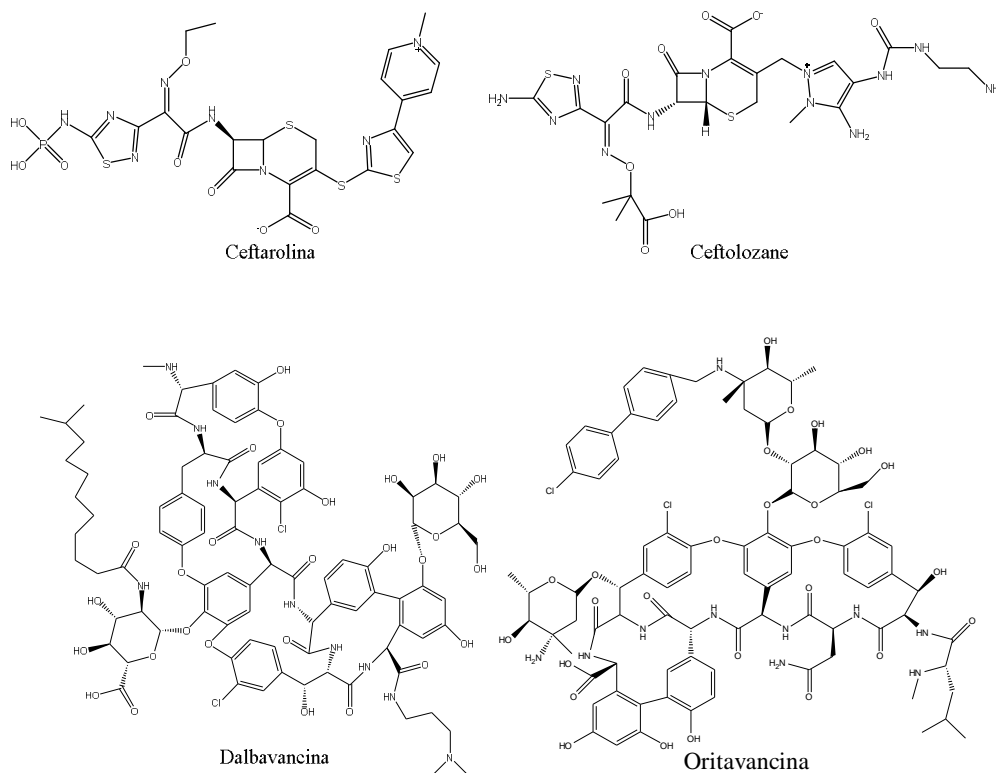


fidaxomicina

Fonte: (NEWMAN e CRAGG, 2016)

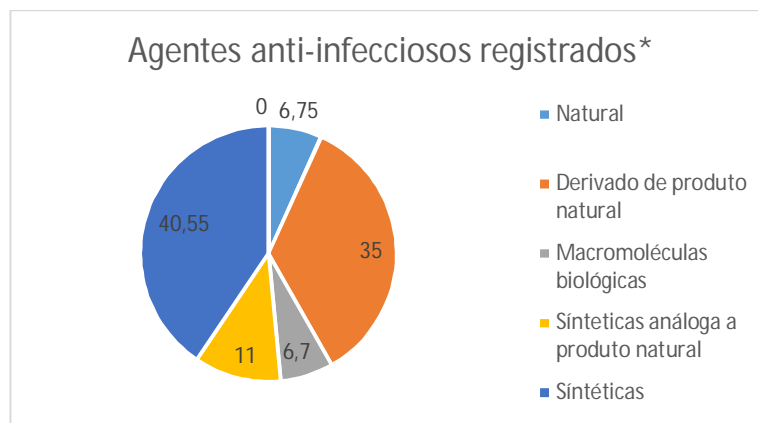
Newman & Cragg (2016) destacam ainda que derivados de compostos naturais também são usados oficialmente no combate a proliferação bacteriana. Somente entre os anos de 2011 a 2014 quatro substâncias derivadas de produtos naturais foram registradas (Figura 3).

**Figura 3 - Derivados de produtos naturais usados como antimicrobiano**



Fonte: (NEWMAN e CRAGG, 2016)

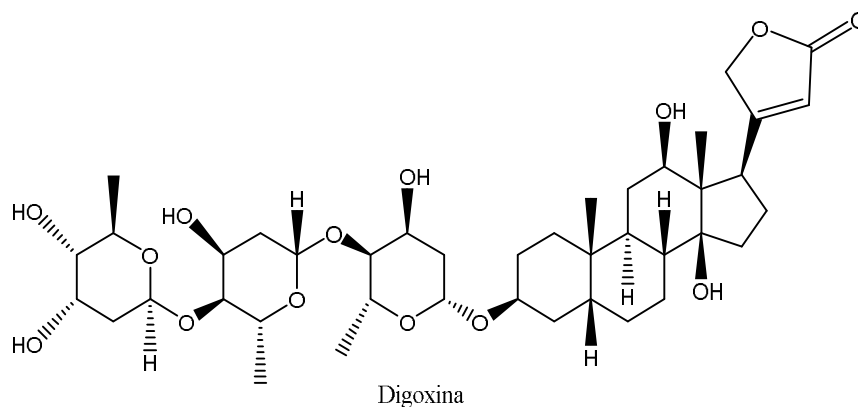
No ano de 1998 foi estimado que 60 % dos fármacos antitumoral e anti – infecciosos já existentes no mercado ou sob ensaio clínico eram originados de fontes naturais (SHU, 1998). Nos registros atuais, das 237 drogas utilizadas como agentes anti-infecciosos (antibacteriano, antifúngico, parasitário e antiviral), excluindo as vacinas, reconhecidas pelas principais agências de controle do mundo até dezembro de 2014, 138 (aproximadamente 58,30% do total) são produtos de origem natural derivados de produtos naturais, conforme pode ser visualizado no gráfico 01 (Figura 4). Esses dados indicam que essa estratégia de busca por novos fármacos continua a ser predominante na descoberta e validação de novas drogas (NEWMAN e CRAGG, 2016).

**Figura 4** - Origem de drogas usadas como anti-infecciosos no mundo

\* Referente ao período 1981-2014 (com exceção das vacinas).

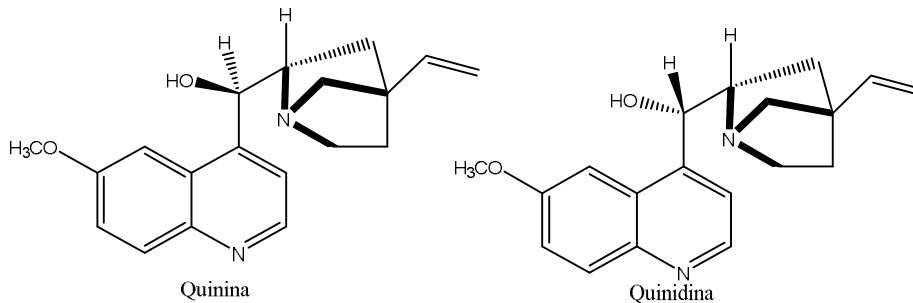
Fonte: (NEWMAN e CRAGG, 2016)

Muitas outras drogas de origem vegetal também devem ser destacadas como agentes terapêuticos importantes, podendo ser citado como exemplo a digoxina, um glicosídeo cardiotônico isolada de *Digitalis lanata* e usada no tratamento de problemas cardíacos (Figura 5). A quinina e quinidina (Figura 6) que possui propriedades antitérmicas, antimalárica e analgésica e é extraída de *Cinchona* spp., vincristina e vinblastina de *Catharanthus roseus*, atropina de *Atropa belladonna* e a morfina e a codeína de *Papaver somniferum* (RATES, 2001).

**Figura 5** - Estrutura química do glicosídeo cardiotônico isolado de *Digitalis lanata* spp.

Fonte: RATES, 2001

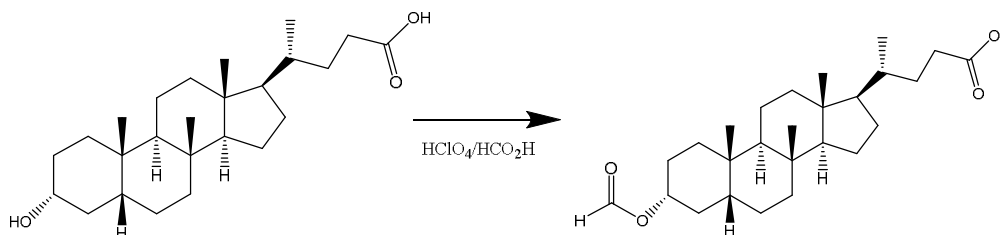
**Figura 6** - Estrutura Química da quinina e quinidina isolados do vegetal cinchona.



Fonte: RATES, 2001

Recentemente, o Laboratório de Biocatálise e Produtos Naturais (LBPN) da Universidade Federal do Ceará (UFC) publicou trabalhos com resultados promissores sobre derivados resultantes de modificação química de substâncias de origem natural com objetivo de potencializar seus possíveis efeitos biológicos. Um desses estudos resultou na síntese e caracterização de derivados do ácido litocólico (um dos principais ácidos biliares excretados pelos mamíferos) diferentes substâncias, entre as quais, o Ácido 3 $\alpha$ -formil-5 $\beta$ -colano-24-óico (Figura 7), que apresentou Concentração Mínima Inibitória (CMI) suficiente frente a cepas bacterianas para que os autores sugerissem seu uso potencial na aplicação como desinfetantes e conservantes de alimentos (NASCIMENTO, LEMOS, *et al.*, 2015).

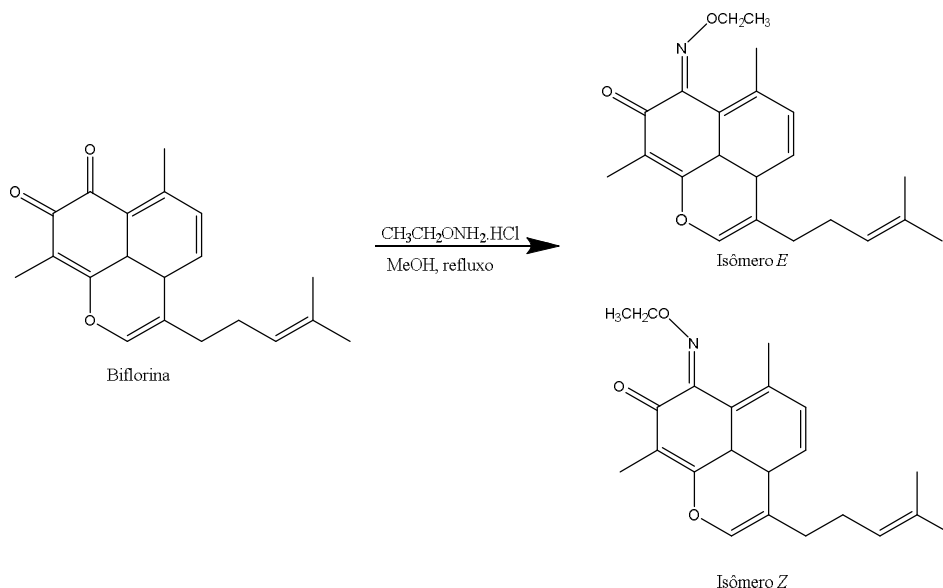
**Figura 7** - Reação de síntese de derivados do ácido litocólico



Fonte: Nascimento, et al., (2015)

Outro trabalho, desenvolvido no mesmo laboratório efetuou no isolamento da substância natural biflorina, a partir da planta *Capraria biflora* L. (FONSECA, PESSOA, et al., 2003). A substância, após caracterização através de espectrometria foi submetida a modificações estruturais tendo em vista analisar efeitos farmacológicos dos seus derivados. Os resultados alcançados para os estereoisômeros (*E/Z*) revelou que a atividade antimicrobiana frente ao micro-organismo *Enterococcus faecalis* foi duplicada após a modificação química apresentada na Figura 8, quando comparada com o produto natural (SOUZA, ALMEIDA, et al., 2016).

**Figura 8** - Síntese de derivados da biflorina, substância isolada da planta *Capraria biflora* L

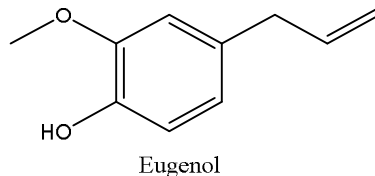


Fonte: (SOUZA, ALMEIDA, *et al.*, 2016)

Os exemplos de muitos anos atrás e da atualidade, mostram a inequívoca importância dos produtos de origem natural, assim como dos seus derivados, como fonte de substâncias capazes de contribuir decisivamente para o tratamento terapêutico de diversas enfermidades, incluído o câncer e infecções provocadas por micro-organismos patogênicos. Por isso, o direcionamento de pesquisas que busquem através das modificações químicas de substâncias naturais encontrar novos agentes terapêuticos capazes de suprir as necessidades farmacêuticas da humanidade na atualidade, devem ser incentivadas e ainda mais consolidadas.

## 2.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO EUGENOL E DERIVADOS

O eugenol (Figura 9), foi isolado pela primeira vez em 1929 e sua produção comercial teve início nos Estados Unidos em 1940. Pode ser produzido sinteticamente, no entanto é predominantemente extraído a partir de óleos essenciais de várias espécies vegetais, incluindo: *Eugenia caryophyllata*, *Ocimum sanctum*, *Ocimum gratissimum*, *Ocimum tenuiflorum*, *Cassia fistula*, *Zieria smitii* e *Pimenta racemosa*. Essa substância é classificada como um fenilpropanóide do tipo alilfenol e possui aspecto de um óleo amarelo claro com um odor característico de cravo e um sabor picante. É uma substância com inúmeras aplicações nas indústrias farmacêutica, alimentícia, agrícola e cosmética (COSTA, 2011) (DANIEL, 2009) (KAMATOU, VERMAAK e VILJOEN, 2012) (KAUFMAN, 2015).

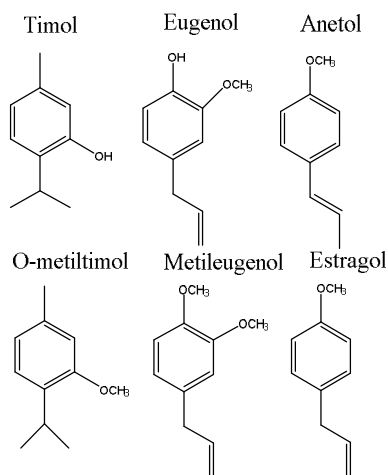
**Figura 9** - Estrutura da molécula do eugenol

Fonte: elaborado pelo autor

O eugenol tem sido extensivamente estudado nos últimos anos devido aos expressivos e diversificados efeitos biológicos, incluindo capacidade de inibição de proliferação de linhagens de células cancerígenas (GHOSH, NADIMINTY, *et al.*, 2005) (PISANO, PAGNAN, *et al.*, 2007). Também possui uso como anestésico (WAGNER, ARNDT e HILTON, 2002) além de efeitos antielmínticos, antifúngico e propriedades antimicrobianas, todos bastantes relatada na literatura (HUSSAIN, WADA, *et al.*, 2000) (KARAPMAR e AKTUG, 1987) (PISANO, PAGNAN, *et al.*, 2007) (DHARA e TRIPATHI, 2013) (HEMAISWARYA e DOBLE, 2009) (ABBASZADEH, SHARIFZADEH, *et al.*, 2014).

### 2.2.1 Atividade antimicrobiana

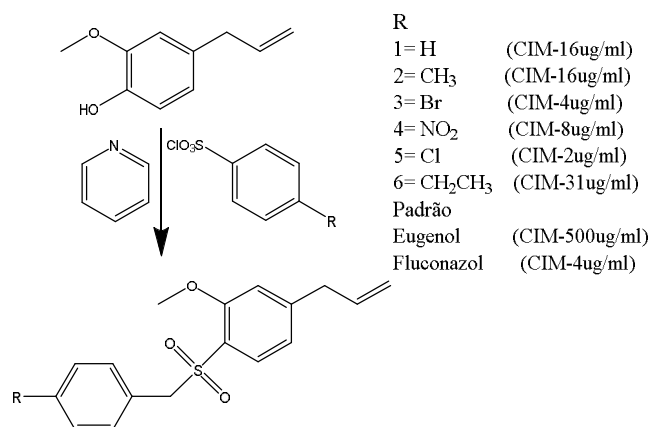
Neste sentido, foi investigada a atividade do eugenol e substâncias análogas (Figura 10), frente as cepas de fungos de *Candida spp.* e *Microsporium canis*, com a conclusão que os mesmos possuem uso promissor na inibição do crescimento dos referidos micro-organismos (FONTENELLE, MORAIS, *et al.*, 2011).

**Figura 10** - Estruturas químicas da molécula do eugenol e análogas

Fonte: (FONTENELLE, MORAIS, *et al.*, 2011)

Ésteres tosilatos derivados do eugenol (Figura 11) foram avaliados quanto a sua capacidade de inibição frente ao fungo *Candida albicans*. Os resultados demonstraram através das concentrações inibitórias mínimas (CIM) que o micro-organismo apresenta susceptibilidade aos seis derivados testados, sendo possível perceber inclusive maior vulnerabilidade dos micro-organismos aos derivados que ao próprio eugenol. (AHMAD, WANI, *et al.*, 2015).

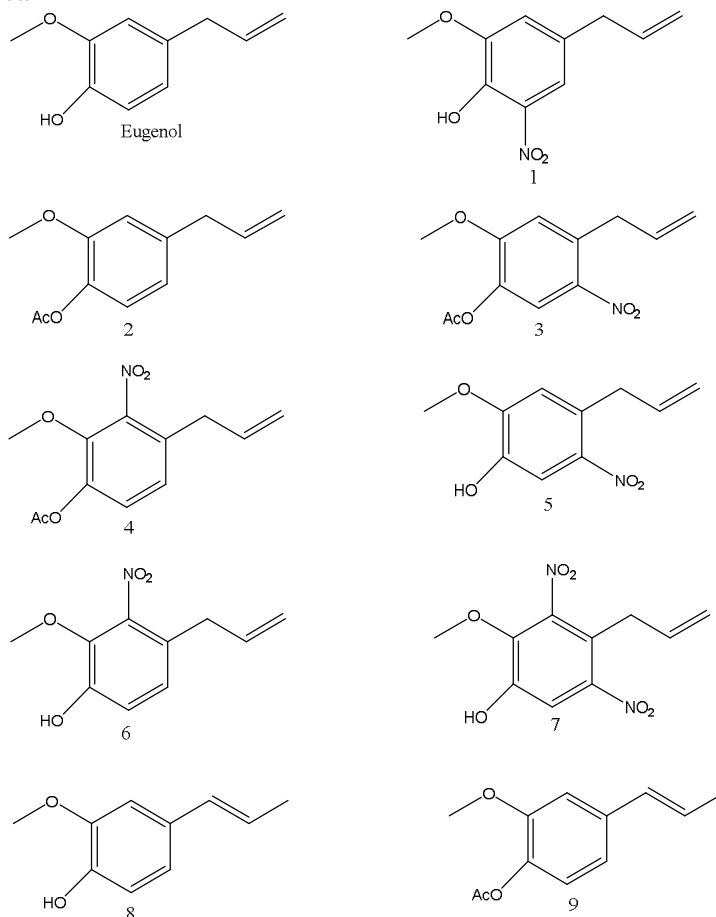
**Figura 11** - Esquema reacional usado para síntese de tosilatos derivados do eugenol



Fonte: (AHMAD, WANI, *et al.*, 2015)

Carrasco e colaboradores (2012) realizaram a síntese de nove derivados do eugenol (Figura 12) e avaliaram o efeito dos mesmos frente a capacidade de inibição ao crescimento antimicrobiano, sendo que das nove substâncias sintetizadas, duas (2 e 4) apresentaram atividade antimicrobiana frente a *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *S. cerevisiae*, *Microsporum*, *Trichophyton* spp.

**Figura 12** - Estruturas químicas da molécula do eugenol e derivados avaliados frente a capacidade antifúngica



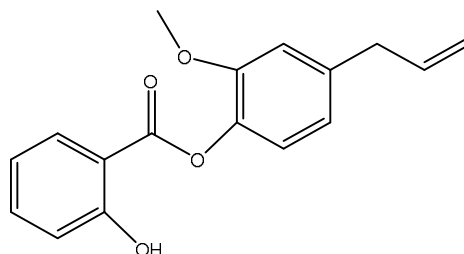
Fonte: (CARRASCO, RAIMONDI, *et al.*, 2012)

### 2.2.2 Atividade de inibição de agregação plaquetária

O éster derivado do eugenol com o ácido acetilsalicílico (Figura 13), apresentou a capacidade de inibição da agregação de plaquetas concluiu que o mesmo possui efeito positivo sobre a prevenção de trombose in vivo, entre outros fatores, devido a capacidade desta inibição da agregação plaquetária (MA, LIU, *et al.*, 2015).



**Figura 13** - Éster derivado do eugenol com ácido acetilsalicílico



Fonte: (MA, LIU, *et al.*, 2015)

### 2.2.3 Atividade hepatoprotetora

O eugenol apresentou atividade hepatoprotetora em ratos submetidos a doses de tiacetamida (TA), substância hepatotóxica, que reconhecidamente provoca danos ao fígado. Quando os animais receberam tratamento prévio com eugenol houve um decréscimo no índice de peroxidação lipídica, redução na oxidação de proteínas e de marcadores inflamatórios. Esses resultados sugerem que o eugenol é capaz de reduzir os efeitos tóxicos da TA no fígado (BASKARANA, PERIYASAM e , 2010).

### 2.2.4 Atividade anti-aterogênica

A capacidade anti-aterogênica do eugenol também foi relatada recentemente em estudo que envolveu a administração tanto do eugenol como de extrato vegetal de *Piper betle*, rico nessa substância, em ratos alimentados com uma dieta presumivelmente aterosclerótica. Os resultados apontaram para um efeito anti-aterogênico tanto para o extrato e ainda mais pronunciado para o eugenol, possivelmente relacionado com seu potencial antioxidante (VENKADESWARAN, THOMAS e GERALDINE, 2016).

### 2.2.5 Atividade antihiperlicêmica

Avaliação do potencial do eugenol como um anti-hiperglicêmico demonstrou melhoria eficaz na hiperglicemia através da inibição da gliconeogênese hepática, o que promove essa substância como um agente terapêutico promissor para prevenção de diabetes tipo 2 (JEONG, KIM, *et al.*, 2014). Essa indicação do eugenol como possível droga para combate de

complicações de diabetes também foi recentemente relatada na Literatura (PRASAD, BHARATH e MURALIDHARA, 2016).

### **2.2.6 Atividade antiviral**

A aplicação do eugenol em folhas de tomateiros resultou em uma maior resistência ao vírus da folha amarela do tomate, micro-organismo que provoca imensas perdas agrícolas e que não possui um controle químico ou biológico eficaz. Esses resultados fornecem base para utilização do eugenol como possível agente antiviral agrícola, o que pode contribuir para a segurança alimentar da população ao mesmo tempo que faz uso de uma substância natural ambientalmente menos danosa quando comparado com outros agroquímicos (SUN, LV, *et al.*, 2016).

### **2.2.7 Atividade anestésica**

Estudo avaliando a capacidade anestésica do eugenol frente ao *Nephrops norvegicus*, em diferentes concentrações demonstrou que em uma concentração de 300µL/L já foi suficiente para provocar a anestesia geral em mais de 50% dos indivíduos, com tempo de recuperação menor que 12 minutos, indicando que a substância pode ser utilizada como um anestésico eficaz para esta espécie (COWING, POWELL e JOHNSON, 2015). A ação anestésica do eugenol em peixes começa com a inibição do córtex cerebral (representando a perda tátil), em seguida atuação no gânglio basal e cerebelo (período de excitação) e finalmente coluna vertebral (estágio de narcose) (KONG, LIU, *et al.*, 2014).

Trabalhos nesse sentido são de fundamental importância tendo em vista que o estresse provocado na captura, manipulação e comercialização dos animais pode representar cercar de 30% de mortalidade (COYLE, DURBOROW e TIDWELL, 2004) (LUND, WANG, *et al.*, 2009) (RIDGWAY, TAYLOR, *et al.*, 2006). Por isso, o efeito sedativo do eugenol na referida espécie mostra-se de relevante importância, pois a sedação é capaz de reduzir a mortalidade durante o transporte e manipulação da lagosta (BARRENTO, MARQUES, *et al.*, 2011) (PRAMOD, RAMACHANDRAN, *et al.*, 2010).

Além da propriedade anestésica nos organismos aquáticos, estudos com o objetivo de avaliar a atividade do eugenol contra bactéria patogênica em peixes (*Rhamdia quelen*), *Aeromonas hydrophila* e o efeito da aplicação da substância em parâmetros hematológicos e

imunológicos verificou que o uso do eugenol não provocou alterações nos parâmetros hematológicos e imunológicos estudados, podendo o mesmo ser utilizado para prevenir e/ou tratar doenças bacterianas em peixes (SUTILI, KREUTZ, *et al.*, 2014).

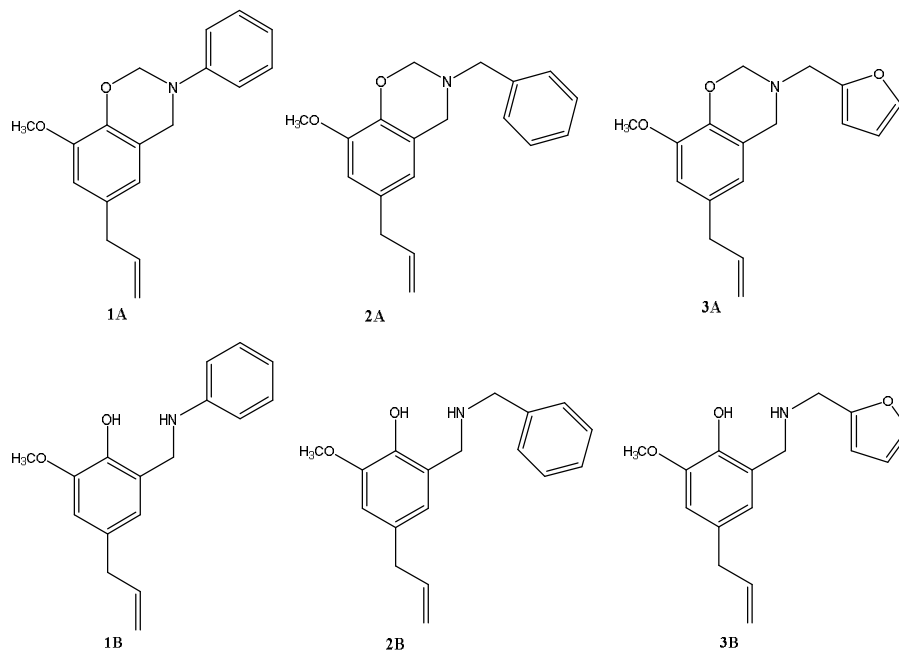
### **2.2.8 Atividade antioxidante**

A capacidade de suprimir a cascata de radicais livres, responsáveis pela peroxidação lipídica, foi também atribuída ao eugenol, demonstrando que o mesmo apresenta atividade antioxidante através da sua habilidade na formação de complexos com íons metálicos (ITO, MURAKAMI e YOSHINO, 2005).

Também relacionada com a capacidade antioxidante apresentada pelo eugenol, trabalho demonstrou sua capacidade de inibição sobre enzimas metaloproteases (MMP-9), sugerindo seu uso como agente terapêutico promissor na prevenção de metástases relacionadas ao estresse oxidativo. A literatura relata que a expressão de MMPs está fortemente associada a capacidade de invasão do tumor, reforçando o conceito que as mesmas estão correlacionadas com o câncer humano (NAM e KIM, 2013).

Além do eugenol, derivados (Figura 14) do mesmo foram relatados na Literatura como portadores de atividade citotóxica frente a linhagens de células cancerosas MCF-7, oriundas de paciente com câncer de mama. Os estudos demonstraram que a concentração letal para 50% das células com metástases foi entre 21,7 a 96,9 µg/ml. Resultados estes considerados promissores (RUDYANTO, WIDIANDANI e SYAHRANI, 2015).

**Figura 14** - Derivados do eugenol testados frente ao potencial citotóxico.



Fonte: (RUDYANTO, WIDIANDANI e SYAHRANI, 2015)

### 2.2.9 Atividade anti-inflamatória

Evidências do efeito biológico do eugenol sobre lesão pulmonar aguda apontam que a substância provoca a diminuição de citotoxinas pró-inflamatórias atuando no processo de controle inflamatório e no estado redox, sugerindo que o uso do eugenol pode ser benéfica para o tratamento da lesão pulmonar (HUANG, LIU, *et al.*, 2015).

Matrizes de bases biológicas foram preparadas utilizando derivados do eugenol através de reações fotocatalítica na presença de tióis e avaliadas quanto ao potencial antibacteriano e antioxidante. O material obtido apresentou uma capacidade anti-adesão promissora contra *Staphylococcus Aureus* (*S.aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*), além de boa atividade antioxidante, sendo capaz de eliminar 90% dos radicais livres avaliados (MODJINOU, VERSACE, *et al.*, 2016).

A análise do efeito protetor do eugenol contra a toxicidade em macrófagos induzida por nicotina, uma substância que tem sido reconhecida como responsável pela indução da produção de espécies reativas de oxigênio foi realizada (YILDIZ, ERCAL e ARMSTRONG, 1998). O trabalho constatou que o uso de eugenol tem potencial aplicação como droga terapêutica para reduzir o estresse oxidativo induzido por nicotina (MAHAPATRA, CHAKRABORTY, *et al.*, 2009).

Esse vasto espectro de efeitos biológicos apresentados pelo eugenol tem tornado essa substância promissora para o desenvolvimento de novos fármacos, tanto buscando ampliar a aplicabilidade da molécula em si como utilizando-a como precursora de novas substâncias através de modificações químicas em sua estrutura conduzindo a formação de seus respectivos derivados.

### 2.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

A transferência de elétrons constitui um dos processos químicos fundamentais para a sobrevivência das células. Porém essa dependência possui um efeito colateral que é a produção de radicais livres e outras Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) que podem causar dano oxidativo. Os radicais livres são átomos ou moléculas produzidos continuamente durante os processos metabólicos e que atuam como mediadores para a transferência de elétrons em algumas reações bioquímicas, desse modo desempenhando funções relevantes ao metabolismo. Os radicais livres desempenham várias funções no organismo vivo, eles encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (ALVES, DAVID, *et al.*, 2010).

Espécies reativas incluem, em cada grupo, não só os radicais ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $\bullet OH$ ,  $NO\bullet$ ), mas também intermediários neutros ou carregados ( $H_2O_2$ ,  $ONOO^-$ ) e outras espécies capazes de formar radicais livres no organismo humano ( $1O_2^*$ ,  $O_3$ , Fe, Cu) (Halliwell & Gutteridge, 2007) (FINKEL e HOLBROOK, 2000).

Em contrapartida o excesso de radicais livres ocasiona efeitos deletérios, tais como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares, como mitocôndrias e membranas, provocando alterações na estrutura e funções celulares e, dessa forma, encontram-se envolvidos em patologias a exemplo de câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas, choque hemorrágico, catarata, disfunções cognitivas, entre outras (GUERRA, 2001) (ZWART, MEERMAN, *et al.*, 1999).

Pesquisas envolvendo compostos antioxidantes oriundos de fontes naturais têm sido desenvolvidas em diferentes centros de estudos devido a sua importância na prevenção do desencadeamento das reações oxidativas, tanto nos alimentos como no organismo animal. Os antioxidantes podem agir retardando ou prevenindo a oxidação do substrato envolvido nos processos oxidativos impedindo a formação de radicais livres (HALLIWELL, AESCHBACH, *et al.*, 1995).

As substâncias que apresentam propriedades antioxidantes são capazes de retardar ou prevenir consideravelmente a oxidação de lipídios ou outras moléculas ao inibirem a iniciação ou a propagação da reação de oxidação em cadeia além de prevenirem ou repararem danos ocasionados às células pelas espécies reativas de oxigênio (CHANWITHEESUK, TEERAWUTGULRAG e RAKARIYATHAM, 2005) (WU, TUNG, *et al.*, 2005).

## 2.4 PROCESSOS BIOCATALÍTICOS: CATÁLISE ENZIMÁTICA

As enzimas são catalisadores biológicos presentes e essenciais a todos os tipos de organismos vivos, estando presente desde da menor e mais simples bactéria ao mais complexo organismo. São macromoléculas constituída em sua grande maioria de proteínas, que forma uma extensa e complexa rede tridimensional sob ação da qual se processa uma diversidade grandiosa de reações bioquímicas. Enzimas transformam substâncias químicas específicas em novas substâncias através de processos de quebra de ligações e de formação de novas ligações.

Na digestão, os processos químicos são facilitados pelas enzimas, onde, aceleram a hidrólise das gorduras, carboidratos e proteínas em suas partes constituintes. A fabricação de pães, a fermentação do suco de uva para produção de vinho, elaboração de cervejas, confecção de queijos e produtos lácteos, são processos desenvolvidos a milhares de ano que possuem em comum a dependência das enzimas para sua produção.

Diversos e importantes fatores contribuem para uma crescente utilização dos biocatalisadores em síntese orgânica, seja na pesquisa ou na produção industrial. Cada vez mais, certas características conhecidas das enzimas, como, por exemplo, a enantioespecificidade e a biodegradabilidade, soma-se à tendência mundial de investimentos em tecnologias mais econômica e limpas. As enzimas aumentam a velocidade das reações, acelerando-as em até  $10^{15}$  vezes (KRAUT, CARROLL e HERSCHLAG, 2003).

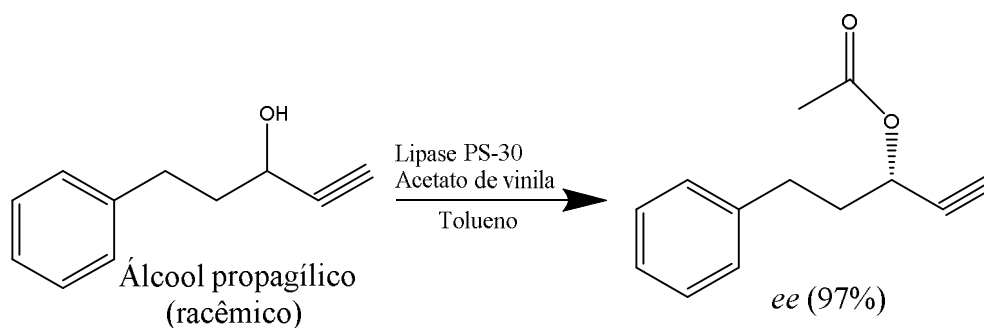
As condições moderadas de reação em que opera a maior parte das enzimas permitem reduzir as reações secundárias, diminuindo a formação de subprodutos indesejáveis, a decomposição e a racemização de substratos e produtos. Geralmente as enzimas atuam em meio aquoso, em valores de pH entre 5 e 8 e temperaturas que variam de 20 a 40°C. A capacidade de diferenciar um dos enantiômeros de um racemato, ou de uma mistura enriquecida em um dos isômeros é uma característica fundamental em áreas em que a pureza ótica dos produtos é imprescindível (BON, FERRARA e CORVO, 2008).

Essas características de seletividade e especificidade em reações tornaram esses biocatalisadores essenciais na síntese de moléculas, especialmente daquelas biologicamente ativas. Isso por que as substâncias com atividade biológica frequentemente apresentam centros assimétricos, ou seja, têm em sua estrutura um ou mais átomos com orientação tridimensional muito bem definida. Qualquer alteração nessa orientação espacial pode conduzir à sua completa inativação ou ao surgimento de efeitos indesejados. Com a crescente demanda por compostos opticamente puros como precursores de drogas modernas e a dificuldade na resolução de racematos, as reações estereosseletivas passaram a ter especial importância para a indústria farmacêutica e de química fina (COELHO, 2001); (PINHEIRO e FERREIRA, 1998) (TEIXEIRA e LOURENÇO, 2014) (FERRAZ, BIANCO, *et al.*, 2007).

Assim, a quiralidade tornou-se a força propulsora para a síntese orgânica e, como é conhecida há muito, a habilidade de fontes naturais em induzir quiralidade, as biotransformações usando catalisadores de origem natural tornaram-se de fundamental importância na obtenção de compostos “chaves” como precursores de produtos acabados nas indústrias farmacêutica, agroquímica e cosmética. Entre os inúmeros exemplos, alguns são citados abaixo.

Misturas racêmicas de álcoois propargílicos (Figura 15), que são importantes intermediários de síntese foram submetidos a resolução cinética através do uso da enzima lipase PS-30 obtendo-se excessos enantioméricos de até 97% (CHEN, 2013).

**Figura 15-** Representação de reação de acilação catalisada por enzima Lipase PS-30

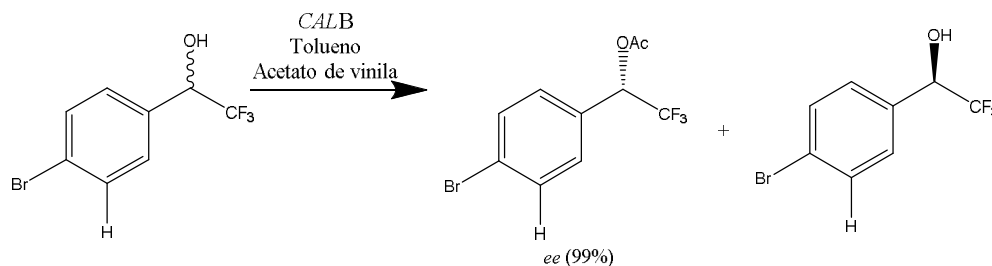


Fonte: (CHEN, 2013)

O uso catalítico da enzima lipase CALB foi plenamente observado na obtenção de compostos organofluor, através de irradiação em micro-ondas e usando acetato de vinila como agente de acetilação e tolueno como solvente. A pureza ótica foi demonstrada na reação, com excessos enantioméricos (*ee*) de até 99% foi verificado (RIBEIRO, RAMINELLI e PORTO,

2013). Resultados como esses são fundamentais na obtenção de substâncias com pureza enantiomérica, no caso dos organofluorados (Figura 16), em especial, uma vez que os mesmos possuem aplicações na indústria de agroquímicos, farmacêutica, antibacterianos, antifúngicas e na química fina (HIYAMA e YAMAMOTO, 2000).

**Figura 16-** Reação de acilação de compostos organofluor catalisada pela enzima CALB.



Fonte (RIBEIRO, RAMINELLI e PORTO, 2013)

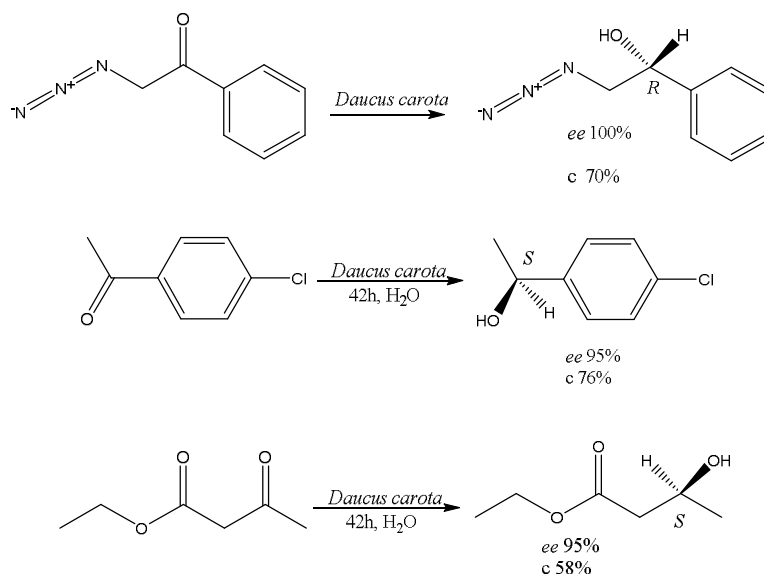
A enzima comercial lipase novozym 435 foi realizada para purificação de isosilibinas pertencentes ao complexo de flavolignanas, extraído das sementes de *Silybum marianum* (cardo de leite), uma classe de substâncias naturais com destacada ação anticancer (DEEP, RAINA, *et al.*, 2008). No procedimento, a de resolução enzimática ocorreu com uma pureza diastereoisomérica de 95% (GAZÁKA, FUKSOVÁ, *et al.*, 2013). O processo envolveu a aplicação da reação de transesterificação estereosseletiva catalisada pela enzima no complexo formado por uma série de estereoisômeros da isosilibina naturais.

#### 2.4.1 Uso de fontes vegetais como biocatalisadores

Um dos trabalhos pioneiros que demonstrou a possibilidade do uso de células de partes integrais de vegetais como catalisador em reações orgânicas foi realizado por (YADAV, NANDA, *et al.*, 2002), que usou um procedimento experimental simples e de baixo custo, alcançando bons rendimentos e excessos enantioméricos. O trabalho envolveu a reação de redução cetonas alifáticas e aromáticas,  $\beta$ -cetoésteres e azidocetonas com *Daucus carota* (cenoura) (Figura 17).



**Figura 17-** Representação de reação de redução catalisada por células vegetais de *Daucus carota*.



Fonte: (YADAV, NANDA, *et al.*, 2002).

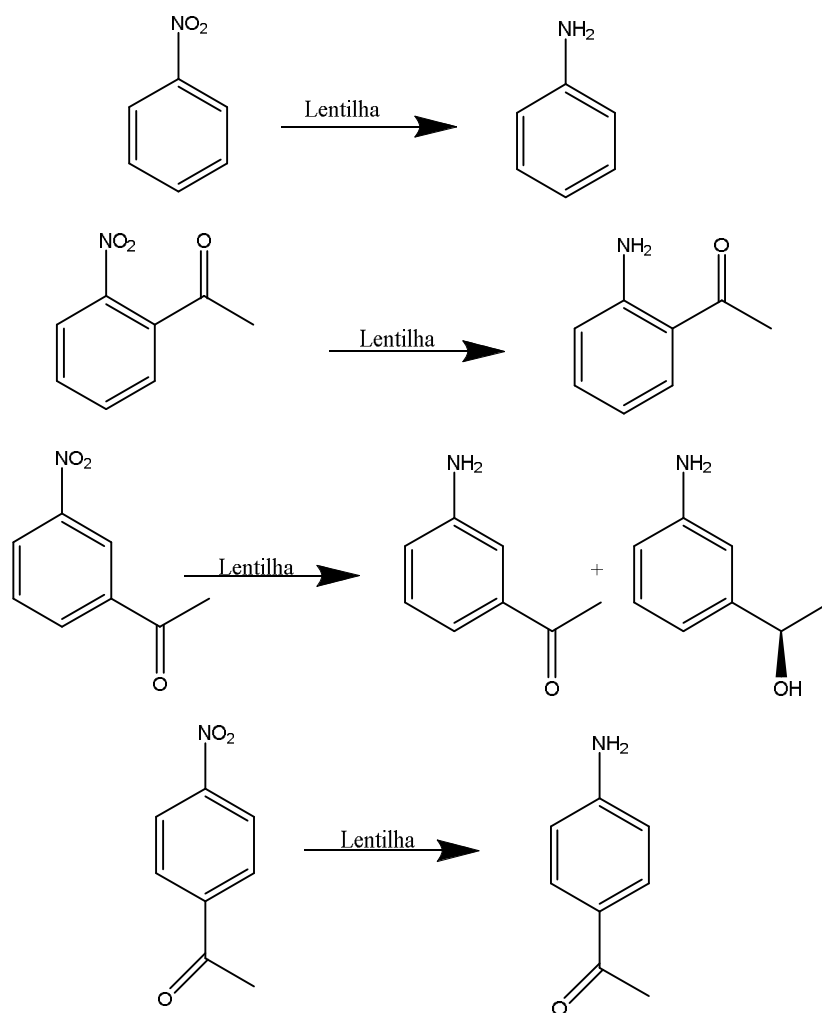
Posteriormente, outras investigações usando a espécie *Daucus carota* em reações de biocatálise foram realizadas. Comasseto (2004) explorou a espécie na obtenção de álcoois organocalcogeno- $\alpha$ -metilbenzil quirais (COMASSETO, OMORI, *et al.*, 2004) e Ferraz (2008) obteve  $\alpha$ -tetralóis substituídos, amplamente empregados como intermediários em síntese, a partir da redução de  $\alpha$ -tetralonas (FERRAZ, BIANCO, *et al.*, 2008).

Assunção e colaboradores (2008) obteve excelentes rendimentos e moderada enantioselectividade ao empregar o potencial de enzimas redutases de *Saccharum officinarum* (cana de açúcar) como fonte para a redução de uma série de cetonas e aldeídos, entre outros compostos (ASSUNÇÃO, MACHADO, *et al.*, 2008).

Várias espécies vegetais também foram exploradas quanto ao seu potencial na reações de oxi-redução enantioselectiva de compostos carbonílicos (ANDRADE, UTSUNOMIYA, *et al.*, 2006). Resultados positivos foram relatados com o uso das cascas do maracujá (*Passiflora edulis*) em reações biocatalíticas (MACHADO, MONTE, *et al.*, 2008) assim como, para o uso do gengibre (*Zingiber officinale*) em síntese orgânica (ALVES, BERTINI, *et al.*, 2015).

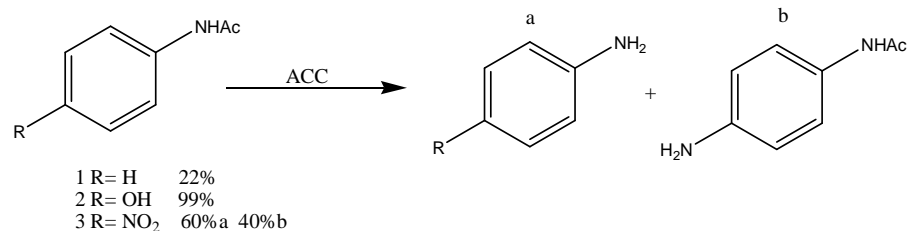
A habilidade de enzimas presentes em células vegetais para reduzir compostos nitros (Figura 18) de forma regioespecífica e quimioespecífica também é relatado na literatura (TAVARES, *et al.*, 2014) (FERREIRA, SILVA, *et al.*, 2012).

**Figura 18-** Representação de reação de redução de grupos nitros por células vegetais de lentilha (*Lens culinaris*)



Fonte: (TAVARES, , *et al.*, 2014).

A hidrólise total do óleo de canola usando sementes de mamona como catalisador, verificando que a hidrólise total do mesmo foi conseguida a 37,5°C através de metodologia simples e prática (AVELAR, CASSIMIRO, *et al.*, 2013). A água de coco também demonstrou efetiva capacidade em reações de hidrólises de amidas, figura 19, (FONSECA, MONTE, *et al.*, 2009).

**Figura 19** - Reação catalisada pelas enzimas presentes na água do coco.

Fonte: (FONSECA, MONTE, et al., 2009)

Uma triagem de diferentes vegetais foi avaliado em reações de hidrólise de ésteres racêmicos foi realizado (Tabela 1), identificando conversões entre 12 e 96% e *ee* variando de 0 a 100% usando plantas como fonte de biocatalisador (AVELAR, CASSIMIRO, *et al.*, 2013).

**Tabela 1-** Triagem de vegetais frente a reações de hidrólise de ésteres racêmicos

<b>Biocatalisador</b>	<b>Parte</b>	<b>(h)</b>	<b>C(%)</b>	<b>ee(%)-OAc</b>	<b>ee(%)-OH</b>
Maçã (frutas)	P	5	68	97	55
Salsifíes (raiz)	P	5	47	13	18
Salsifíes (raiz)	C	5	26	0	01
Cebola vermelhas (bulbo)	C	5	46	59	59
Cebola amarela (bulbo)	C	5	28	30	57
Tomate licorossa (fruto)	P+C	5	52	59	48
Tomate licorossa (fruto)	C	5	43	44	49
Tomate Kumato (fruta)	P+C	5	45	30	34
Tomate Kumato (fruta)	C	5	44	32	36
Gengibre (raiz)	P	5	39	25	39
Gengibre (raiz)	C	5	17	11	59
Cenoura (tubérculo)	P	5	54	32	27
Cenoura (tubérculo)	C	5	37	24	42
Repolho roxo	C	5	76	28	08
Laranjas (fruta)	P+C	5	78	11	03
Salsão verde (talo)	C	24	56	80	32
Salsão branco (talo)	C	28	73	95	24
Chicória	C	5	12	02	01
Batata charlotte (tubérculo)	P	5	84	96	18

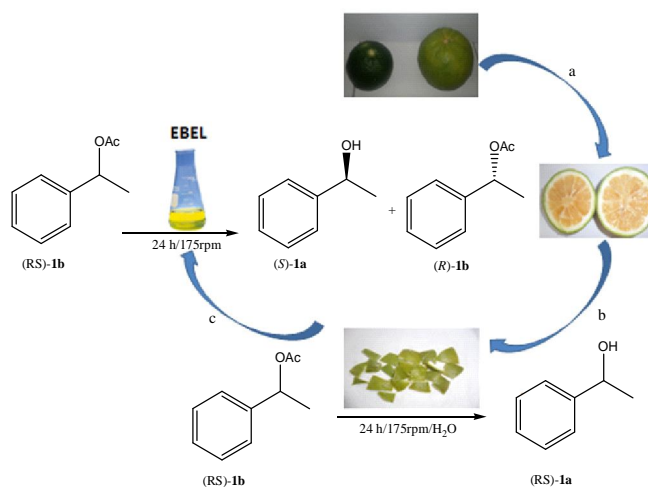
Batata amandine (tubérculo)	P	5	73	88	31
Batata franceline (tubérculo)	P	5	71	83	32
Batata corne de gatte (tubérculo)	P	5	68	76	36
Batata ratte (tubérculo)	P	5	75	91	29
Batata nicolas de (tubérculos)	P	5	73	86	31
Batata manon (tubérculos)	P	5	83	97	19
Batata bintje (tubérculos)	P	5	86	95	16
Beterraba vermelha (raiz)	P	2	68	100	41
Beterraba vermelha (raiz)	C	4	53	100	66

P = polpa; C = casca

Fonte: (AVELAR, CASSIMIRO, *et al.*, 2013).

Recentemente um trabalho sobre o potencial catalítico das cascas da laranja (*Citrus aurantium*) em síntese orgânica foi demonstrado. Reações de hidrólise de ésteres racêmicos foram efetuadas com uso das cascas da fruta como catalisador e apresentaram resultados promissores tanto com o uso das cascas como com seu extrato aquoso, conforme ilustrado a seguir (Figura 20) (SILVA, FERREIRA, *et al.*, 2016).

**Figura 20-** Processos biocatalíticos catalisados por *Citrus aurantium*



Fonte: Elaborado pelo autor (2016)

a- Corte longitudinal na fruta; b- separação manual das cascas; c- trituração das cascas em solução aquosa seguido de filtração e centrifugação, resultando no extrato bruto enzimático da laranja (EBEL).

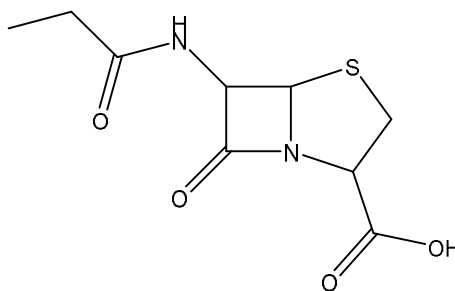
Desta forma, o objetivo do presente trabalho consiste também em avaliar o potencial das cascas de *Citrus* como biocatalisador em reações orgânicas. Dentre as reações, a hidrólise de ésteres aos respectivos álcoois e reações de acetilação de álcoois primários e secundários. As reações serão processadas tanto com derivados do eugenol produzidos inicialmente por via química convencional como com outros substratos com potencial valor econômico e acadêmico.

## 2.5 MICRO-ORGANISMOS: IMPORTÂNCIA, CONTROLE E PATOGENICIDADE

As doenças infecciosas estão associadas diretamente a um elevado número de patologias que afetam negativamente a saúde humana desde a antiguidade. Um expressivo número das doenças infecciosas é causada por bactérias. As infecções causadas por esses microorganismos podem ser prevenidas, controladas e tratadas por meio de substâncias antibacterianas, um grupo de compostos conhecidos como antibióticos (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010).

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano.

Ao longo da história a síntese e descoberta de antibióticos tem sido difícil e teve momento marcante quando Alexander Fleming, em 1928, descobriu acidental a penicilina (figura 21). Uma placa de cultura da bactéria *Staphylococcus* de um experimento foi deixada, acidentalmente, em sua bancada de trabalho, durante um período de férias de duas semanas e tornou-se contaminada com *Penicillium Notatum*. Ao retornar das férias Fleming encontrou a placa e notou que em torno do crescimento das bactérias havia um halo verde-amarelo, com cores bem distintas. “O *Staphylococcus* foi capaz de se reproduzir ao longo da placa, exceto perto da seção contaminada com fungos; Fleming postulou que *Penicillium* foi de alguma forma capaz de inibir o crescimento bacteriano (JBPML, 2009).

**Figura 21-** Estrutura da penicilina

Fonte: (JBPML, 2009)

Mais de uma década se passou após a descoberta de Fleming, quando uma equipe de pesquisadores bioquímicos, Ernst Chain e Florey Howard, da Universidade de Oxford, purificaram e isolaram a penicilina. No ano 1940 a literatura já relatava que camundongos infectados por uma dose letal de *streptococcus*, podiam ser curados com a penicilina. Pesquisas com pacientes começaram imediatamente, e em um 1943 foi publicado um artigo de Florey, que descreveu o incrível sucesso usando-se a penicilina para tratar soldados feridos no norte de África (JBPML, 2009).

Nas décadas de 40 e 50 vários antibióticos foram descobertos através de triagens de produtos naturais microbianos, sendo a maioria deles eficazes para o tratamento de bactérias Gram positivo, destacando-se:

- $\beta$ -lactâmicos, (cefalosporina)
- Aminoglicosídeos (estreptomicina)
- Tetraciclina (clortetraciclina)
- Macrolídeos (eritromicina)
- Peptídeos (vancomicina)

Destaca-se que durante esse período (1940-1950) apenas três derivados sintéticos foram introduzidos no mercado: isoniazida, trimetropim e metronidazol (SILVER, 2011).

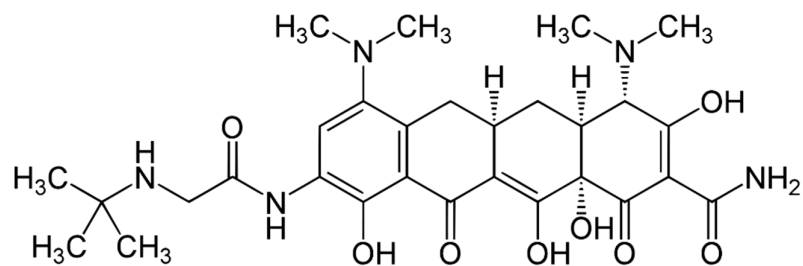
De 1960 a 1980 foram introduzidos no mercado de antibióticos semissintéticos eficazes para o tratamento de patógenos Gram positivo e Gram negativo, análogos aos antibióticos naturais já existentes. A maioria deles foi obtida a partir de protótipos naturais microbianos, como (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010) (PEREIRA-MAIA, SILVA, *et al.*, 2010):

- Derivados  $\beta$ -lactâmicos (análogos de penicilina)
  - Cefalosporina
  - Ácido clavulânico

- Aztreonam
- Análogos da tetraciclina
  - Doxiciclina
  - Minociclina
- Derivados aminoglicosídicos
  - Gentamicina
  - Tobramicina
  - Amicacina)

Entre 1980-2000 as principais ferramentas utilizadas para a busca de novos antibióticos foram a genômica e isolamento e modificação de compostos. Por exemplo, a Tigeciclina (Figura 22), um derivado semissintético da minociclina, que contém o grupo N,N-dimetilglicilamido e apresenta ótima atividade antibacteriana contra bactérias resistentes às primeiras tetraciclinas (SHLAES, 2006). Porém, houve uma redução dramática na identificação de novos protótipos antibióticos, ao mesmo tempo em que ocorreu um aumento na incidência de resistência bacteriana.

**Figura 22-** Estrutura química da Tigeciclina



Fonte: (SHLAES, 2006)

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) de Atlanta, nos Estados Unidos, define que microrganismos resistentes são aqueles que não apresentam sensibilidade a uma ou mais classes de antimicrobianos (OLIVEIRA e SILVA, 2008). Sob a perspectiva laboratorial, entende-se como o crescimento de uma bactéria *in vitro* na presença de concentrações séricas de antibiótico ou quando se mostram resistentes a duas ou mais classes de drogas que interfeririam em suas funções de crescimento e, às quais seriam habitualmente sensíveis (MARTINS, AZEVEDO, *et al.*, 2001) (AZEVEDO, 2005).

Em meados dos anos de 1950, foram encontrados os primeiros registros de surtos por *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina em ambiente hospitalar, fato consolidado quando na década de 1960 surgiu o primeiro caso de resistência às recém descobertas penicilinas  $\beta$ -lactâmicas, como a meticilina, reconhecendo-se, então, no final da década de 1970, as cepas *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) como uma pandemia. Em 2002 nos Estados Unidos, foi descrito o primeiro caso de resistência total do *Staphylococcus aureus* à vancomicina (COHEN e TARTASKY, 1997) (ALANIS, 2005) evidenciando, assim, uma situação ainda distante de controle.

Desta forma, a resistência bacteriana emerge como um problema mundial de saúde pública atraindo a atenção de órgãos governamentais nacionais e internacionais como: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, Brasil), Organização Mundial de Saúde (OMS), o Centro de controle e Prevenção de Doença (CDC, USA) e associações de controladores de infecções hospitalares, além da indústria farmacêutica internacional (HAMBRAEUS, 2006) (BECKER, HU e BILLER-ANDORNO, 2006).

O relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2014) destaca que o uso de drogas antibacterianas se tornou generalizada ao longo de várias décadas (embora o acesso equitativo a medicamentos antibacterianos está longe de estar disponível em todo o mundo), e estas drogas têm sido amplamente utilizadas tanto nos seres humanos como em animais para produção de alimentos favorecendo a seleção e propagação de bactérias resistentes. Consequentemente, drogas antibacterianas tem se tornado menos efetivas ou até mesmo ineficaz, resultando em uma situação de emergência a segurança sanitária mundial que está rapidamente superando as opções de tratamento disponíveis.

A OMS afirma ainda que desenvolvimento de novos drogas para uso como antibacterianos está inferior a necessidade atual, especialmente para o tratamento de bactérias entéricas Gram-negativas, enquanto, considera-se que a investigação sobre tratamentos para substituir drogas antibacterianas ainda está nas fases iniciais. Situações são cada vez mais comuns em que ocorrem casos de bactérias que são resistentes à maior parte, ou mesmo a todos, os medicamentos antibacterianos disponíveis, causando infecções graves que recentemente eram facilmente tratável.

Isto significa que o progresso na medicina moderna, que conta com a disponibilidade de medicamentos anti-bacterianos efetivo, está agora em risco, tal como exemplificado em as seguintes situações:



- Cistite, uma das mais comuns de todas as infecções bacterianas em mulheres, antes tratada por via oral, podem passar ao tratamento por vias injetáveis, impondo custos adicionais a pacientes e sistemas de saúde, ou, até mesmo, tornar-se intratável.
- Infecções comuns em cuidados neonatais e intensivos estão cada vez mais se tornando difíceis de tratamento, senão, impossíveis.
- Os pacientes que receberam o tratamento contra câncer, transplantes de órgãos e outras terapias avançadas, são particularmente vulneráveis à infecção. Quando o tratamento de uma infecção falha em tais pacientes, a infecção é susceptível de risco de vida, podendo ser fatal.
- Preparados antibacterianos utilizados para prevenir infecções de sítios cirúrgicos no pós-operatório tornaram-se menos eficazes ou ineficazes.

Os dados representados na tabela 2 sistematiza o panorama da complexidade atual em nível global quanto ao surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos clinicamente disponíveis (OMS, 2014).

**Tabela 2-** Número de casos de resistência bacteriana a antibióticos relatados.

	Resistência relatada para cada combinação de bactéria-antibacteriano <sup>a</sup>						Total relatado
	Nº de dados relatados com base em pelo menos isolados/Nºtotal de pedidos de cada combinação						
	África	Américas	EMR	EUR	SEAR	WPR	
<i>Escherichia coli</i> / 3 <sup>a</sup> geração cefalosporinas <sup>b</sup>	13/19	14/15	5/7	35/36	5/5	14/19	86/101 (85%)
<i>Escherichia coli</i> / fluoroquinolonas <sup>c</sup>	14/19	16/16	5/7	35/35	5/5	17/20	92/102 (90%)
<i>K. pneumoniae</i> /3 <sup>a</sup> geração cefalosporinas	13/16	17/17	5/7	33/37	4/5	15/17	87/99 (88%)
<i>K. pneumoniae</i> / Carbapenema <sup>d</sup>	4/7	17/17	5/7	31/35	4/5	10/12	71/83 (86%)
Resistente à meticilina <i>S. aureus</i> (MRSA)	9/15	15/17	5/7	36/37	3/4	17/19	85/99 (86%)
<i>S. pneumoniae</i> não sensível ou resistente a penicilina	5/14	15/21	3/5	31/35	2/5	11/18	67/97 (69%)
Nontyphoidal Salmonelas / fluoroquinolonas	9/19	13/20	4/5	29/30	2/4	11/13	68/91 (75%)
Espécies de <i>Shigella</i> / Fluoroquinolonas	4/12	14/19	2/3	10/12	0/2	5/9	35/57 (61%)
<i>N. gonorrhoeae</i> / 3 <sup>a</sup> geração cefalosporinas	2/10	4/12	2/3	17/22	5/7	12/21	42/75 (56%)
Nºtotal de dados com base em 30 isolados	73/131 (56%)	125/154 (81%)	36/51 (71%)	257/279 (92%)	30/42 (71%)	112/147 (76%)	Total 636/805 (79%)

Fonte: (OMS, 2014) AFR, Região da África AMR/PHO, Região das Américas/ Organização Pan americana de saúde; EDCD, Centro Europeu de Prevenção e Controle.; EMR, Região do mediterrâneo oriental; EUR, Região Européia; SEAR, Região do sudeste Asiático; WPR; Região do pacífico ocidental. a. Nem todos os países retornou informações para todas as combinações: b. 3<sup>a</sup> geração cefalosporinas mencionadas em dados nacionais obtidos são ciprofloxacina; Gatifloxacina; Levofloxacina; moxifloxacina; Norfloxacina; Ofloxacina; pefloxacina; refloxacin e esparfloxacina: c. Fluoroquinolonas mencionadas em dados nacionais obtidos são ciprofloxacina, Norfloxacina ou Ofloxacina: d. Carbapenemas mencionadas em dados nacionais obtidos são imipenem, meropenem, doripenem ou ertapenem.

### 3. OBJETIVO (S)

#### 3.1. GERAL

Realizar a síntese e caracterização estrutural de derivados do eugenol e verificar o seu perfil reacional frente a processos biocatalíticos realizados pelo extrato da casca da laranja (*Citrus sinensis*).

#### 3.2. ESPECÍFICOS

- Realizar reações de esterificação do eugenol com diferentes anidridos e ácidos; carboxílicos visando a produção dos respectivos ésteres derivados;
- Realizar reações de adição a dupla ligação do eugenol;
- Purificar os produtos reacionais através de técnicas cromatográficas;
- Caracterizar os derivados através de análises espectrométricas;
- Avaliar o potencial antioxidante dos derivados obtidos a partir do eugenol;
- Verificar o potencial antibacteriano dos derivados obtidos a partir do eugenol;
- Obtenção de extrato da casca da casca da laranja como fonte de biocatalisadores;
- Imobilizar o extrato da casca da laranja em matriz de alginato de cálcio;
- Submeter os derivados obtidos a partir do eugenol a processos biocatalíticos catalisados pelo extrato da casca da laranja imobilizado (ECLI) em esferas de alginato de cálcio;
- Avaliar a quimio, regio e enantiosseletividade do ECLI frente aos derivados do eugenol.

# CAPÍTULO 1

## **SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE DERIVADOS DO EUGENOL**

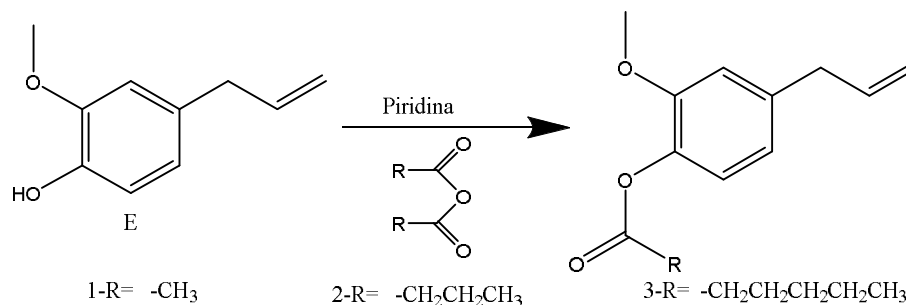
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme mencionado anteriormente, a primeira parte da tese enfocou a síntese de derivados do eugenol por via química clássica, seguido de avaliação do potencial antioxidante e antibacteriano destes derivados. A segunda parte envolveu a investigação do uso de cascas da laranja (*Citrus aurantium*) usando enzimas imobilizadas como catalisador em biotransformações na resolução de misturas racêmicas de derivados do eugenol.

### 4.1 SÍNTESE DE ÉSTERES DERIVADOS DO EUGENOL

A obtenção dos ésteres derivados do eugenol foi realizada partindo-se de duas rotas de síntese, uma utilizando anidridos de ácido carboxílico em reações catalisadas por piridina, representada na Figura 23.

**Figura 23**-Reação de esterificação do eugenol com anidridos de ácidos



Fonte: elaborado pelo autor (2017)

Os rendimentos alcançados (Tabela 3) foram inversamente proporcionais ao tamanho da cadeia alquila do anidrido, logo, o anidrido acético apresentou maior rendimento (88%).

**Tabela 3**- Rendimento das reações de esterificação do eugenol com anidridos de ácidos carboxílicos

Anidrido	Rendimento (%)
Acético	88
Butanóico	72
Hexanóico	60

Fonte: dados da pesquisa

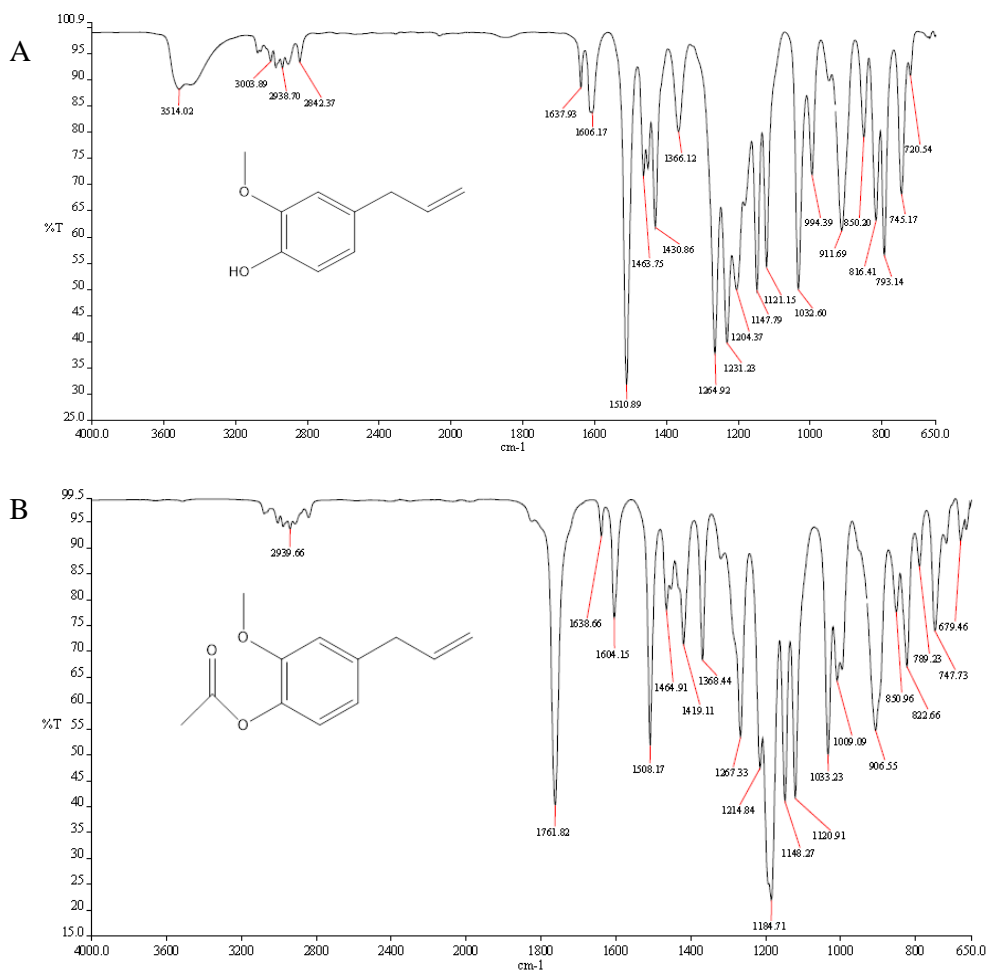
## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS 1-3

A caracterização e pureza dos compostos produzidos foram verificadas através de espectroscopia no infravermelho (IV), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ .

### 4.2.1 Acetato de eugenila (1)

O derivado 1, acetato de eugenila, apresentou um espectro de infravermelho consistente com o esperado (Figura 22) exibindo uma banda intensa em  $1762\text{cm}^{-1}$  característica do grupo  $\text{C} = \text{O}$  de éster. Em adição, foi observado o desaparecimento do sinal largo em  $3514\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento da ligação do grupo  $\text{O-H}$  presente no eugenol.

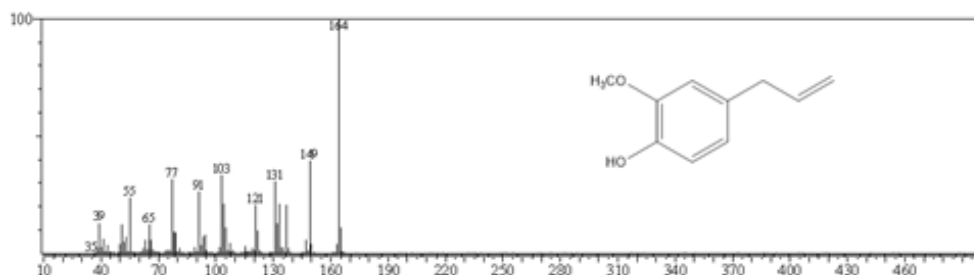
**Figura 24-** Espectro de infravermelho do eugenol (A) e do acetato de eugenila (B)



Fonte: Elaborado pelo autor

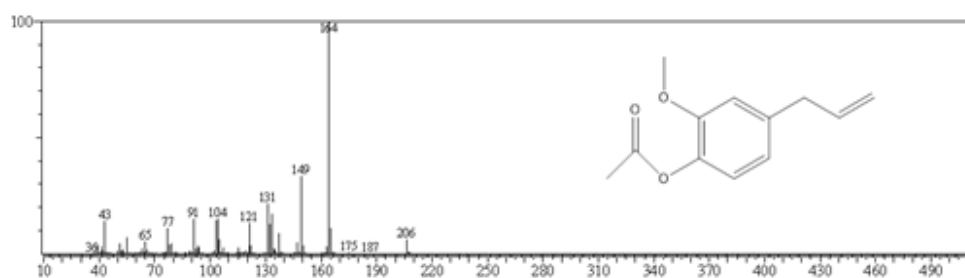
A análise por espectrometria de massas (Figuras 25e 26) também é coerente com o produto, apresentado o íon molecular em  $m/z$  206 e pico base em  $m/z$  164 ( $M - 42$ ,  $H_2C=C=O$ ).

**Figura 25-** Espectro de massa do eugenol



Fonte: Elaborado pelo autor

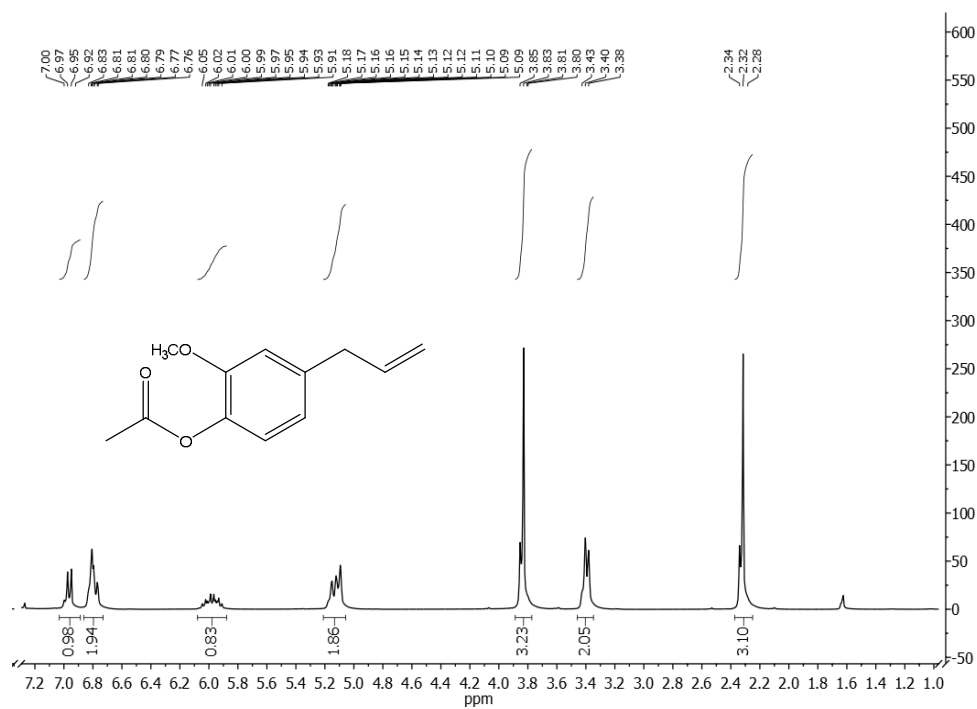
**Figura 26-** Espectro de massas do acetato de eugenila (1)



Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de RMN  $^1H$  de **1**, figura 27, também mostrou os sinais relacionados ao acetato de eugenila, com destaque para o singlete intenso em 2,34 ppm referente aos hidrogênio metílicos do grupo acetila, no espectro de RMN  $^1H$ .

**Figura 27-** Espectro de RMN 1H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) do acetato de eugenila (1).

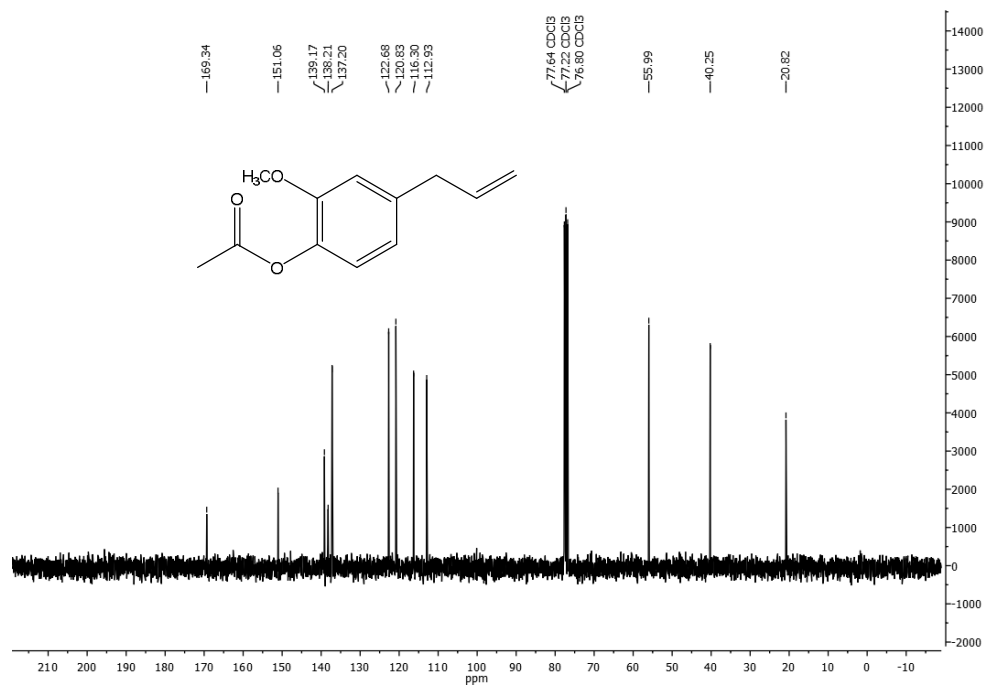


Fonte: Elaborado pelo autor

Os 12 sinais de carbonos esperados para o acetato de eugenila foram observados no espectro de RMN <sup>13</sup>C de **1** (Figura 28), com destaque para o sinal do grupo carbonila do éster em 169,0 ppm.



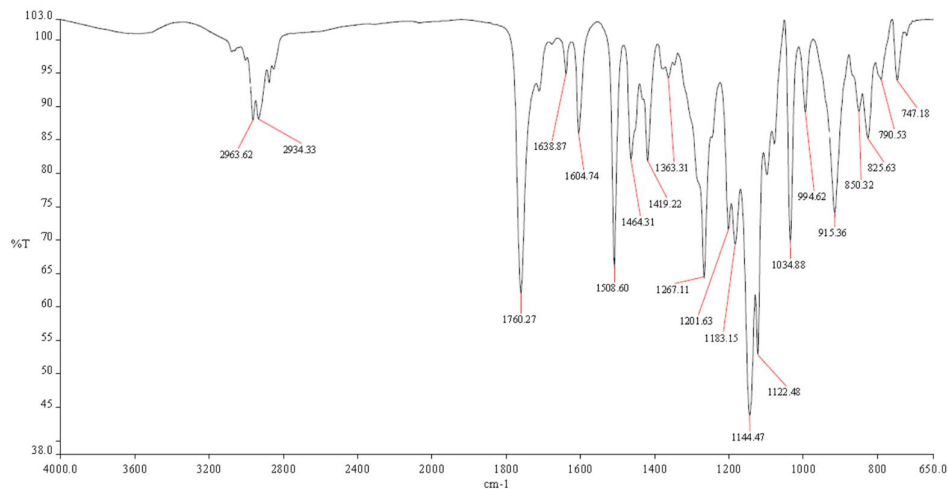
**Figura 28-** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do acetato de eugenila (**1**).



Fonte: elaborado pelo autor

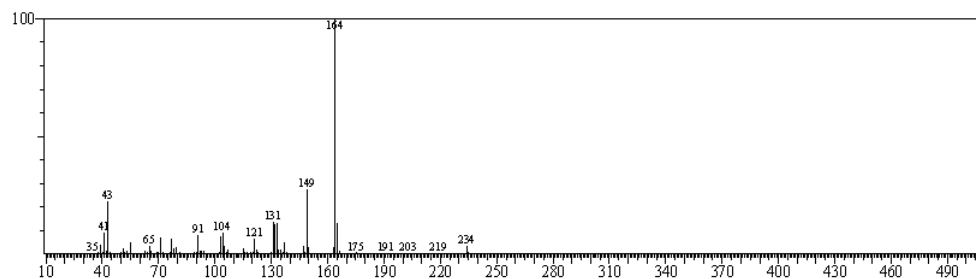
#### 4.2.2 Butanoato de eugenila (2)

O espectro infravermelho do butanoato de eugenila (Figura 29), **2** confirmou a reação de acilação devido à ausência da banda de estiramento da ligação H-O presente no espectro do eugenol, contudo ausente no do éster. O sinal intenso em  $1760\text{cm}^{-1}$  é referente ao estiramento da ligação C=O da carbonila do derivado formado

**Figura 29-** Espectro de Infravermelho do butanoato de eugenila.

Fonte: Elaborado pelo autor

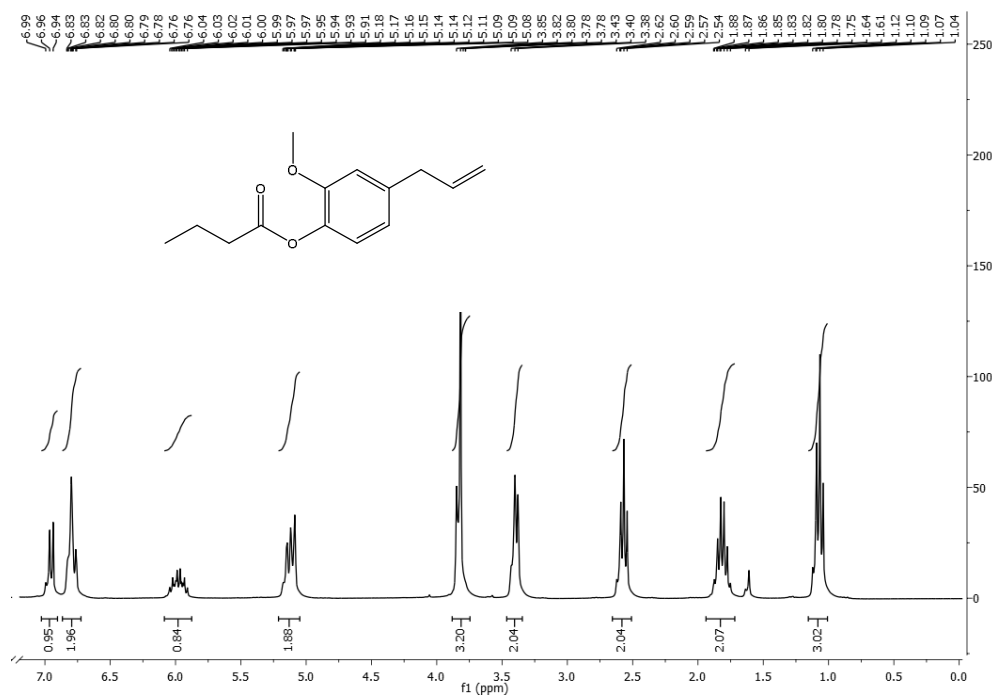
O espectro de massas (Figura 30), apresentou o pico íon molecular em  $m/z$  234 conforme esperado para a massa molar da substância produzida.

**Figura 30 -** Espectro de massa do butanoato de eugenila (2)

Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 31) de **2** apresentou os sinais correspondentes aos diferentes tipos de hidrogênio da molécula com destaques para os dois tripletos em, aproximadamente, 2,10 e 1,10 ppm, devidos ao hidrogênios metilênicos e metílicos dos carbonos alfa e gama em relação ao grupo carbonila, respectivamente.

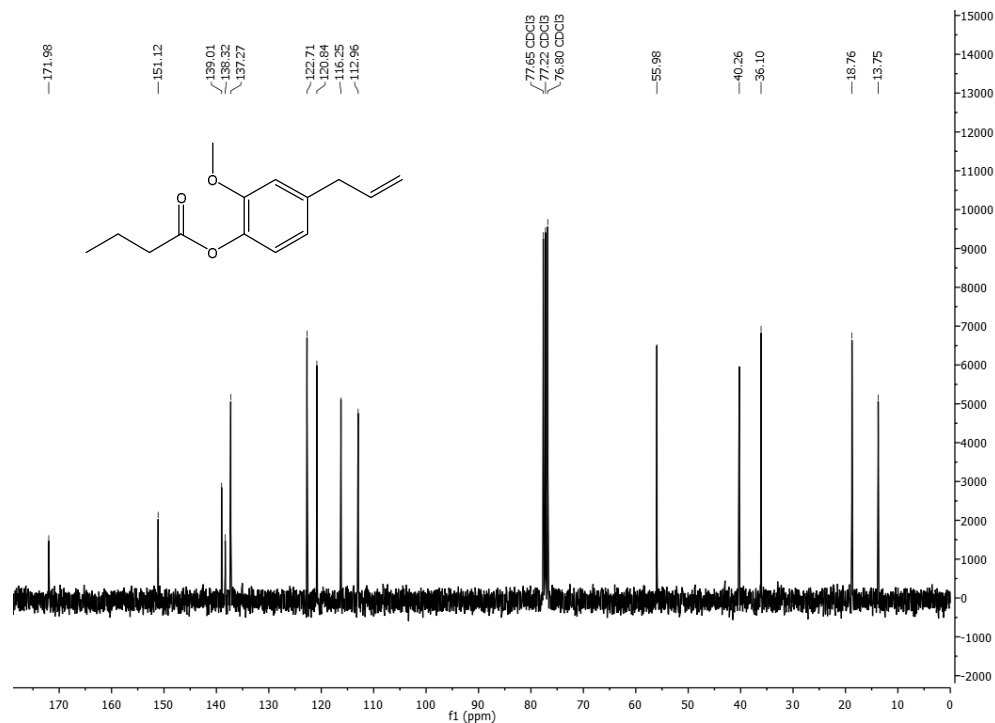
**Figura 31-** Espectro de RMN 1H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) do butanoato de eugenila (2)



Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de RMN 13C (Figura 32) do derivado 2 apresentou 14 sinais de carbono, quatro a mais do que o eugenol, referente a entrada do grupo butanoila na molécula. A ligação C=O do éster apresentou deslocamento químico em 172,0 ppm.

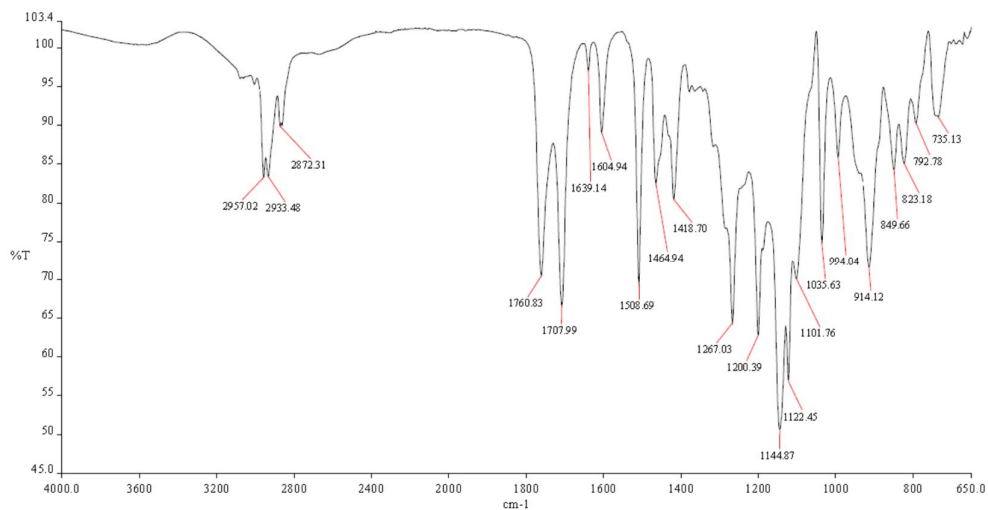
**Figura 32-** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do butanoato de eugenila (2)



Fonte: Elaborado pelo autor

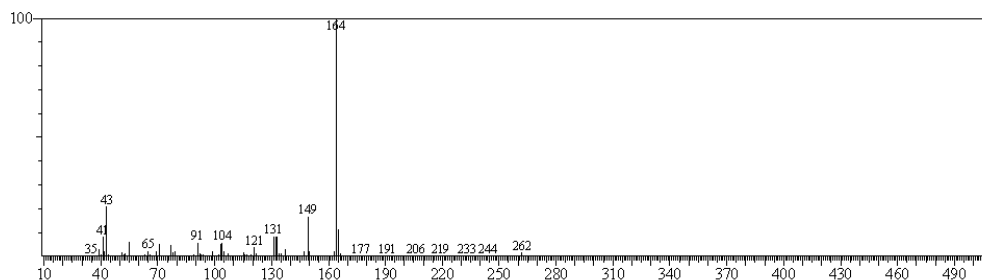
### 4.2.3 Hexanoato de eugenila (3)

A análise cromatográfica e os dados espectroscópicos do hexanoato de eugenila confirmaram sua síntese e pureza. O espectro de infravermelho (Figura 33) mostra a ausência do estiramento da ligação O-H do fenol e a presença de pico intenso em  $1760\text{ cm}^{-1}$  confirmando a presença da carbolina do éster formado.

**Figura 33-** Espectro de infravermelho do hexanoato de eugenila (3)

Fonte: Elaborado pelo autor

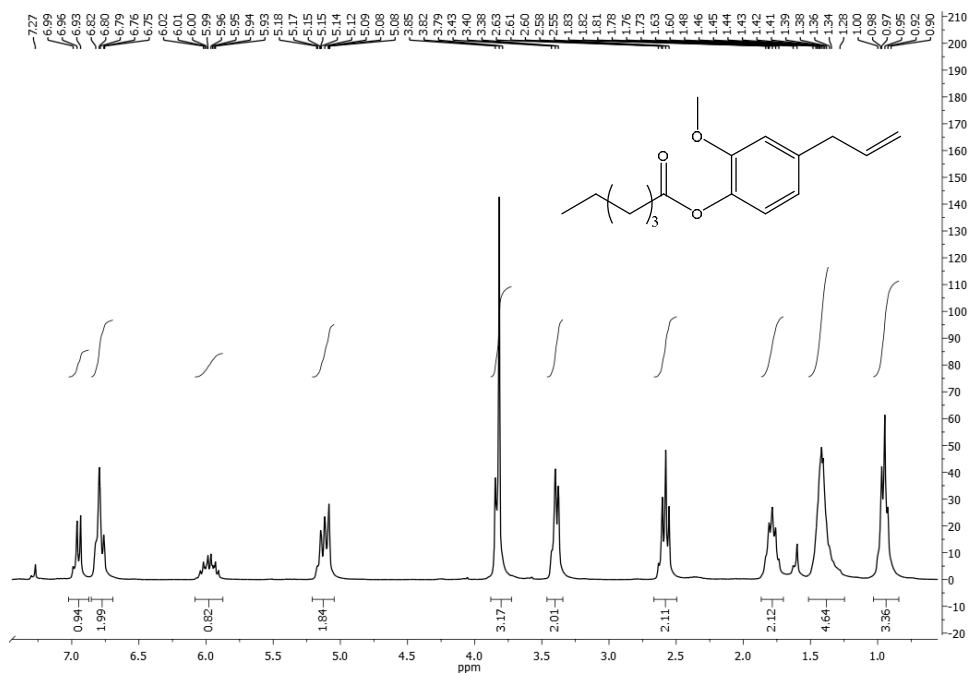
O espectro de massas registrou o pico do íon molecular em  $m/z$  262, conforme esperado e, o pico base em  $m/z$  164 ( $M - C_6H_{10}O$ ), justificado pela perda da cadeia acila através de fragmentação tipo McLafferty e/ou ainda rearranjo de quatro centros (Figura 34).

**Figura 34-** Espectro de massas do hexanoato de eugenila (3)

Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de RMN  $^1H$  (Figura 35) de **3** apresentou os sinais correspondentes aos diferentes tipos de hidrogênio da molécula com destaques para os dois tripletos em, aproximadamente, 2,10 e 0,98 ppm, devidos ao hidrogênios metilênicos e metílicos dos carbonos alfa e ômega em relação ao grupo carbonila, respectivamente.

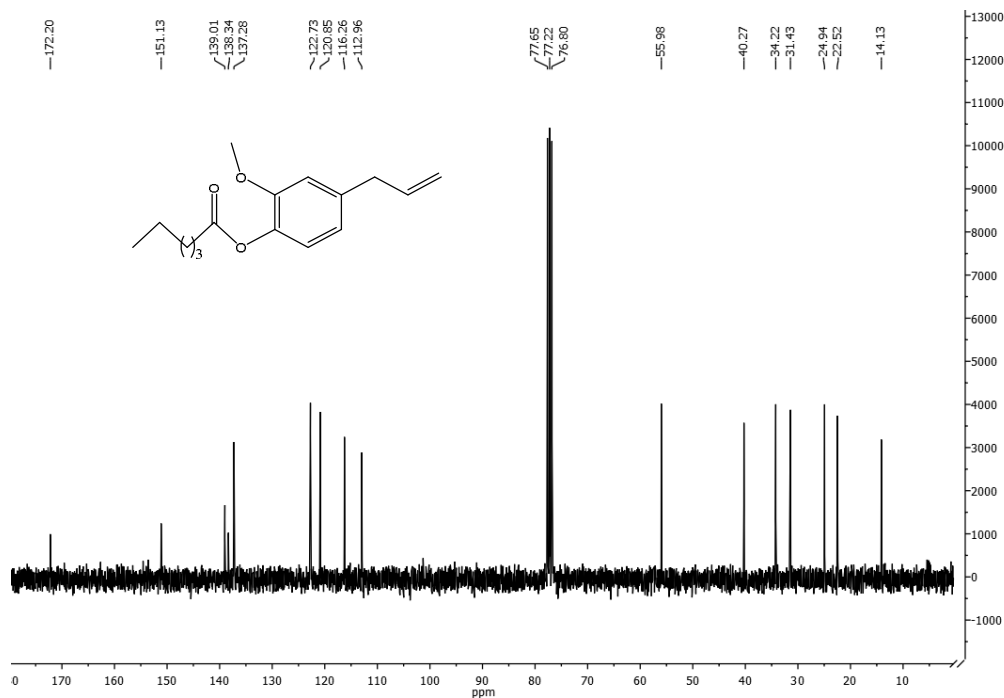
**Figura 35-** Espectro de RMN 1H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) do hexanoato de eugenila (3)



Fonte: Elaborado pelo autor

No espectro de RMN <sup>13</sup>C de 3 (Figura 36) é possível identificar o sinal dos 16 átomos de carbono, entre eles, o sinal com deslocamento químico de 172,0ppm referente a carbonila do éster formado.

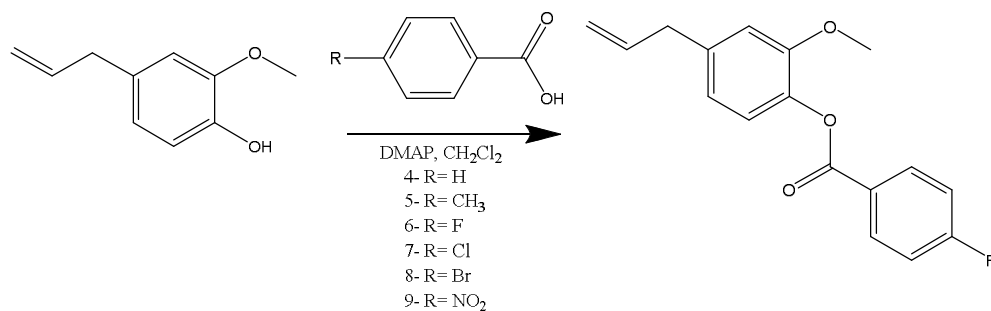
**Figura 36-** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do hexanoato de eugenila (**3**)



Fonte: Elaborado pelo autor

A segunda rota de síntese utilizada para obtenção dos ésteres derivados do eugenol foi através da esterificação do eugenol com diferentes ácidos carboxílicos, representada na figura 37, em reação catalisada por dicicloexilcarbodiimida (DCC) e dimetilaminopiridina (DMAP) utilizando diclorometano (DCM) como solvente. Com essa metodologia foram preparados seis derivados (**4-9**) do ácido benzoico com o eugenol

**Figura 37-** Esquema reacional dos ésteres derivados do eugenol (**4-9**) através de esterificação com ácidos carboxílicos.



Fonte: Elaborado pelo autor

A síntese destes ésteres (**4-9**), figura 38, foi efetuada obtendo-se rendimentos diferentes de acordo com a alteração do substituinte R presente no anel aromático do ácido carboxílico. Relativamente ao éster **4** (R = H), foi observado que as conversões mais satisfatórias foram verificadas para grupos retiradores de elétrons (grupo NO<sub>2</sub>), com destaque para **6** (R = F), onde a reação se processou em um menor tempo e levou a um maior rendimento (Tabela 4).

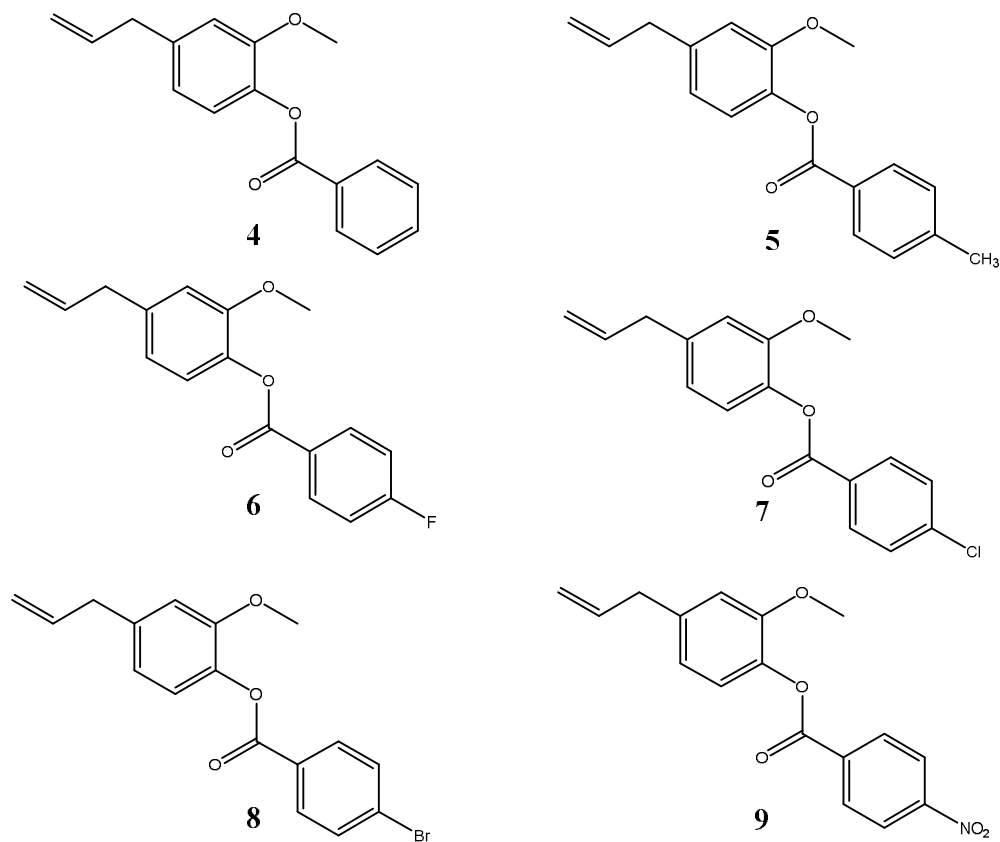
**Tabela 4-** Rendimento das reações de esterificação do eugenol com diferentes ácidos carboxílicos.

Ésteres	Grupo R	Rendimento (%)
4	-H	66
5	-CH <sub>3</sub>	62
6	-F	80
7	-Cl	78
8	-Br	75
9	-NO <sub>2</sub>	70

Fonte: dados da pesquisa



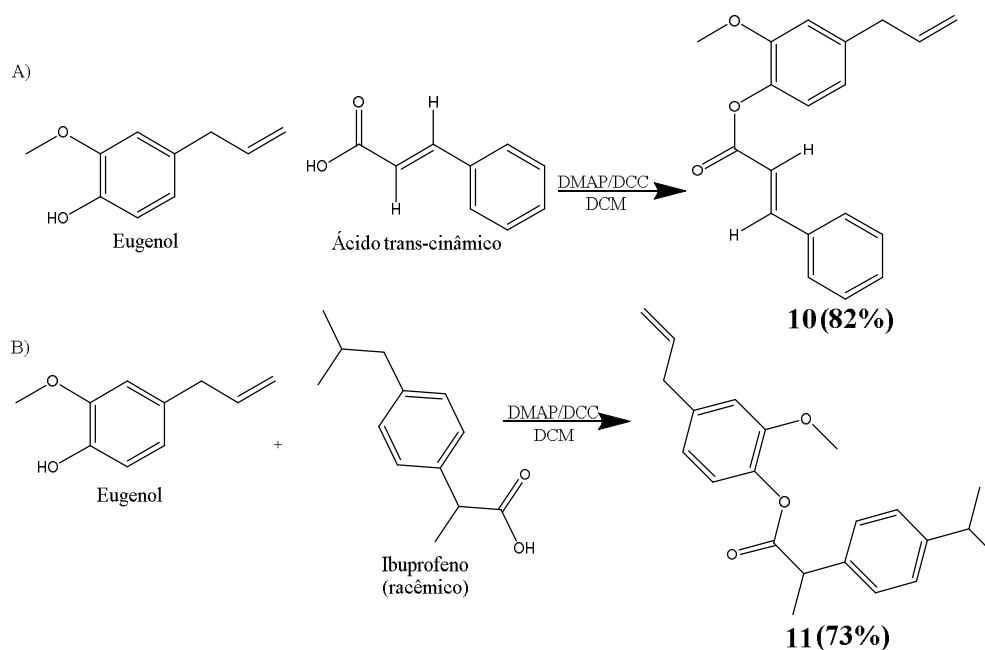
**Figura 38** - Estruturas químicas dos ésteres derivados do eugenol formados (4-9).



Fonte: Elaborado pelo autor

Além das reações empregando ácidos carboxílicos com diferentes grupos na posição *para*, dois outros ésteres do eugenol foram produzidos usando ácidos carboxílicos nos quais o grupo carboxila não está diretamente ligado ao anel aromático. Estes ácidos foram o ácido trans-cinâmico e o ácido 2-(4-isopropilfenil) propanoico (ibuprofeno) (Figura 39). O primeiro apresenta emprego na indústria de perfumaria e como fungicida. O segundo é um anti-inflamatório não esteroide de amplo uso no combate a dor, febre e inflamação.

**Figura 39-** Reação de síntese dos ésteres (**10-11**) derivados do eugenol com o ácido cinâmico e ibuprofeno.

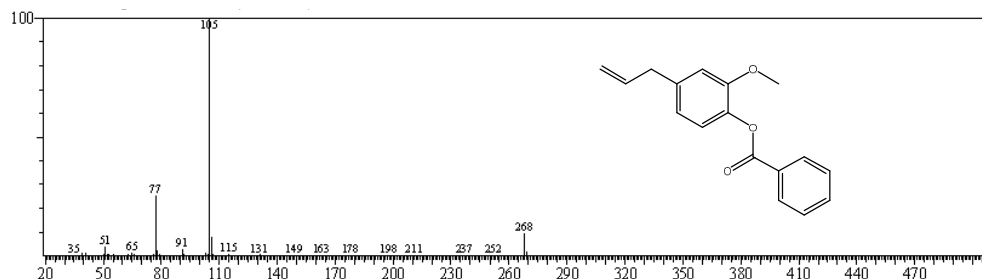


Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.2.4 Benzoato de eugenila (**4**)

Os dados espectroscópicos obtidos foram consistentes com a estrutura benzoato de eugenila (**4**). O espectro de massa (Figura 40) apresentou o íon molecular com  $m/z$  de 268, compatível com massa molecular do benzoato de eugenila e o pico base em  $m/z$  105 ( $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}^+$ ).

**Figura 40.** Espectro de massa do benzoato de eugenila (**4**)

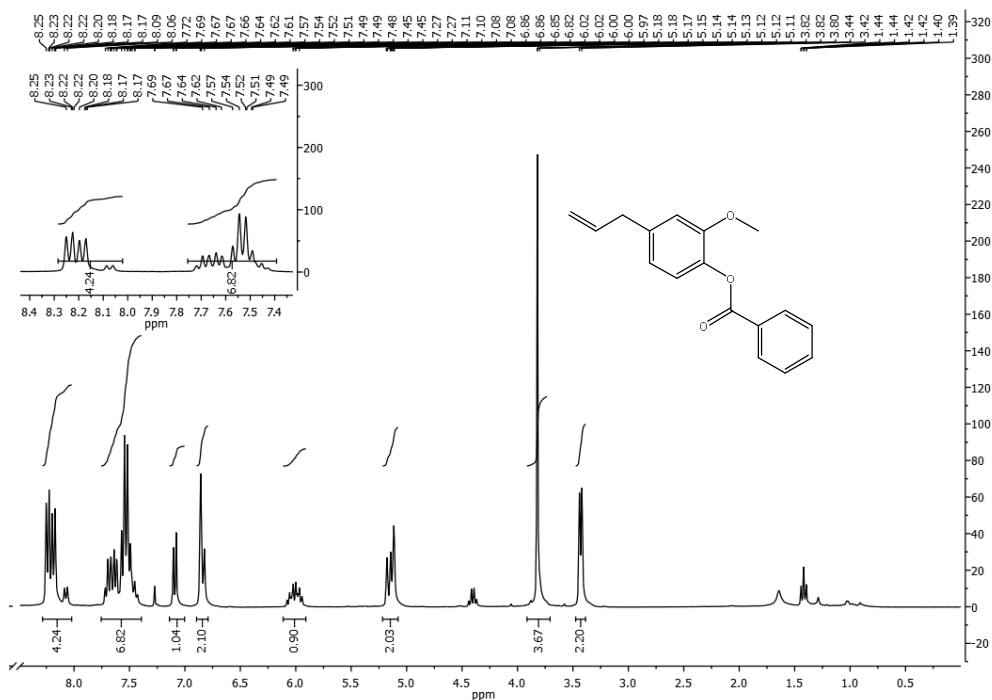


Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 41) registrou os sinais devidos aos hidrogênios aromáticos (8H) e olefínicos (3H), com destaque para os dois hidrogênios da parte benzoil *orto*

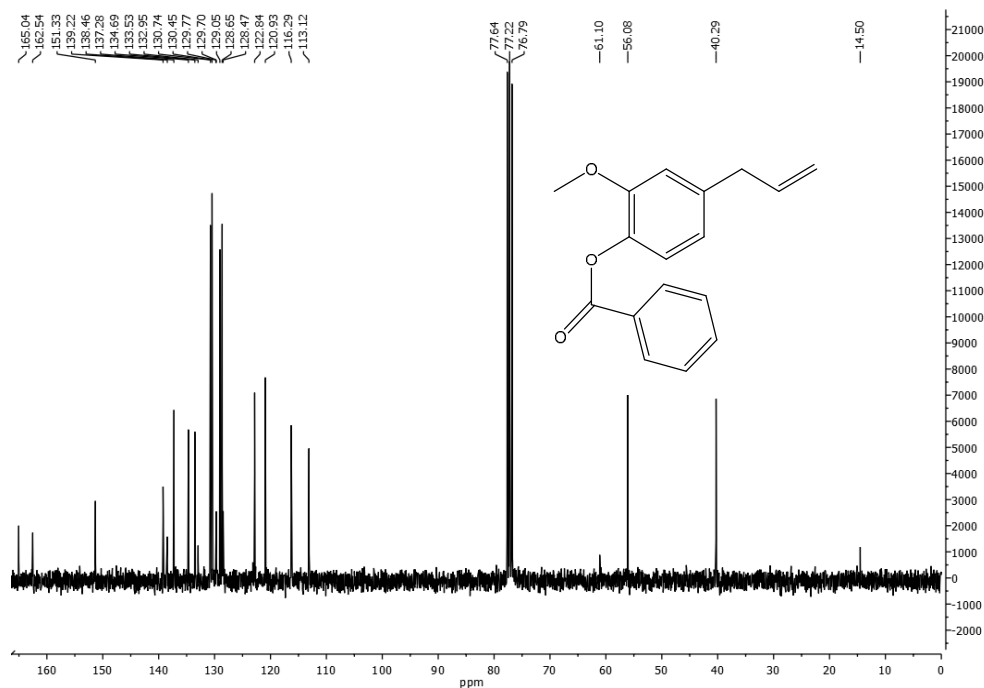
ao grupo carbonila, com sinal centrado em 8,20 ppm (2H) e multiplicidade dubleto largo ( $J = 8,0$  Hz). No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 42) foram registrados os dez sinais referentes aos dois núcleos aromáticos, com o deslocamento químico do grupo carbonila do éster em 162,5 ppm. Ambos os espectros (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) demonstram a existência de uma mistura (aprox. 1 : 1) constituída do produto **4** e do reagente ácido benzóico, não esterificado.

**Figura 41-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do Benzoato de eugenila (**4**)



Fonte: Elaborado pelo autor

**Figura 42-** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do benzoato de eugenila (**4**).

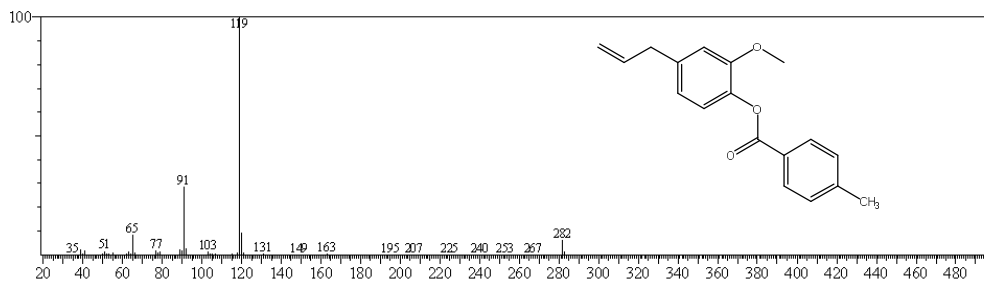


Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.2.5 4 -Metilbenzoato de 4-alil-2-metoxifenil (**5**)

O espectro de massas (Figura 43) de **5** exibiu o pico *em*  $m/z$  282 correspondente ao íon molecular, assim como, o pico base *em*  $m/z$  119 ( $\text{H}_3\text{CC}_6\text{H}_5\text{CO}^+$ ) devido a um cátion estável resultante de processo característico de fragmentação.

**Figura 43-** Espectro de massas do 4-metilbenzoato de 4-alil-2-metoxifenil (**5**)

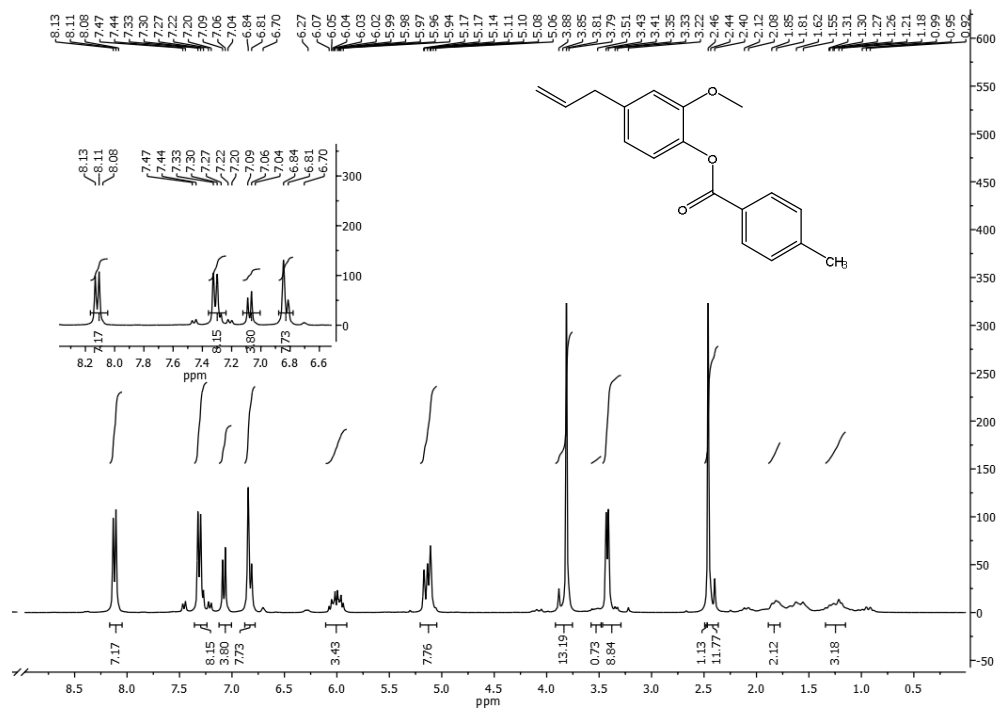


Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 44) de **5** apresentou os sinais compatíveis com o éster **5**, com destaques para o duplo dubleto em 8,11 (2H, 9,0 Hz) e 7,30 ppm (2H, 9,0 Hz) e o

singleto em 2,40 ppm (3H). Os dois dubletos são característicos de sistema aromático *para* substituído, enquanto, o singleto é referente ao grupo metila no carbono C-4 do sistema benzoil.

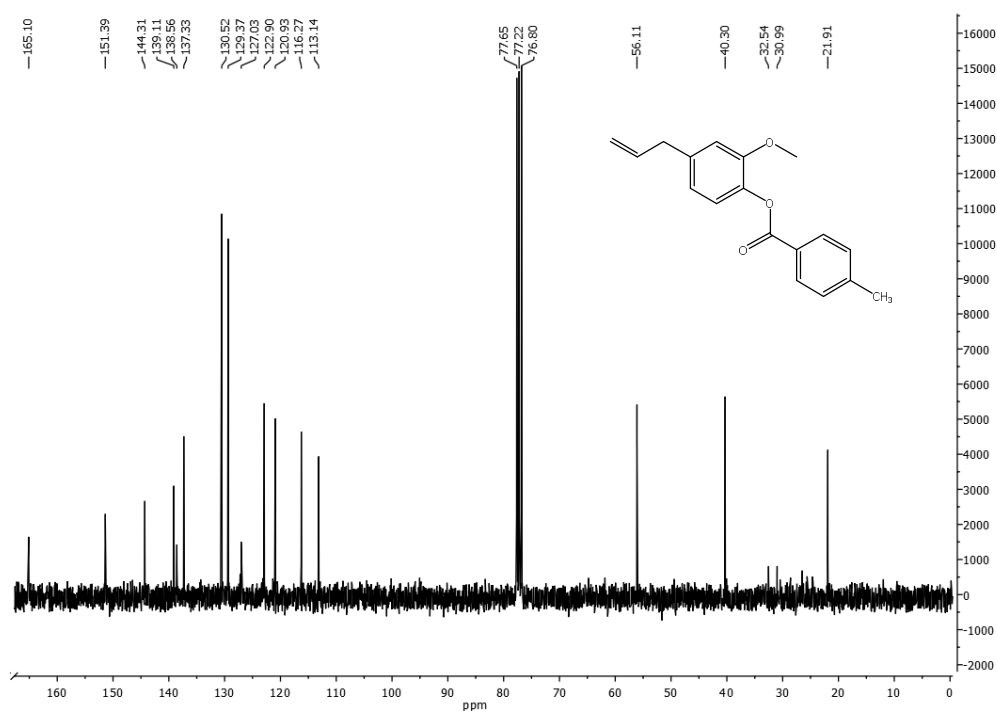
**Figura 44-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do 4-metilbenzoato de 4-alil-2-metóxiifenil (5).



Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 45) de **5** apresentou os 15 sinais referentes aos 15 carbonos magneticamente diferentes, com o sinal do carbono carbonílico do éster em 165,0 ppm.

**Figura 45-** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do 4-metilbenzoato de 4-alil-2-metóxi-fenila (**5**)

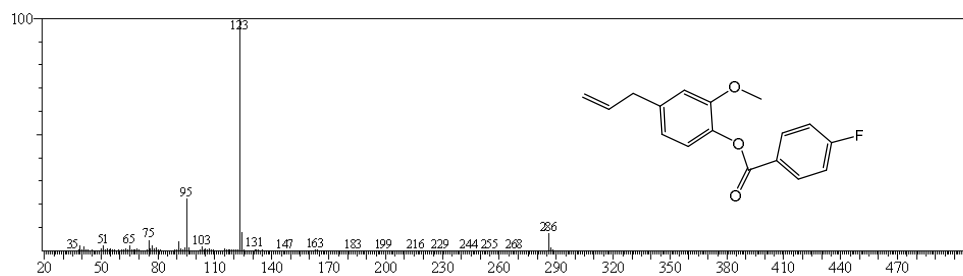


Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.2.6 4 -Fluorobenzoato de 4-alil-2-metoxifenil (**6**)

O espectro de massas (Figura 46) de **6** exibiu o pico *em*  $m/z$  286 correspondente ao íon molecular e o pico base *em*  $m/z$  123 ( $\text{FC}_6\text{H}_5\text{CO}^+$ ) devido a um cátion estável resultante de processo característico de fragmentação.

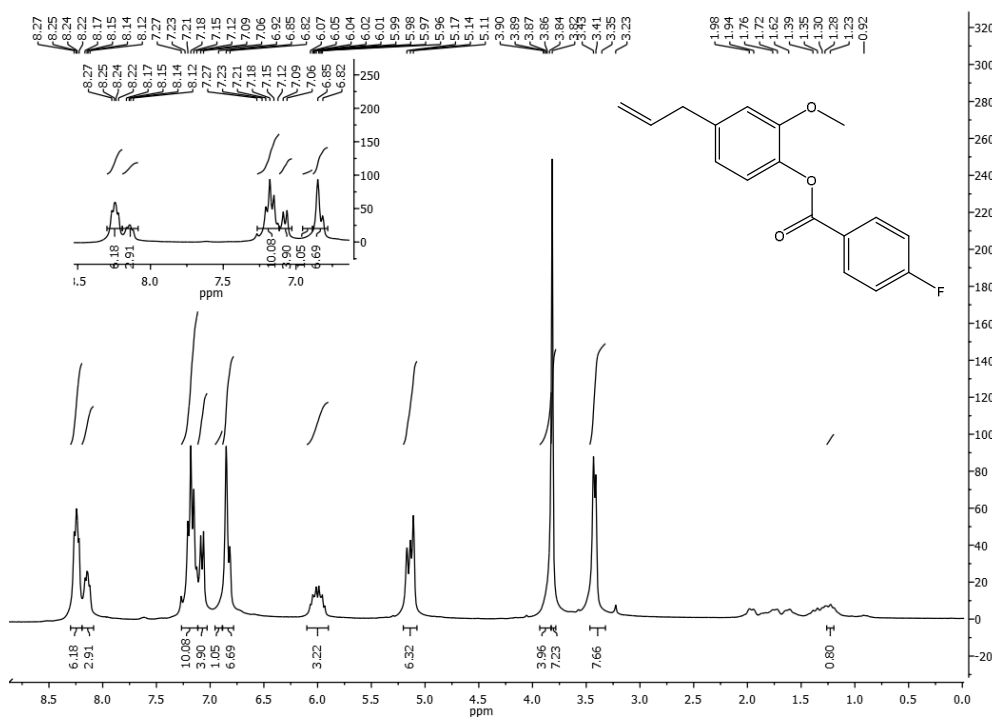
**Figura 46-** Espectro de massas do 4-fluorobenzoato de 4-alil-2-metoxifenila (**6**)



Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 47) de **6** apresentou os sinais característicos e complexos resultantes de acoplamentos entre os hidrogênios aromáticos entre si ( $^3\text{J}$ ) e com o átomo de flúor ( $^3,4\text{J}$ ) na parte benzoil da molécula. Os dois hidrogênios *orto* à carbonila com sinais múltiplos em torno de 8,15 ppm não são equivalentes, em consequência da influência do átomo de flúor.

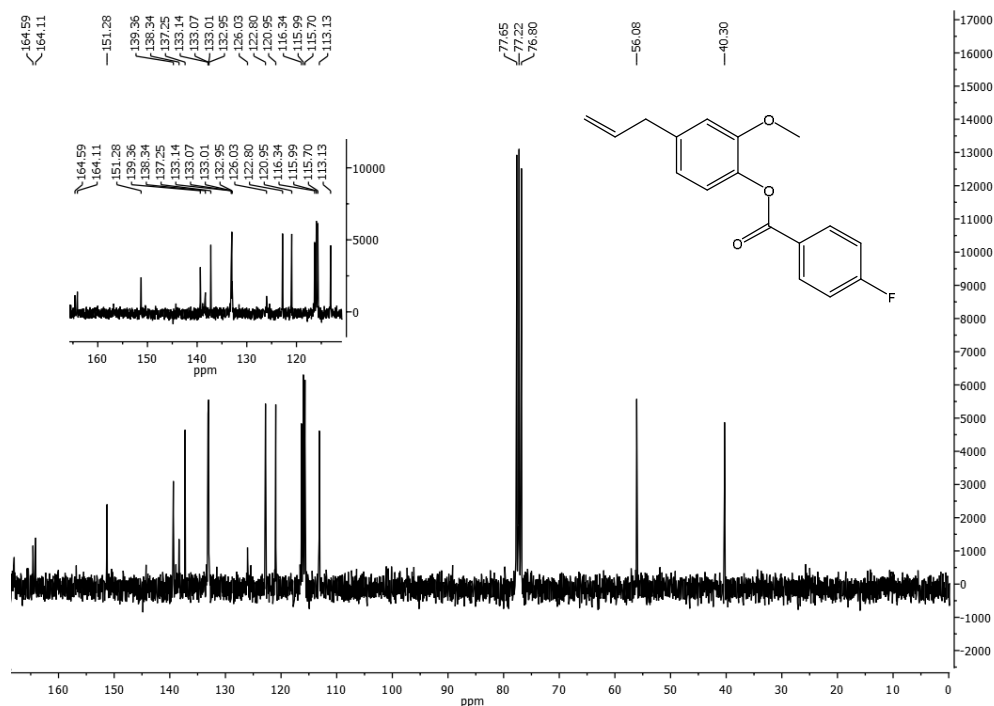
**Figura 47-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do 4-flúorobenzoato de 4-alil-2-metóxfenila (**6**)



Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 48) apresentou os sinais esperados para o derivado **6**, alguns ligeiramente desdobrados devido novamente a influência do átomo de fluor. O carbono carbonílico da função éster originou sinal em 164,6 ppm.

**Figura 48-** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do 4-flúorbenzoato de 4-alil-2-metóxicfenila (**6**)

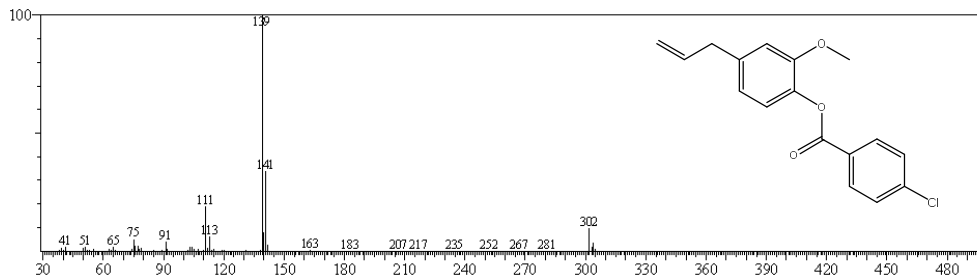


Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.2.7 4-clorobenzoato de 4-alil-2-metóxicfenil (**7**)

O espectro de massa (Figura 49) do derivado **7** exibiu dois picos em  $m/z$  302 (M) e  $m/z$  304 (M + 2) com intensidade relativas 3:1 ao nível do íon molecular, característico de molécula contendo átomo de cloro ( $^{35}\text{Cl}$  e  $^{37}\text{Cl}$ ). Esta característica foi também observada no processo de fragmentação demonstrado pelo registro dos picos mais intensos no espectro em  $m/z$  139/141 ( $\text{C}_7\text{H}_5\text{CO}^+$ ) com intensidades relativas de 3:1.

**Figura 49-** Espectro de massas do 4-clorobenzoato de 4-alil-2-metóxicfenil (**7**).

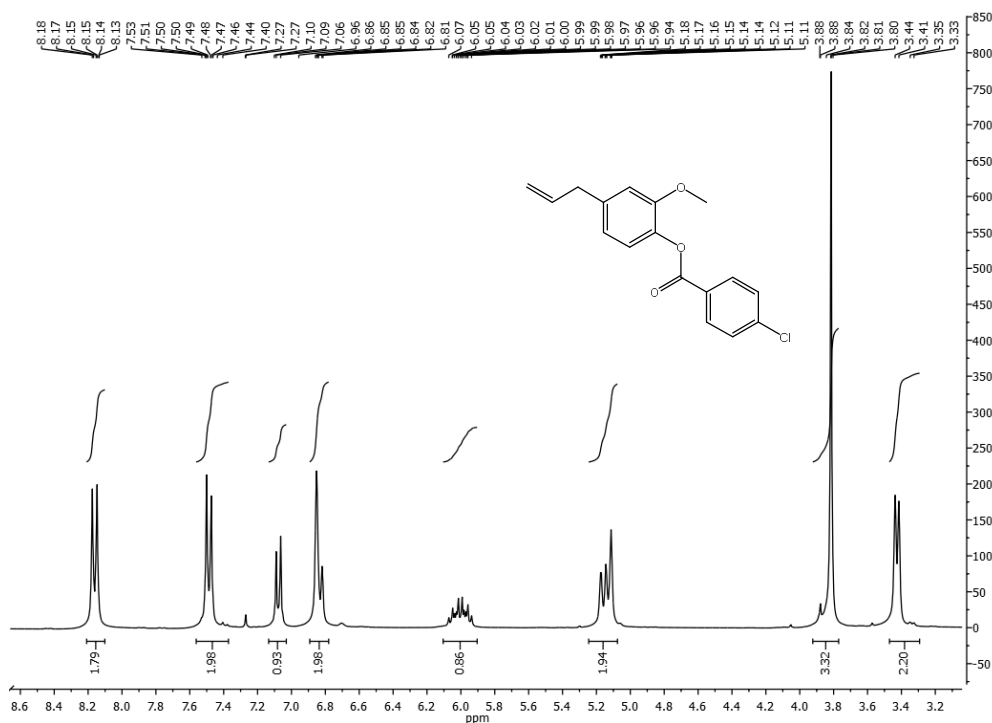


Fonte: Elaborado pelo autor



A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **7** (Figura 50) permitiu identificar os hidrogênios aromáticos no intervalo de deslocamento químico entre 6,57 e 8,20 ppm, bem como, a presença do anel aromático *para* substituído através dos dois dubletos em 8,15 (2H, 9,0 Hz) e 7,48 ppm (2H, 9,0 Hz). Os sinais para todos os outros hidrogênios podem ser facilmente identificados no espectro.

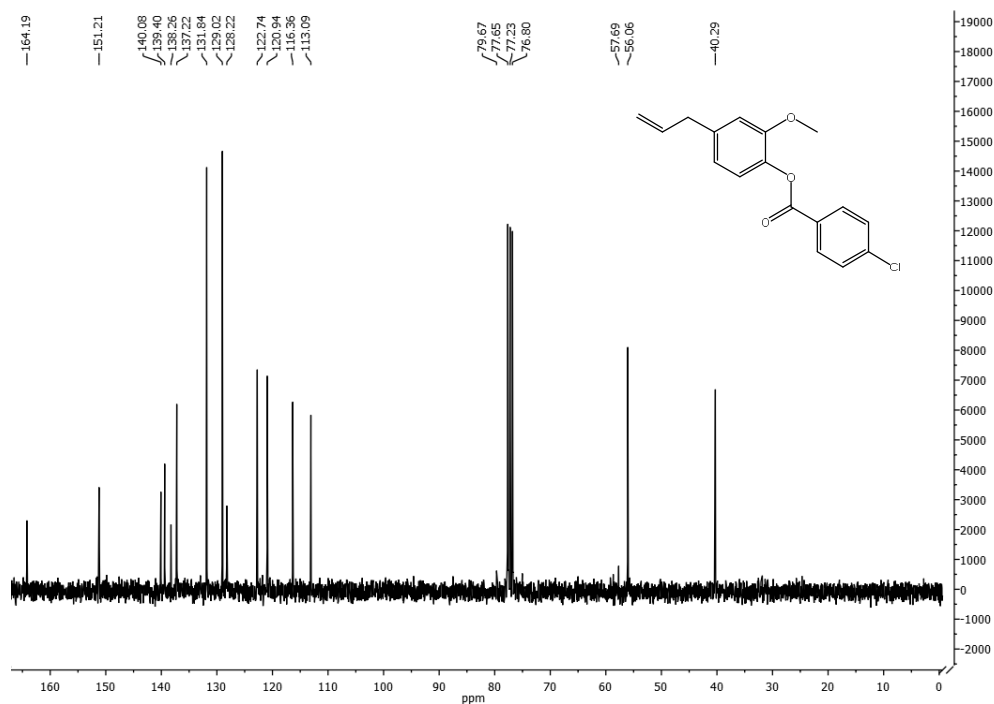
**Figura 50-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do 4-clorobenzoato de 4-alil-2-metóxfenila (**7**)



Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 51) de **7** apresentou os quinze sinais esperados para o composto **7**, destacando-se o sinal da carbonila do éster com deslocamento em 164,0 ppm. O espectro permitiu ainda, reconhecer os seis sinais (164,2, 151,2, 140,1, 139,4, 138,2 e 128,2 ppm) de menores intensidades devidos aos seis átomos de carbonos não hidrogenados.

**Figura 51-** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do 4-clorobenzoato de 4-alil-2-metóxi-fenila (**7**)

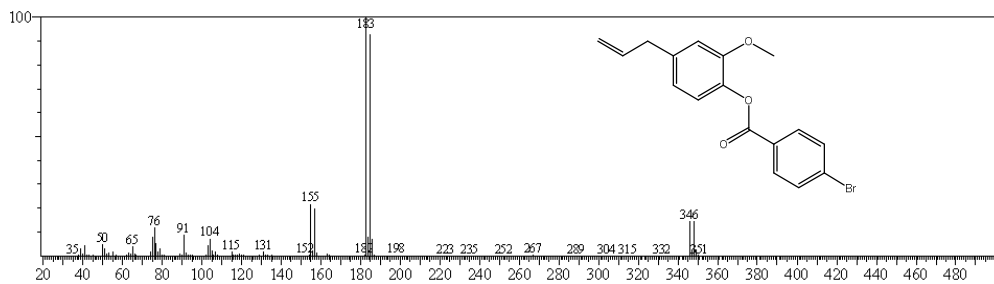


Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.2.8 4-bromobenzoato de 4-alil-2-metoxifenil (**8**)

O espectro de massa (Figura 52) do derivado **8** exibiu dois picos em  $m/z$  346 (M) e  $m/z$  348 (M + 2) com intensidade relativas 1:1 ao nível do íon molecular, característico de molécula contendo átomo de bromo ( $^{79}\text{Br}$  e  $^{81}\text{Br}$ ). Esta característica foi também observada no processo de fragmentação demonstrado pelo registro dos picos mais intensos no espectro em  $m/z$  183 e  $m/z$  185 ( $\text{BrC}_6\text{H}_5\text{CO}^+$ ) com intensidades relativas de 1:1.

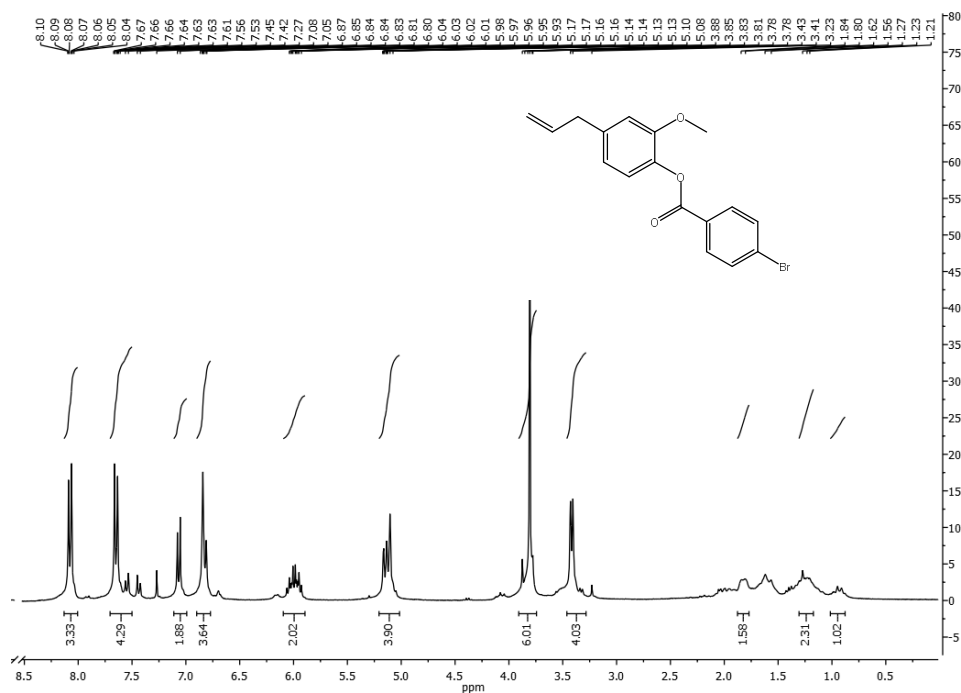
**Figura 52-** Espectro de massas do 4-bromobenzoato de 4-alil-2-metoxifenila (**8**)



Fonte: Elaborado pelo autor

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **8** (Figura 53) permitiu identificar os hidrogênios aromáticos no intervalo de deslocamento químico entre 6,57 e 8,20 ppm, bem como, o anel aromático *para* substituído através dos dois dubletos em 8,05 (2H, 9,0 Hz) e 7,65 ppm (2H, 9,0 Hz). Os sinais para todos os outros hidrogênios podem ser facilmente identificados no espectro.

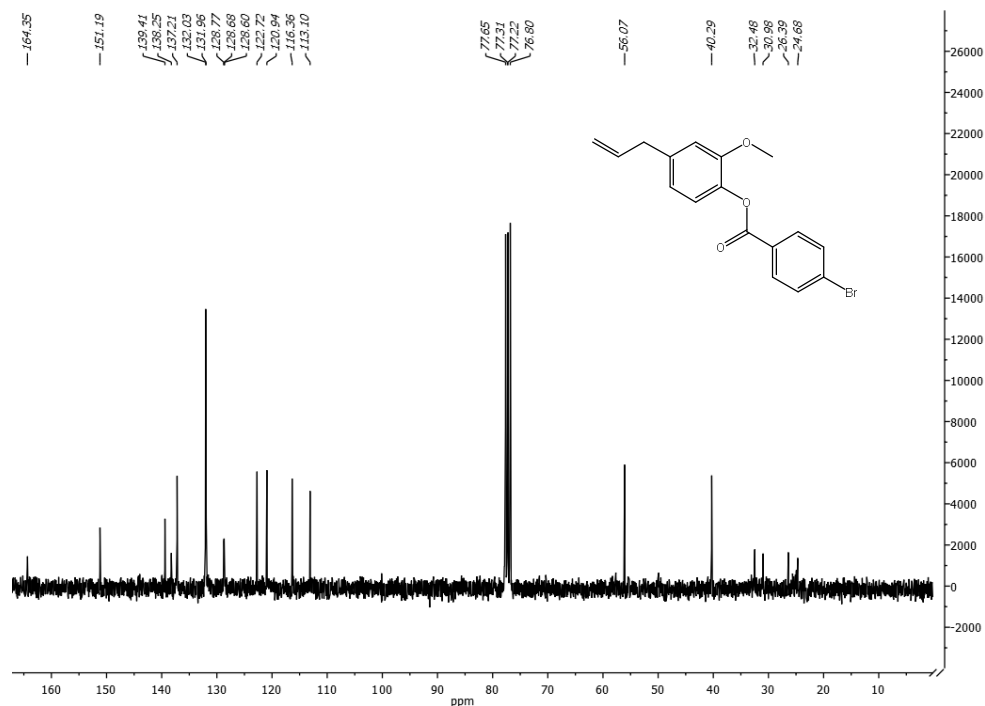
**Figura 53-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do 4-bromobenzoato de 4-alil-2-metoxifenila (**8**)



Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 54) de **8** apresentou os sinais esperados, destacando-se o sinal da carbonila do éster com deslocamento em 164,0 ppm. O espectro permitiu ainda, reconhecer os seis sinais (164,3, 151,2, 139,4, 138,3, 137,2 e 128,6 ppm) de menores intensidades devidos aos seis átomos de carbonos não hidrogenados.

**Figura 54-** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do 4-bromobenzoato de 4-alil-2-metoxifenil (**8**)

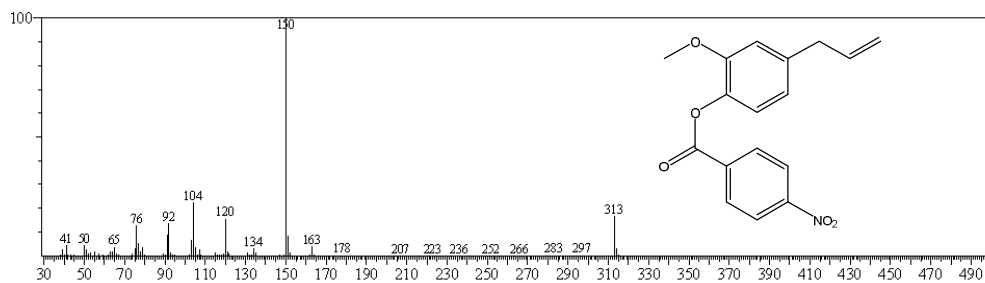


Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.2.9 Caracterização do 4-nitrobenzoato de 4-alil-3-metoxifenila (**9**)

O espectro de massas (Figura 55) de **9** exibiu o pico correspondente ao íon molecular em  $m/z$  313 e o pico base em  $m/z$  150 ( $\text{O}_2\text{NC}_6\text{H}_5\text{CO}^+$ ) devido a um cátion estável resultante de processo característico de fragmentação.

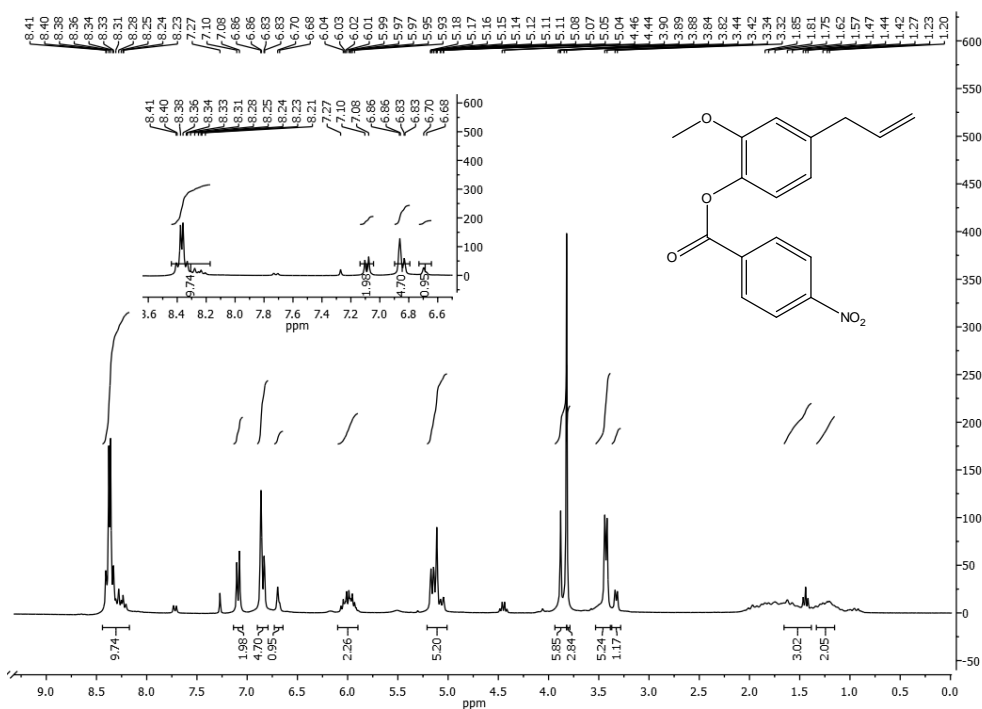
**Figura 55-** Espectro de massa do 4-nitrobenzoato de 4-alil-3-metoxifenila (**9**)



Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 56) de **9** apresentou sinais consistentes com o produto. Os sinais dos hidrogênios aromáticos foram registrados na faixa de 6,80 a 8,40 ppm, com destaque para a absorção intensa em 8,33 - 8,40 ppm, resultante da superposição parcial de dois dubletos ( $J = 8,8$  Hz), um atribuído aos dois hidrogênios *orto* a carbonila e outro aos dois hidrogênios *orto* ao grupo nitro, no sistema aromático 1,4-dissubstituído.

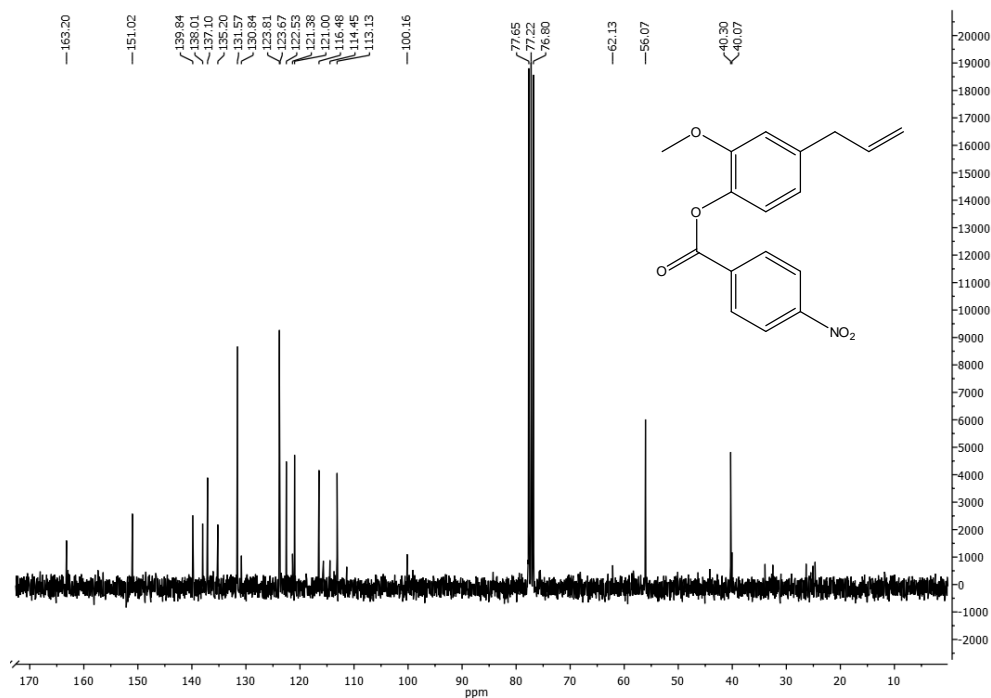
**Figura 56-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do 4-nitrobenzoato de 4-alil-2-metóxfenila (**9**)



Fonte: Elaborado pelo autor

Os sinais no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 57) são compatíveis com o produto **9**, onde aparecem destacados os sinais dos carbonos metínicos *orto* à carbonila e *orto* ao grupo nitro (123,7 e 131,6 ppm, respectivamente), o sinal do carbono não hidrogenado sustentando o grupo nitro (151,0 ppm) e o sinal do carbono carbonílico (163,2 ppm).

**Figura 57-** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do 4-nitrobenzoato de 4-alil-2-metóxi-fenila (**9**)

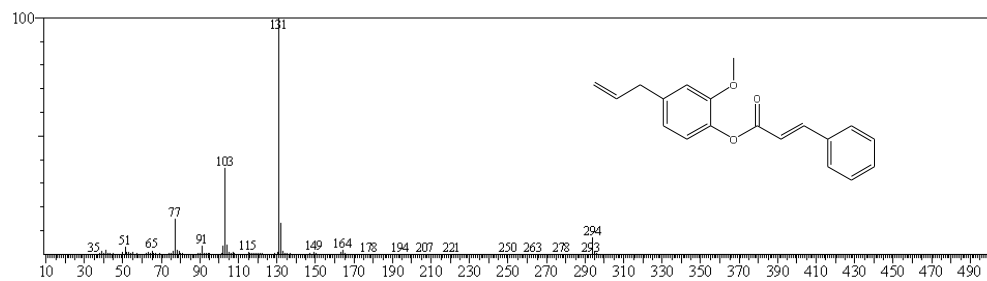


Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.2.10 Caracterização do cinamato de 4-alil-2-metóxi-fenila (**10**)

O espectro de massas de **10** (Figura 58) apresentou o pico íon molecular em  $m/z$  294 e o pico base em  $m/z$  131, este último devido ao fragmento  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}=\text{CHCO}^+$ , resultante de fragmentação característica, como nos casos anteriores.

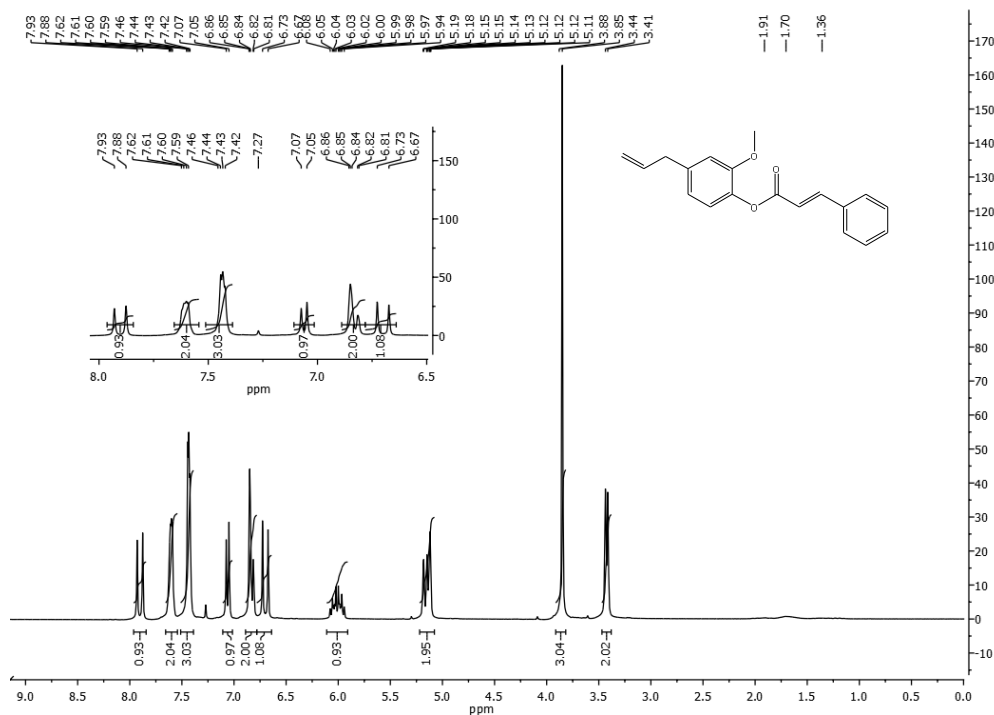
**Figura 58-** Espectro de massas do cinamato de 4-alil-2-metóxi-fenila (**10**)



Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 59) de **10** evidenciou os sinais de todos os átomos de hidrogênio, com destaque para os sinais em 6,72 (d, 1H) e 7,92 ppm (d, 1H) dos hidrogênios olefínicos em acoplamento *trans* (15,0 Hz).

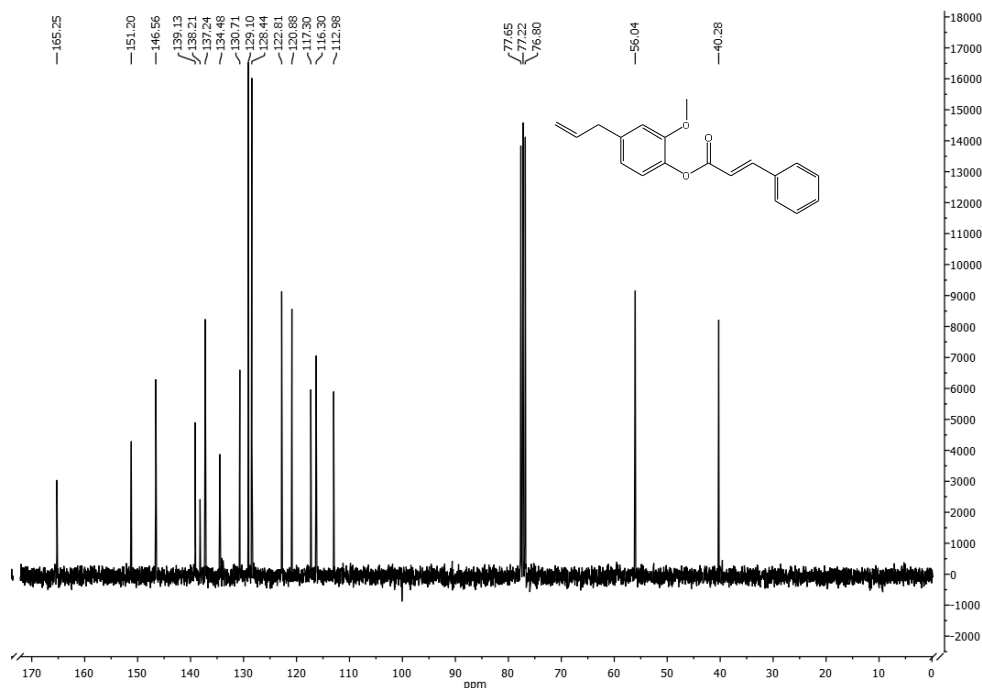
**Figura 59-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do cinamato de 4-*alil*-2-metóxifenila (**10**)



Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 60) de **10** exibiu os dezessete sinais previstos, quatorze deles devidos a carbonos  $\text{sp}^2$ , exceto o carbono carbonílico, com deslocamento químico em 165,0 ppm.

**Figura 60-** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do cinamato de 4-alil-2-metóxifenila (**10**)

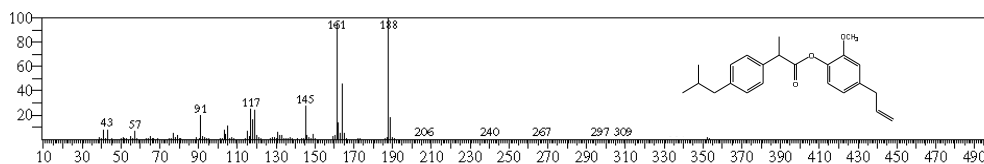


Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.2.11 Caracterização de 2-(4-isopropilfenil)propanoato de 4-alil-2-metóxifenila (**11**)

A caracterização do composto **11** através de espectrometria de massa apresentou o perfil de fragmentação demonstrado na figura 61, com pico íon molecular em  $m/z$  352 e pico base em  $m/z$  188, condizente com a saída do grupo eugenila da molécula **11** (M-164).

**Figura 61-** Espectro de massas de 2-(4-isopropilfenil)propanoato de 4-alil-2-metóxifenila (**11**)



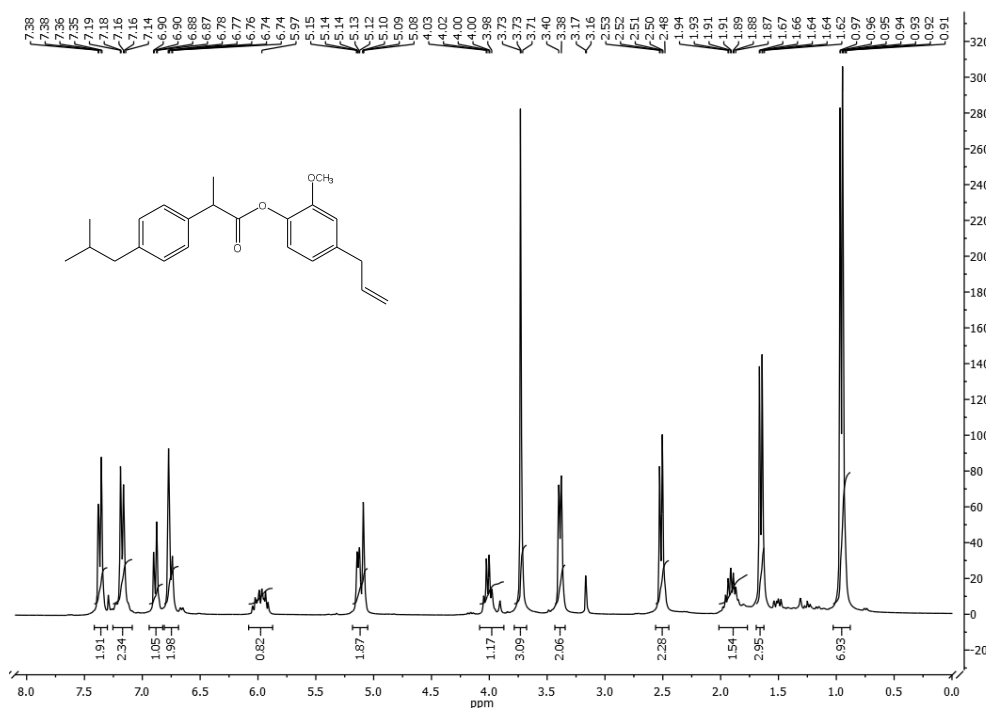
Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 62) de **11** apresentou sinais plenamente condizentes, permitindo identificar todos os átomos de hidrogênio. Por exemplo, com relação aos hidrogênios aromáticos, os dois dubletos ( $J = 7,9$  Hz) em 7,37 (2H) e 7,18 (2H) do anel *para* substituído e, um dubleto ( $J = 8,9$  Hz) em 6,88 ppm (1H) juntamente com um multipletto



centrado em 6,75 (2H), para os hidrogênios da parte eugenila. Em relação aos hidrogênios alifáticos, o quarteto ( $J = 7,0$  Hz) em 4,00 ppm (1H) do hidrogênio metínico benzílico e alfa a carbonila e o duplete ( $J = 7,0$  Hz) em 2,51 ppm (2H) dos hidrogênios metilênicos do grupo isobutila.

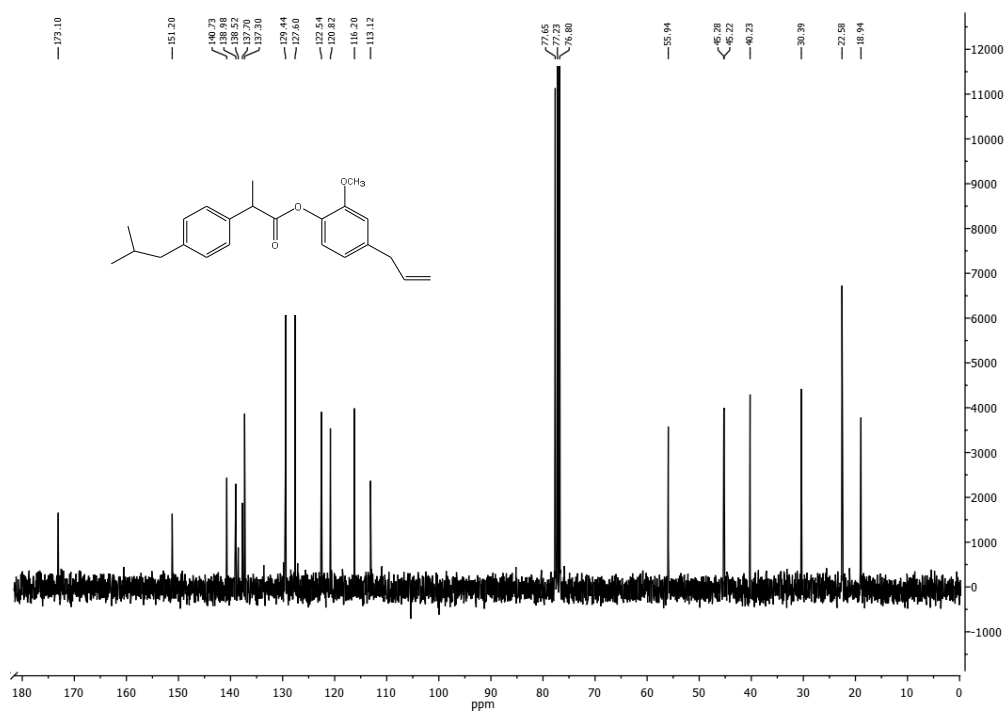
**Figura 62-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do 2-(4-isopropilfenil) propanoato de 4-alil-2-metóxiifenila (**11**).



Fonte: Elaborado pelo autor

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (figura 63) de **11** foram registrados todos os 15 sinais esperados para a molécula, entre ele, seis de carbonos  $\text{sp}^3$ , sendo dois em torno de 43,00 ppm. O sinal do carbono carbonílico do éster não conjugado em 173 ppm.

**Figura 63-** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do 2-(4-isopropilfenil) propanoato de 4-alil-2-metóxiifenila (**11**).

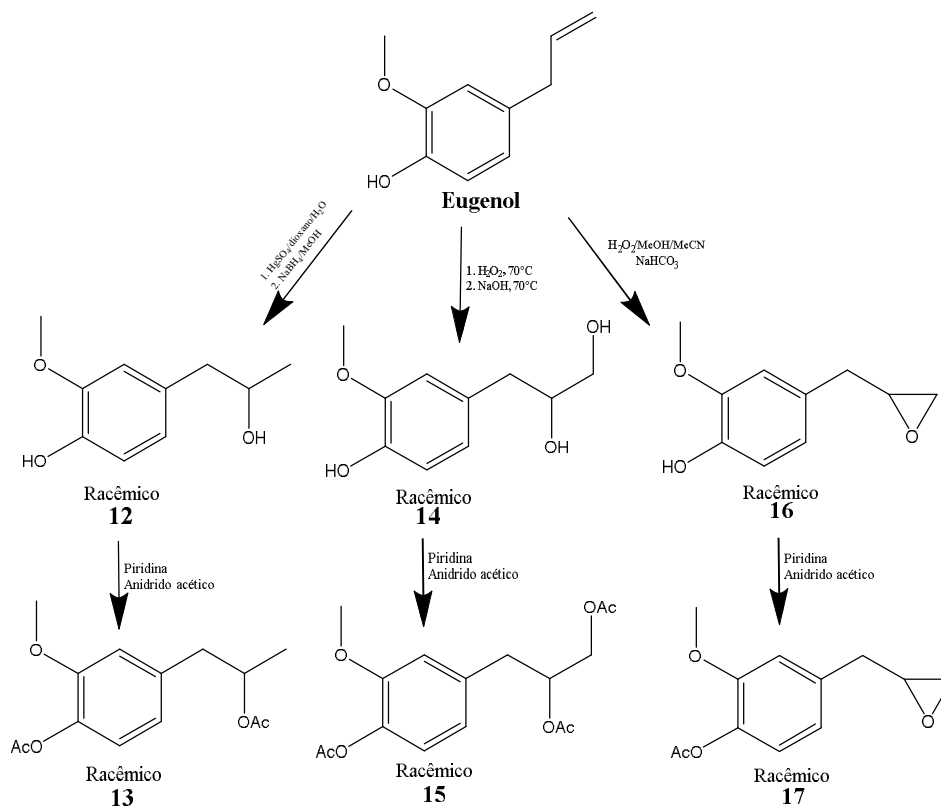


Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.3. SÍNTESE DE DERIVADOS DO EUGENOL ATRAVÉS DE REAÇÕES DE ADIÇÃO

Outra abordagem de síntese realizada neste trabalho foi a obtenção de derivados do eugenol através de reações de adição na ligação dupla do grupo alila. Foram produzidos álcoois, epóxidos, dióis geminais e cetais, conforme esquematizado abaixo (Figura 64).

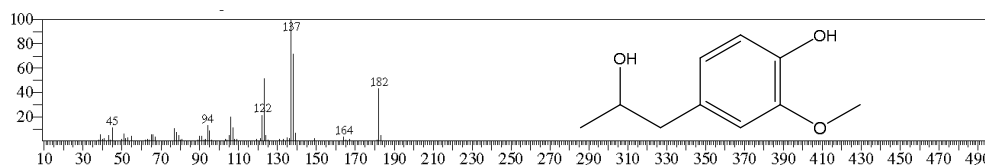
**Figura 64-** Esquema reacional da síntese de derivados do eugenol por meio de reação de adição a dupla ligação seguido de acetilação.



Fonte: Elaborado pelo autor

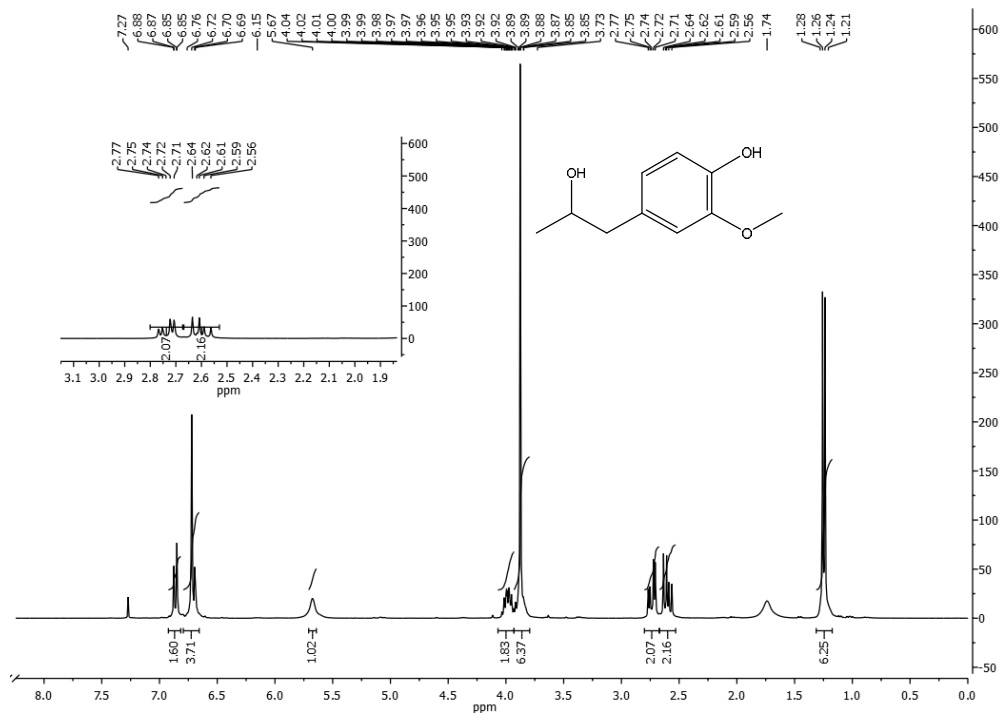
##### 4.3.1 Caracterização 4-(2-hidroxiopropil)-2-metóxi-fenol (12)

O espectro de massa (Figura 65) do produto **12** permitiu sua caracterização tendo em vista, sobretudo, o registro do pico em  $m/z$  182 devido ao íon molecular e outros dois picos principais,  $m/z$  138 ( $M - \text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{OH}$ ) via fragmentação tipo Mc Lafferty e  $m/z$  137 ( $M - \text{H}_3\text{C}-\text{C}'\text{H}-\text{OH}$ ) através de ruptura da ligação benzílica e  $\alpha,\beta$  relativa ao grupo hidroxila, ambos originados a partir do íon molecular.

**Figura 65-** Espectro de massa de 4-(2-hidróxiopropil)-2-metóxiifenol (**12**)

Fonte: Elaborado pelo autor

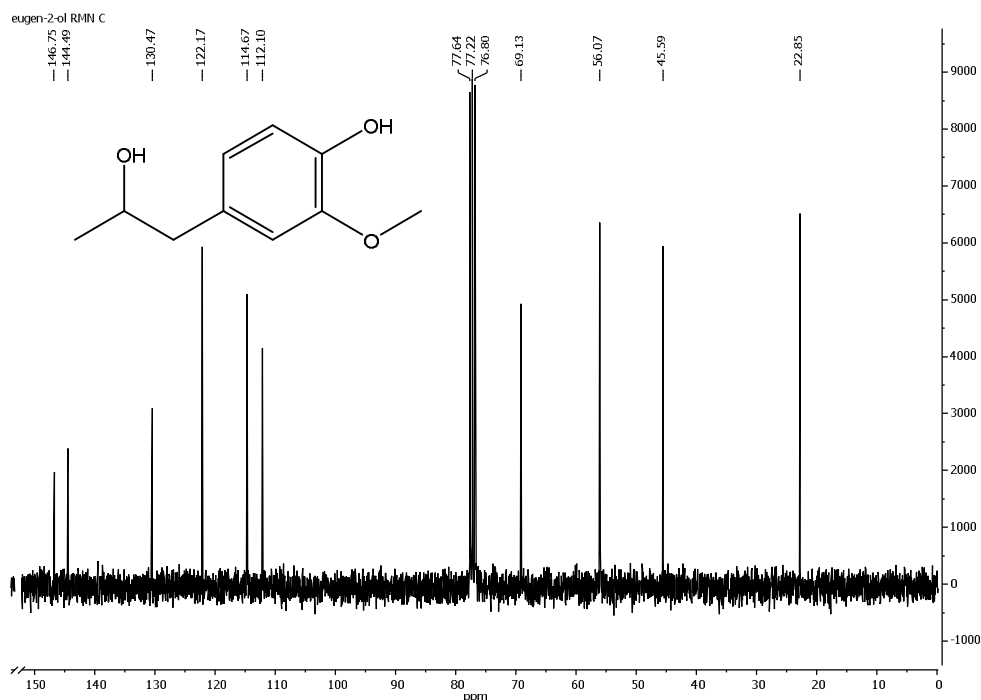
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 66) de **12** exibiu sinais inequívocos para todos os hidrogênios, em particular, da parte modificada quimicamente. Assim, foram observados os sinais dubleto do grupo metila em 1,25 ppm (3H), dois dubletos de dubletos centrados em 2,61 (1H,  $J = 13,6$  e  $5,2$  Hz) e 2,74 (1H,  $J = 13,6$  e  $4,2$  Hz) originados pelos hidrogênios metilênicos diastereotópicos e um multiplete em 3,98 ppm (1H) dado pelo hidrogênio carbinólico.

**Figura 66-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) de 4-(2-hidróxiopropil)-2-metóxiifenol (**12**).

Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 67) mostrou os dez sinais da estrutura de **12**, com destaque para o sinal com deslocamento químico em 69,0 ppm referente ao carbono  $\text{sp}^3$  oxigenado.

**Figura 67-** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) de 4-(2-hidroxiopropil)-2-metóxi-fenol (**12**).

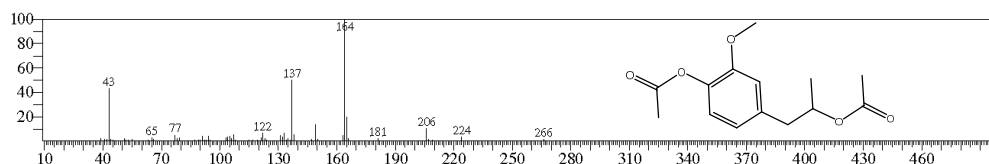


Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.3.2. Caracterização do acetato de 1-(4-acetoxi-3-metóxi-fenil)propano-2-il (**13**)

O espectro de massa (Figura 68) de **13** mostrou pico do íon molecular em  $m/z$  266 conciliável com um di-acetato (acetilação dos grupos hidroxila alcoólico e fenólico). O pico base  $m/z$  em 164 ( $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$ ), perda de fragmentos neutros oriundos dos grupos acetoxila, possivelmente, através de rearranjos [ $\text{M} - 60$  ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ ) - 42 ( $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$ )].

**Figura 68-** Espectro de massa do acetato de 4-(2-acetóxiopropil)-2-metóxi-fenila (**13**).

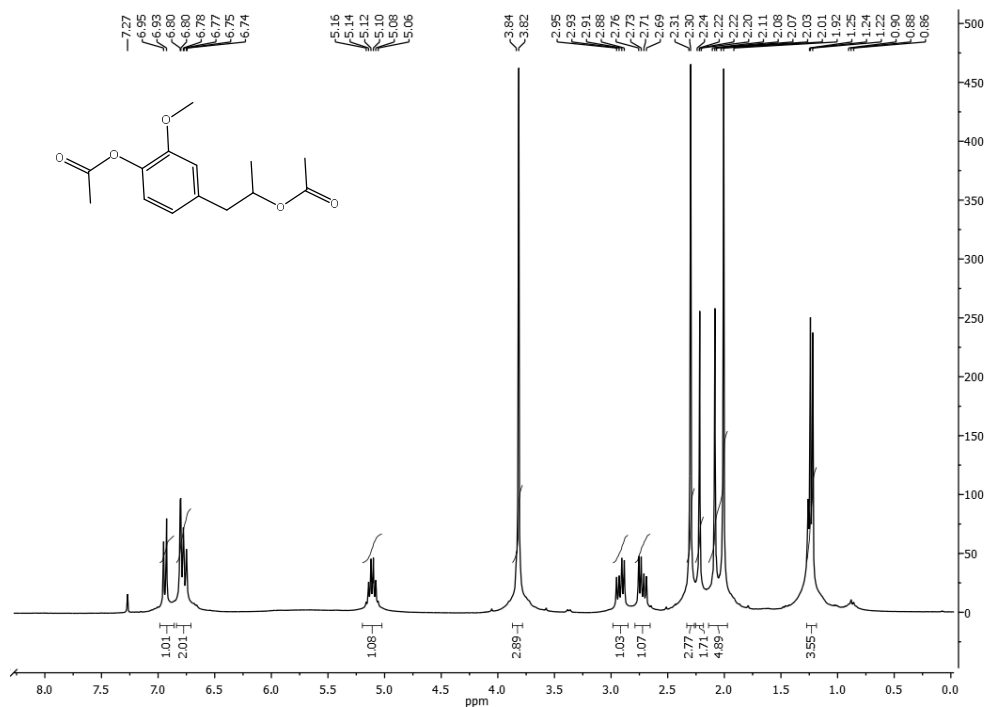


Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 69) de **13** exibiu sinais inequívocos para todos os hidrogênios, em particular, das partes modificadas quimicamente. Assim, foram observados os sinais dubleto ( $J = 6,3$  Hz) do grupo metila em 1,23 ppm (3H), dois dubletos de dubletos centrados em 2,72 (1H,  $J = 13,7$  e 4,7 Hz) e 2,93 (1H,  $J = 13,7$  e 6,5 Hz) devidos aos hidrogênios metilênicos diastereotópicos e um multipletto em 5,10 ppm (1H) dado pelo hidrogênio metínico

ligado ao grupo acetoxila; dois singletos em 2,00 (3H) e 2,29 (3H) originados pelos hidrogênios metílicos dos grupos acetoxila.

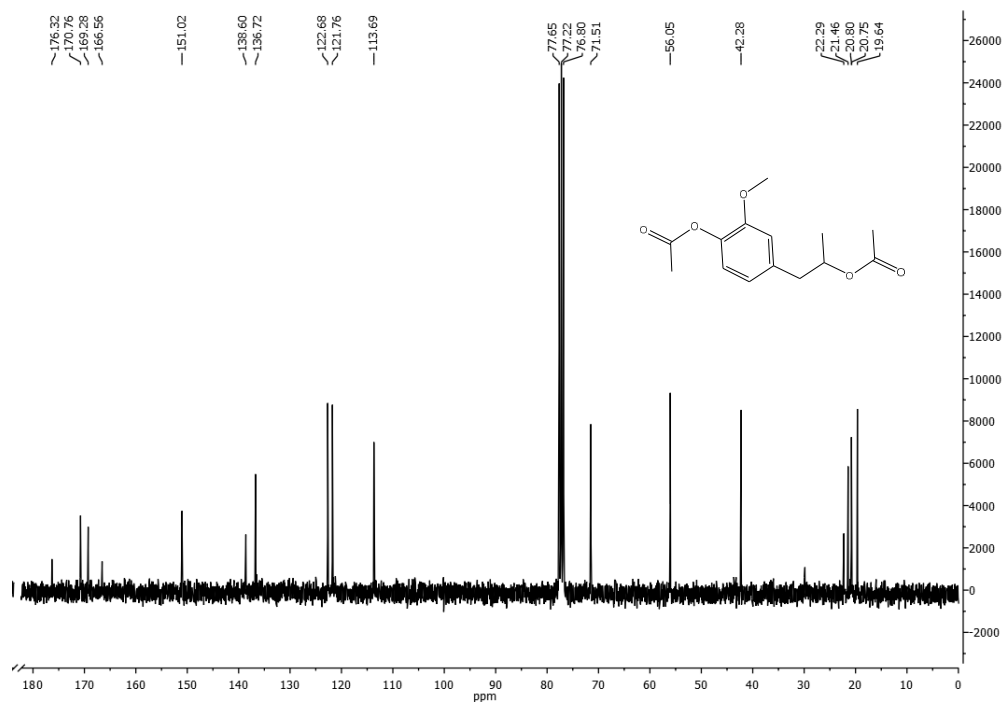
**Figura 69-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do acetato de 4-(2-acetoxipropil)-2-metóxi-fenol (**13**).



Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 70) mostrou todos os sinais referentes ao derivado **13** (além de pequenos sinais devidos ao ácido acético e ao anidrido acético) com destaque para os sinais do carbono  $\text{sp}^3$  oxigenado em 71,5 ppm e dos carbonos carbonílicos dos grupos acetoxila em 169,3 e 170,7 ppm.

**Figura 70-** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do acetato de 4-(2-acetoxipropil)-2-metóxfenol (**13**).

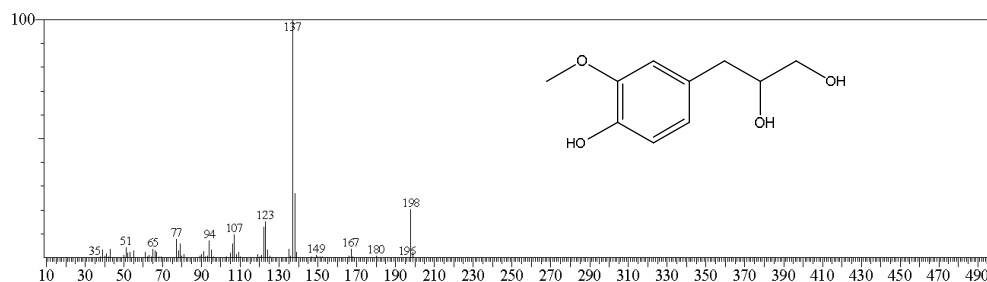


Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.3.3. Caracterização do 3-(4-hidróxi-3-metóxfenil)propano-1,2-diol (**14**)

No espectro de massa (Figura 71) de **14** foram registrados como principais, o pico do íon molecular ( $[\text{M}^+ 198]$ ) e o pico base em  $m/z$  137 ( $[\text{M} - \text{HOCHCH}_2\text{OH}]^+$ ) resultante de ruptura da ligação que é, simultaneamente, benzílica e alfa-beta relativamente a um dos grupos hidroxila, gerando um cátion benzila.

**Figura 71-** Espectro de massa do 3-(4-hidróxi-3-metóxfenil)propano-1,2-diol (**14**)

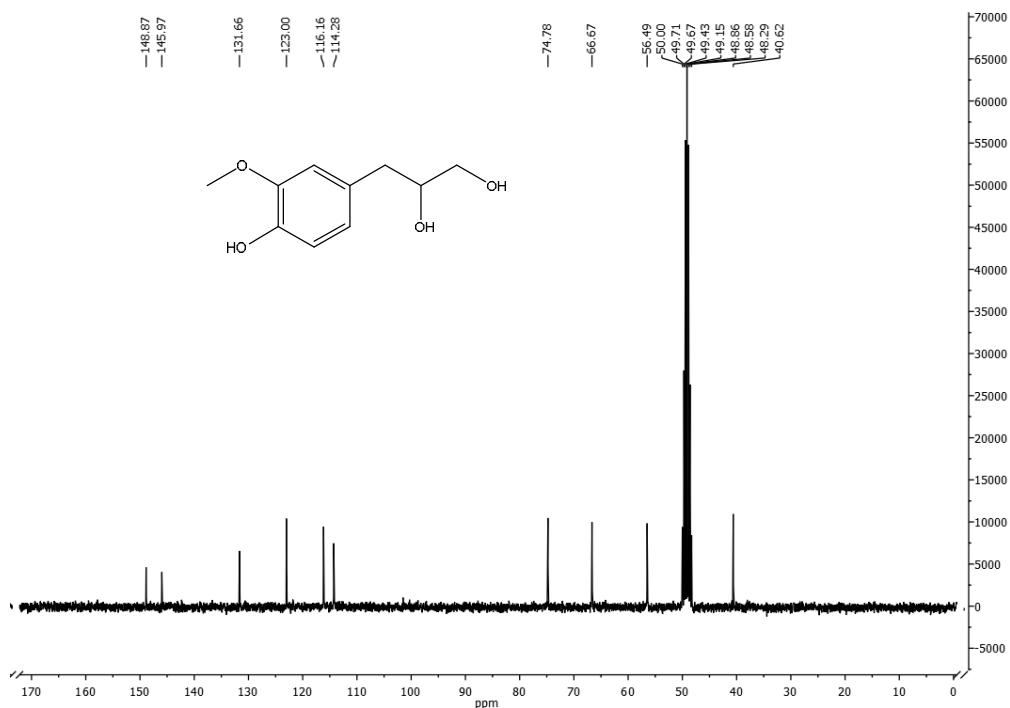


Fonte: Elaborado pelo autor





**Figura 73**-Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do 3-(4-hidróxi-3-metóxi)fenil)propano-1,2-diol (**14**)

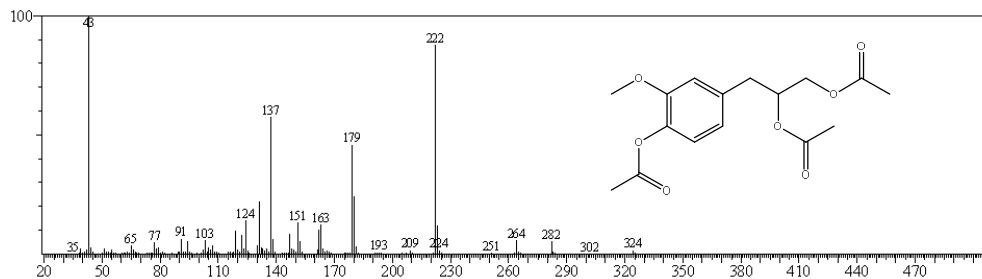


Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.3.4. Caracterização do diacetato de 3-(4-acetóxi-3-metóxi)fenil)propano-1,2-di-ila (**15**).

O espectro de massa (Figura 74) do composto **15** exibiu o pico do íon molecular em  $m/z$  324, compatível com sua massa molecular e, o pico base em  $m/z$  222 ( $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$ ), resultante de fragmentação com perdas de moléculas neutras ( $M - 60 - 42$ ,  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$  e  $\text{H}_2\text{C}=\text{CO}$ , respectivamente).

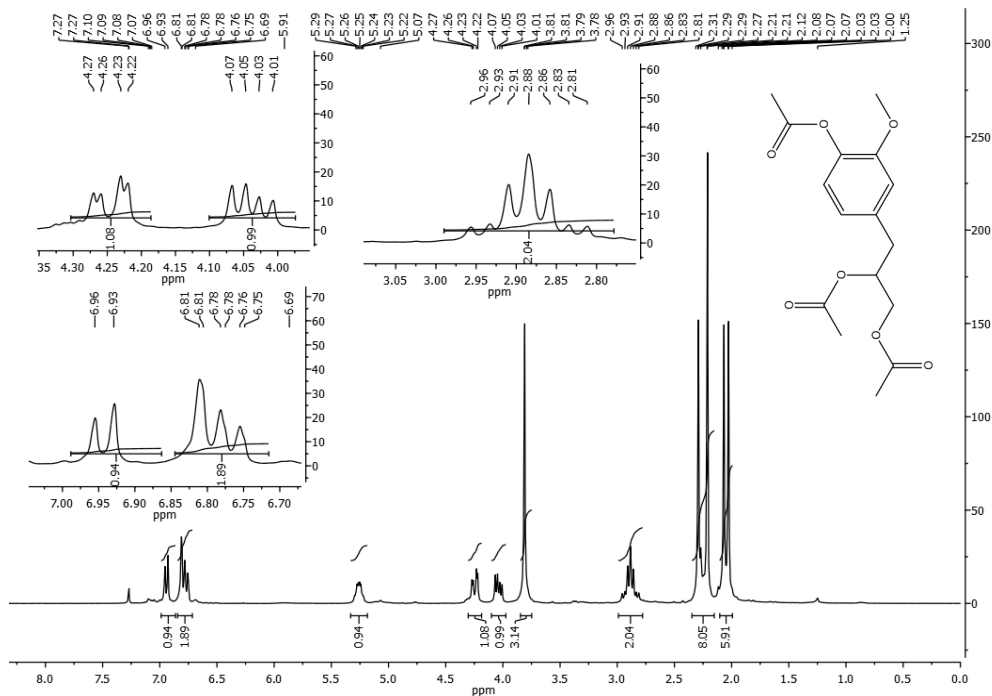
**Figura 74**- Espectro de massas do diacetato de 3-(4-acetóxi-3-metóxi)fenil)propano-1,2-di-ila (**15**).



Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 75) de **15** exibiu sinais inequívocos para todos os hidrogênios. Assim, a análise do espectro no tocante a parte alifática, mostrou: dois dubletos de dubletos parcialmente superpostos com absorções na faixa de 2,80 a 2,95 ppm atribuídos aos hidrogênios benzílicos diasterotópicos; dois dubletos de dubletos, um em 4,03 (1H,  $J = 12,0$  e 6,0 Hz) e outro em 4,24 (1H,  $J = 12,0$  e 3,2 Hz) devidos aos hidrogênios diasterotópicos do carbono ligado a um dos grupos acetoxila; multipletto em 5,25 ppm dado pelo hidrogênio metínico no carbono ligado a um grupo acetoxila; singletos em 2,03, 2,00 e 2,11 ppm devidos aos hidrogênios metílicos dos três grupos acetoxila.

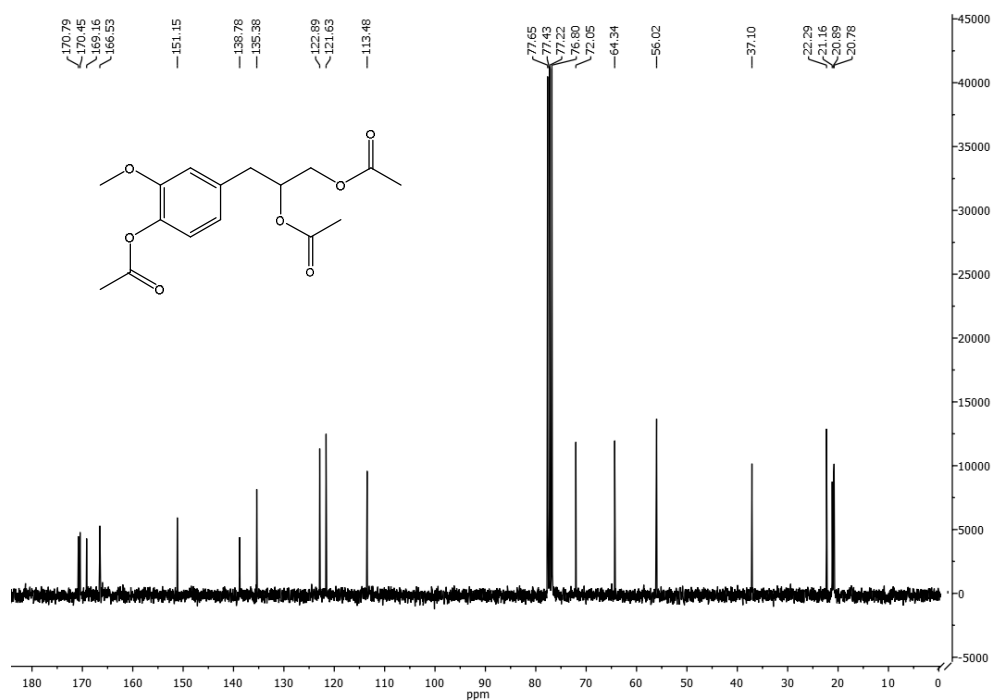
**Figura 75-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do diacetato de 3-(4-acetóxi-3-metóxi-fenil)propano-1,2-di-ila (**15**).



Fonte: Elaborado pelo autor

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 76) de **15** foram registrados os dezesseis sinais esperados, ressaltando aqueles referentes aos carbonos carbonílicos em 169,3, 170,4 e 170,8ppm.

**Figura 76-** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do diacetato de 3-(4-acetóxi-3-metóxi-fenil)propano-1,2-di-ila (**15**).

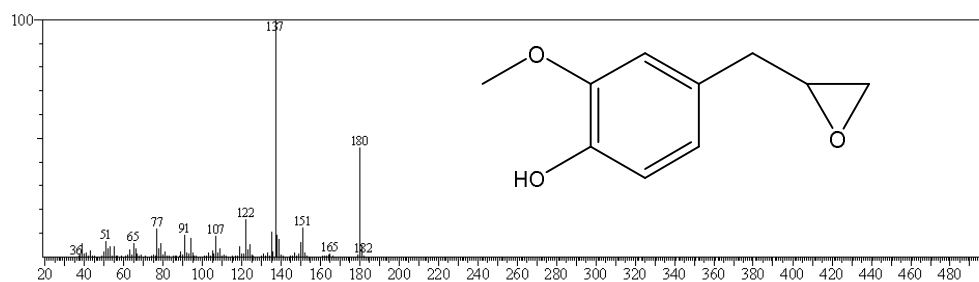


Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.3.5. Caracterização do 2-metóxi-4-(oxiran-2-ilmetil)fenol (**16**).

O espectro de massa (Figura 7) de **16** registrou o pico do íon molecular em  $m/z$  180, conforme esperado e o pico do íon base em  $m/z$  137  $[\text{M} - 43 (\text{C}_2\text{H}_3\text{O})]^\cdot$  resultante de fragmentação benzílica.

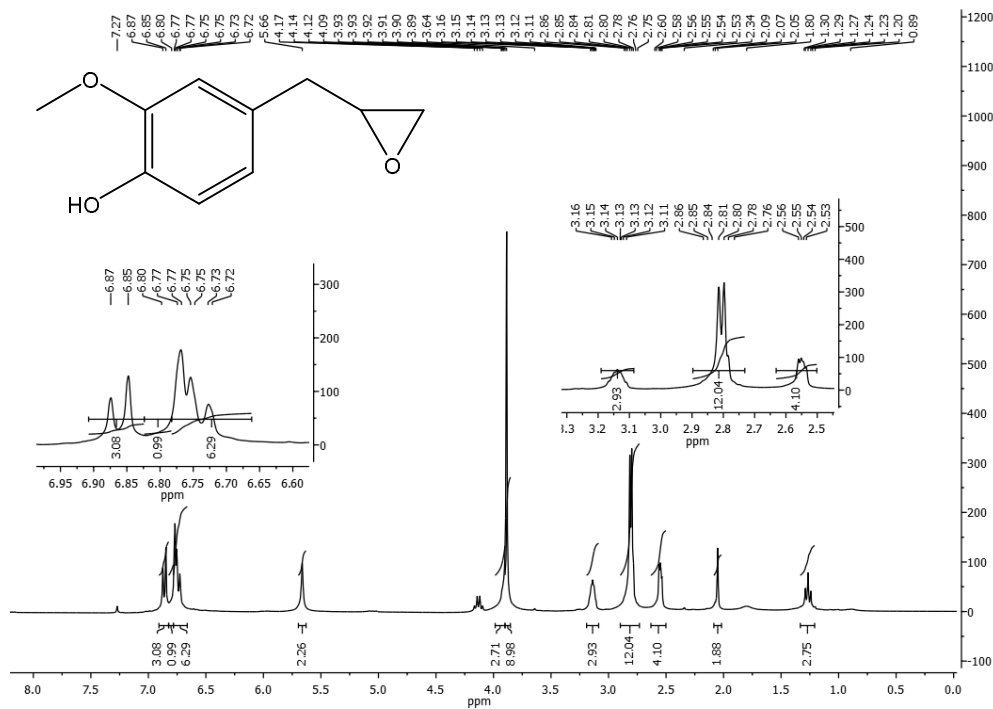
**Figura 77-** Espectro de massas do 2-metóxi-4(oxiran-2-ilmetil)fenol (**16**).



Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 78) como destaque o sinal dubleto de dubleto dos átomos de hidrogênios metilênicos diastereotópicos do grupo oxirano (epóxido) apresentando deslocamento centrado em 2,62 e 2,74ppm.

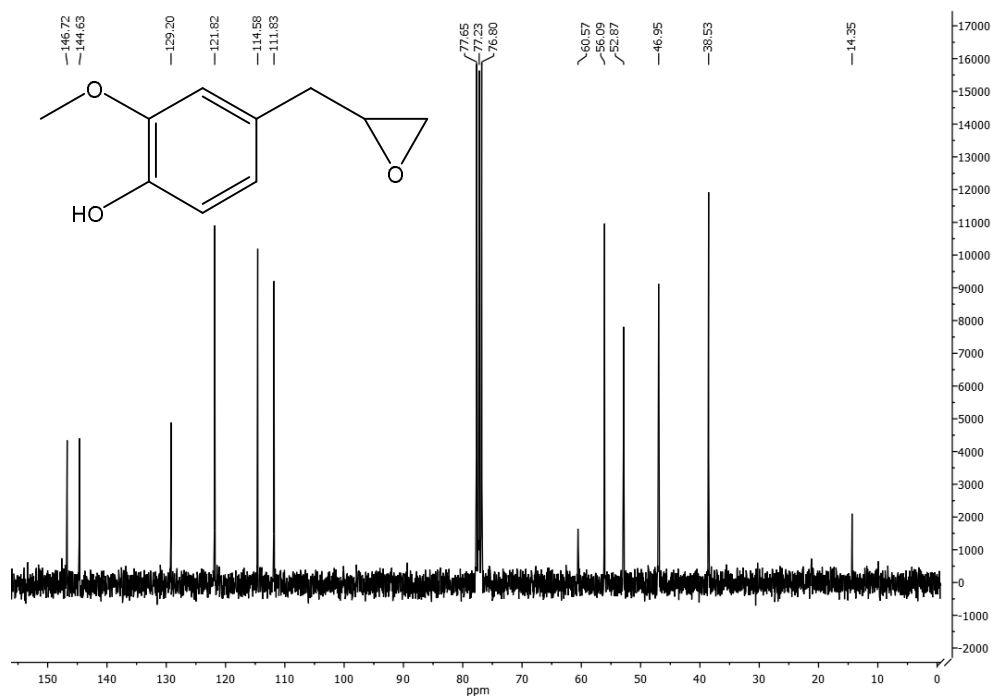
**Figura 78-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) de 2-metóxi-4-(oxiran-2-ilmetil)fenol (**16**)



Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 79) apresentou os 10 sinais esperados para o derivado **16** onde os carbonos do grupo oxirano apresentaram deslocamentos químicos em 46,9 ( $\text{CH}_2$ ) e 52,8 ppm ( $\text{CH}$ ).

**Figura 79-** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do 2-metóxi-4-(oxiran-2-ilmetil)fenol (**16**)

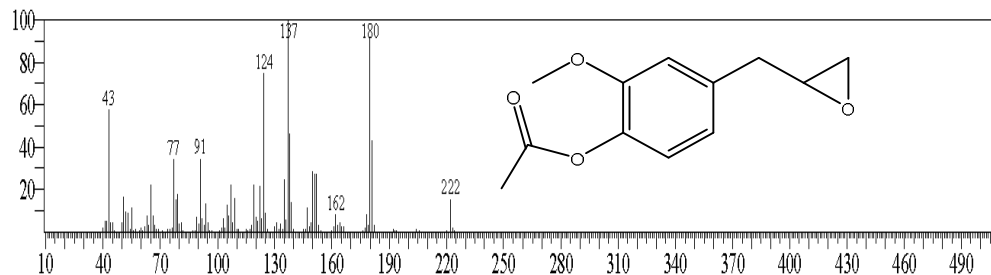


Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.3.6. Caracterização do acetato de 2-metóxi-4-(oxiran-2-ilmetil) fenila (**17**)

O espectro de massa (Figura 80) de **17** registrou o pico do íon molecular em  $m/z$  222, conforme esperado; um intenso pico em  $m/z$  180 [ $\text{M} - 42$  ( $\text{H}_2\text{C}=\text{C}=\text{O}$ )] e o pico do íon base em  $m/z$  137 [ $\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_2\text{CH}_2^+$ :  $\text{M} - 42$  ( $\text{H}_2\text{C}=\text{C}=\text{O}$ ) - 43 ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}$ )].

**Figura 80-** Espectro de massas do acetato de 2-metóxi-4-(oxiran-2-ilmetil) fenila (**17**)

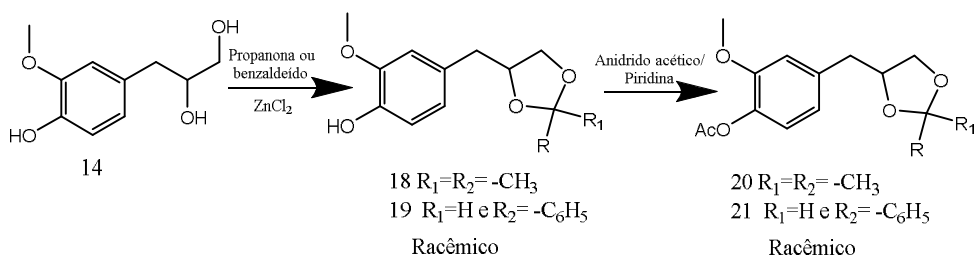


Fonte: Elaborado pelo autor

### 4.3.7. Síntese de derivados do eugenol a partir da reação de formação de cetais com aldeídos e cetonas.

Em experimentos separados, o composto **14** foi submetido a reação com benzaldeído e com propanona na presença do cloreto de zinco ( $\text{ZnCl}_2$ ) como catalisador formando, respectivamente, o cetal **18** e o acetal **19**. A seguir, estes produtos foram acetilados (anidrido acético / piridina), resultando nos respectivos acetatos em suas formas racêmicas (Figura 81).

**Figura 81-** Reação de síntese de cetais a partir de derivado do eugenol (**14**) produzindo os derivados **18**, **19**, **20** e **21**.

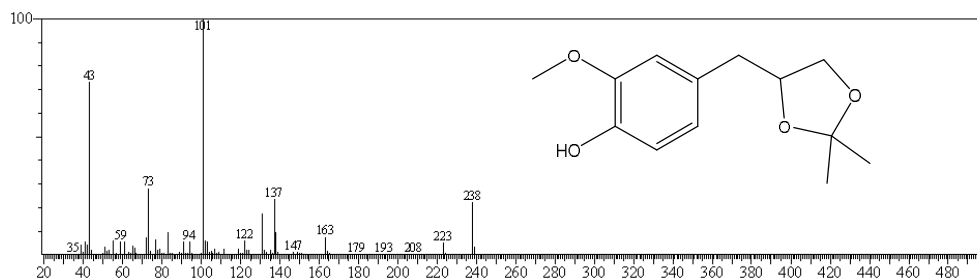


Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.3.7.1 Caracterização do 4-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-metóxi-fenol (**18**)

O espectro de massas (Figura 82) de **18** registrou, entre outros, o pico do íon molecular em  $m/z$  238, assim como, o pico do íon base ( $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_2^+$ ) em  $m/z$  101.

**Figura 82-** Espectro de massa de 4-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-metóxi-fenol (**18**).

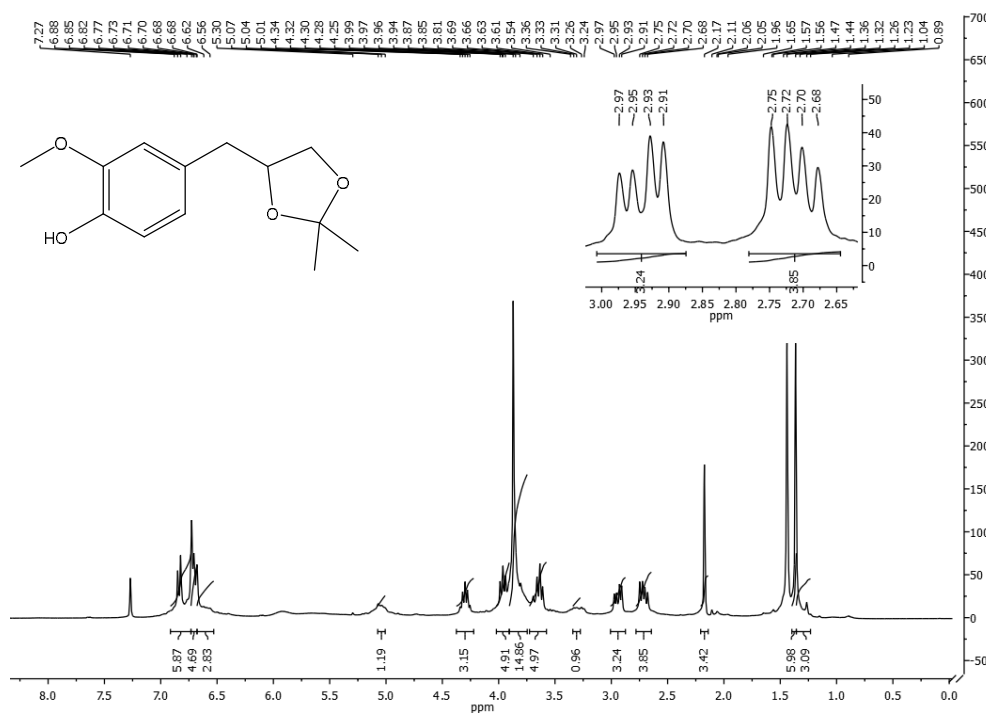


Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 83) de **18** exibiu sinais inequívocos para todos os hidrogênios. Assim, a análise do espectro no tocante a parte alifática, mostrou: dois singletos em 1,36 (3H) e 1,44 (3H) dos hidrogênios dos grupos metila do sistema cetal; dubletos de

dubletos em torno de 2,70 ppm (1H, J = 13,7 e 7,0 Hz) e de 2,94 ppm (1H, J = 13,7 e 5,9 Hz) devidos aos hidrogênios benzílicos diastereotópicos; dois tripletos largos, um em torno de 3,64 ppm (1H) e outro em torno de 3,96 ppm (1H) devidos aos hidrogênios diastereotópicos do grupo oximetileno do sistema cetá; e multipletos em 4,27 ppm (1H) dado pelo hidrogênio metínico do sistema cetá.

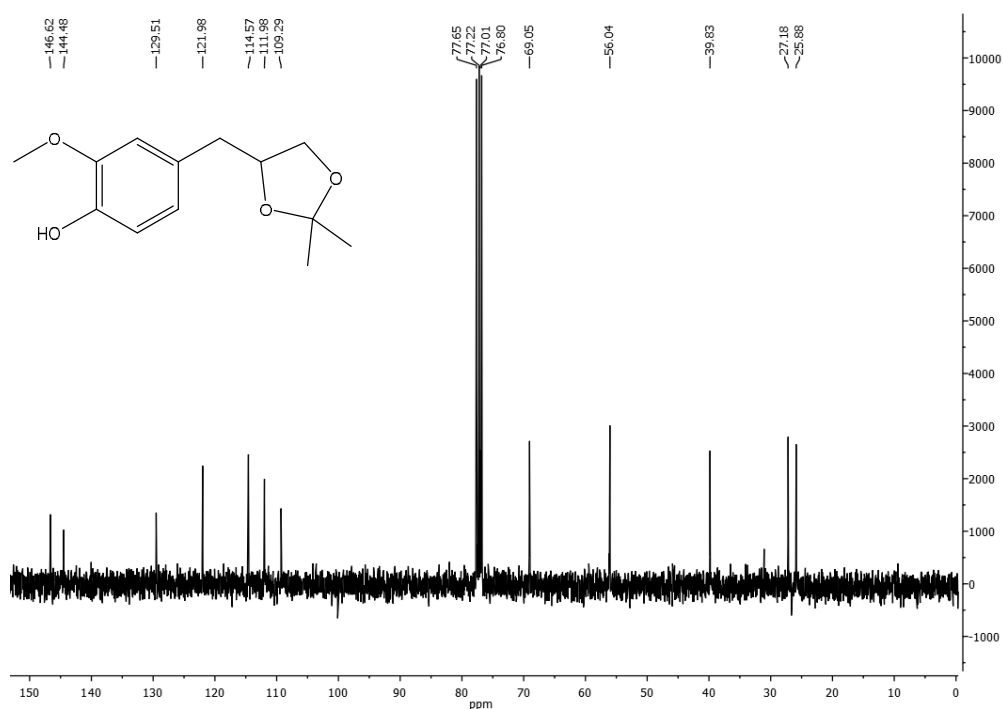
**Figura 83-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do 4-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-metóxfenol (**18**).



Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 84) de **18** apresentou os 13 sinais esperados, com destaques para os dois sinais dos carbonos metílicos em 25,8 e 27,2 ppm, para os carbonos  $\text{sp}^3$  oxigenados (CH em 76,8 e  $\text{CH}_2$  em 69,0 ppm) e para o sinal em 109,3ppm (- O - C - O), todos do sistema cetá.

**Figura 84-** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do 4-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-metóxfenol (**18**).

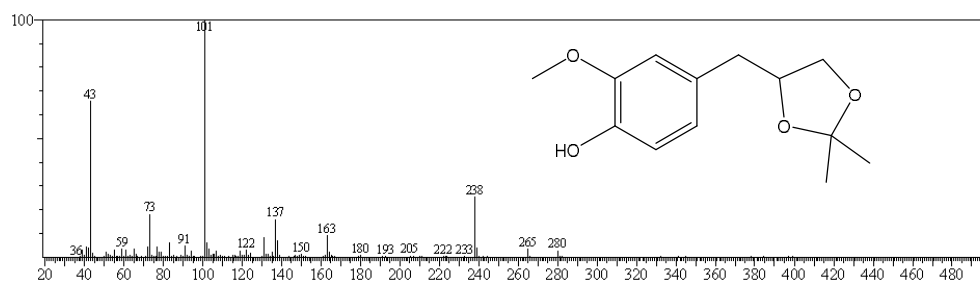


Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.3.7.2 Caracterização do acetato de 4-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-metóxfenila (**19**)

O espectro de massas (Figura 85) de **19**, mostrou o pico do íon molecular em  $m/z$  280, assim como, o pico do íon base ( $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_2^+$ ) em  $m/z$  101, além de intenso pico em  $m/z$  43, todos compatíveis com o produto de acetilação de **18**.

**Figura 85-** Espectro de massas do acetato de 4-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-metóxfenila (**19**)



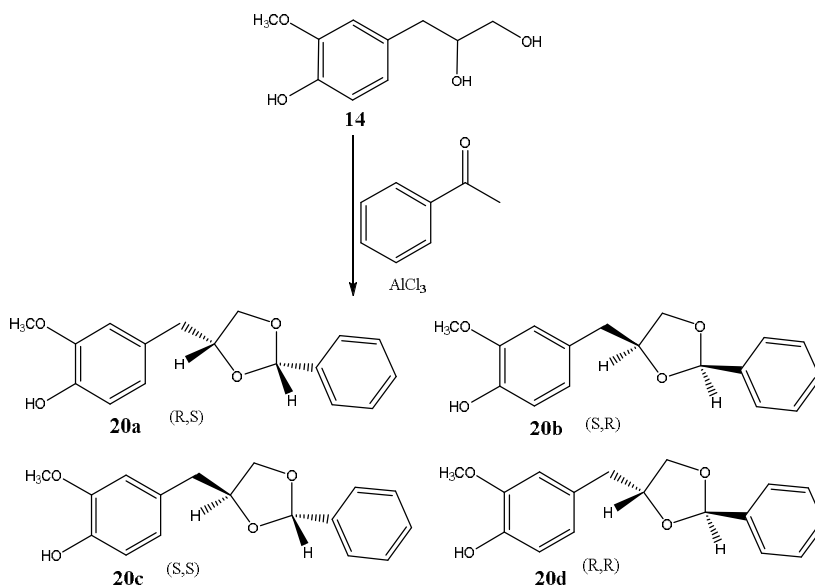
Fonte: Elaborado pelo autor



#### 4.3.7.3 Caracterização do 4-((2-metil-2-fenil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-metóxfenol (20).

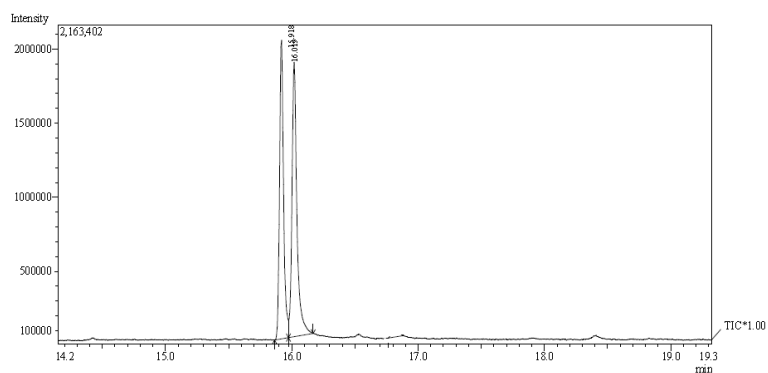
A obtenção de acetal a partir **14** na reação com o benzaldeído conduziu a síntese de compostos diastereoisômicos (Figura 86). O cromatograma (Figura 87) do produto (**20**) de reação exibe dois picos, cada um representando um par de enantiômero (**20a/20b** e **20c/20d**).

**Figura 86-** Reação de formação de cetais a partir do derivado **14** e do benzaldeído produzindo **20**.



Fonte: Elaborado pelo autor

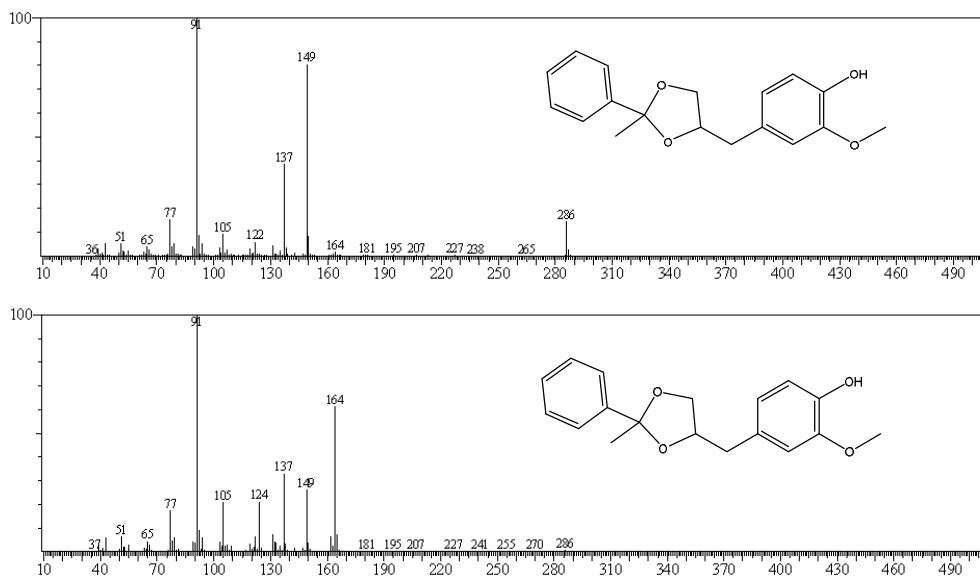
**Figura 87-** cromatograma dos cetais produzidos a partir do derivado **14** e do benzaldeído



Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de massa (Figura 88) de **20** além do pico relativo ao íon molecular esperado ( $[M^+ 286]$ ) exibiu outros picos importantes indicativos de fragmentos concordantes com a estrutura geral do acetal, tais como,  $m/z$  149 ( $[C_9H_9O_2]^+$ ), 137 ( $[C_8H_9O_2]^+$ ) e 91 ( $[C_7H_7]^+$ ).

**Figura 88-** Espectro de massas do 4-((2-metil-2-fenil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-metóxi-fenol (**20**).



Fonte: Elaborado pelo autor

## **CAPÍTULO 2**

### **ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DO EUGENOL E DERIVADOS**

## **5. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES DO EUGENOL E DERIVADOS**

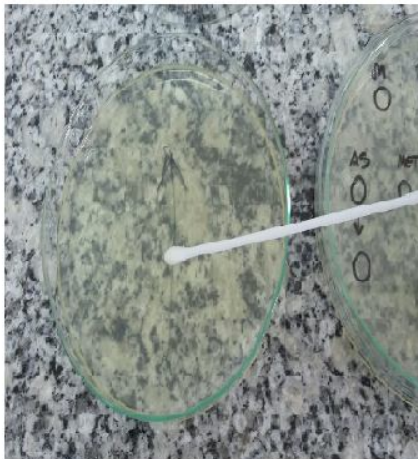
Depois de realizado a síntese e caracterização dos derivados do eugenol, foram realizados os ensaios para verificar o potencial antibacteriano e antioxidante, fazendo uma análise comparativa com a molécula precursora do eugenol. As análises foram efetuadas no laboratório de microbiologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande, campus Apodi (IFRN/AP).

### **5.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS DERIVADOS DO EUGENOL PRODUZIDOS (1-21)**

Após a síntese dos derivados os mesmos foram avaliados quanto a sua capacidade de inibir o crescimento bacteriano frente a bactérias gram (+) e gram (-) pelo método do disco difusão que verifica a região de inibição de crescimento bacteriano em torno da substância aplicada em papel filtro de 6 mm de diâmetro (Figura 89).

**Figura 89-** Etapas envolvidas na avaliação do halo de inibição apresentado pelos derivados sintetizados a partir do eugenol.

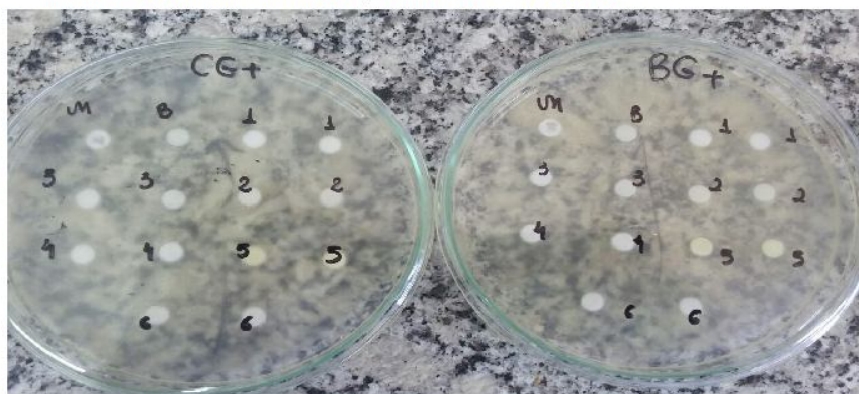
**A. Aplicação da Cultura bacteriana**



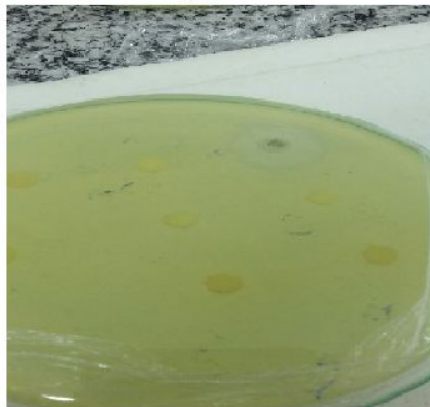
**B. Inserção dos discos com substâncias analisadas**



**C. Placas com meio de cultura, bactéria e substâncias**



**D. Halo de inibição formado**



**E. Medição do halo inibitório gerado**



Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados apresentados na tabela 5 apresentam o halo de inibição para cada substância testada frente a cada bactéria.

**Tabela 5-** Halos de inibição (mm) apresentados pelo eugenol e derivados frente a diferentes bactérias.

Substância	Halo de inibição (mm)					
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<b>1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>3</b>	0	0	0	0	0	0
<b>4</b>	0	0	0	0	0	12
<b>5</b>	0	0	0	6	0	12
<b>6</b>	0	0	0	0	0	0
<b>7</b>	0	0	0	0	0	0
<b>8</b>	0	12	6	0	0	0
<b>9</b>	0	0	0	11	0	0
<b>10</b>	0	0	0	12	6	0
<b>11</b>	0	0	0	0	0	0
<b>12</b>	0	0	0	10	0	0
<b>13</b>	0	0	0	12	0	8
<b>14</b>	0	0	0	9	0	0
<b>15</b>	0	12	0	10	6	0
<b>16</b>	0	0	10	10	15	20
<b>17</b>	6	0	0	10	6	12
<b>18</b>	0	0	0	9	0	0
Metileugenol	0	0	0	0	0	0
Eugenol	12	0	0	6	11	12
Isoeugenol	0	0	12	0	0	0
Tetraciclina	0	10	20	10	9	10

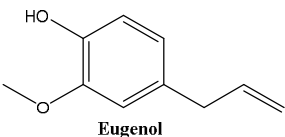
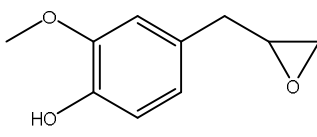
Fonte: dados da pesquisa

O halo de inibição demonstra o quanto determinada substância tem potencial de inibir o crescimento microbiano, sendo que de forma geral a literatura considera como substância com potencial antibacteriano moderado aquelas que exibem halos de inibição maior que 7mm e menor que **16**. Já as substâncias que exibem halos superiores a 16mm são consideradas potenciais antibacterianos e as que apresentam halo menor que 7mm consideradas inativas (HAMED, MEHDAWI, *et al.*, 2013) (STILTS, BEZOTTE e FONTAINE, 2015).

Considerando essa classificação pode-se inferir que o derivado 16 possui efeito antibiótico forte frente as bactérias *Klebsiella pneumoniae* e *Bacillus cereus*. Já frente as bactérias *Streptococcus* e *Staphylococcus aureus* essa substância possui efeito antibiótico moderado, sendo inativa para as bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomona aeruginosa*.

Outra observação marcante que pode ser destacada é referente ao fato que o derivado **16** apresentou halos de inibição superiores ao do eugenol, substância precursora, resultando em maior sensibilidade para essas bactérias. Contudo, essa modificação estrutural com a inserção do epóxido na molécula do eugenol tornou o derivado resultante inativo frente a bactéria *Escherichia coli*, sendo que o eugenol possui efeito antibacteriano moderado para esse microrganismo. Ou seja, a transformação química do eugenol no respectivo derivado **16** resultou em um composto com ação antibacteriana maior, porém com um espectro de ação menor tendo em vista que o eugenol apresentou efeito inibitório para quatro cepas bacterianas e a substância **16** para três, conforme resumido na Tabela 6.

**Tabela 6-** Comparação da ação antibacteriana entre o eugenol e o derivado **16**.

	Substâncias	
Característica apresentada	 Eugenol	 <b>20</b>
Sensibilidade bacteriana	Atividade sobre 4 cepas bacterianas	Atividade sobre 3 cepas bacterianas
Halos de inibição (mm)	6 a 12	10 a 20

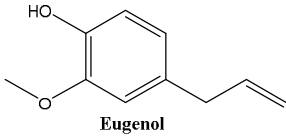
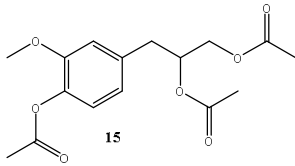
Fonte: dados da pesquisa

Um estudo recente sugeriu a atividade antimicrobiana para a molécula do eugenol frente a cepas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* com halos de inibição de 9,25 e 7,75mm de diâmetro (SANTOS, ANDRADE, *et al.*, 2017). Os resultados experimentais obtidos no presente estudo não evidenciaram atividade para essas cepas, contudo, ressalta-se que os autores citados aplicaram uma quantidade de amostra nos discos mais que 13 vezes superior (3mg) ao praticado no presente estudo (0,2mg), o que pode ter resultado na referida zona de inibição relatada naquele trabalho.

Outro derivado que apresentou efeito antibacteriano moderado foi a substância **15**, ou seja, o diol vicinal obtido a partir da abertura do epóxido seguido de acetilação dos grupos hidroxil presentes na molécula. Esse derivado apresentou halos de inibição de 12mm para *Escherichia coli*, e 10mm para a *Streptococcus*. Quando comparado com a molécula precursora, eugenol, percebe-se que o derivado **15** apresentou ação frente a cepas bacterianas que o eugenol

não apresentou (*Escherichia coli*), resultando por isso em uma substância mais seletiva. Já quanto a bactéria *Streptococcus* o derivado **15** apresentou inibição mais pronunciada do que o eugenol (6mm).

**Tabela 7-** Comparação do efeito antibacteriano entre o eugenol e o derivado **15**.

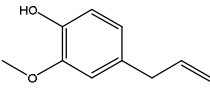
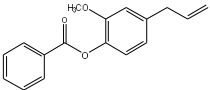
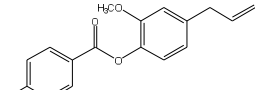
	Substâncias	
Característica apresentada	 Eugenol	 15
Sensibilidade bacteriana	Atividade sobre 4 cepas bacterianas	Atividade sobre 3 (2) cepas bacterianas
Halos de inibição (mm)	6 a 12	6 a 12

Fonte: dados da pesquisa

Apesar de não terem apresentado um espectro de ação muito amplo sobre o crescimento das bactérias estudadas, os derivados **4** e **5** também evidenciaram atividade antibacteriana, tabela 8. O **4** com halo de inibição de 12mm frente a bactéria *Bacillus cereus* e **5** além de apresentar este mesmo halo frente a mesma bactéria demonstrou ação inibitória também frente a cepa bacteriana *Streptococcus*.



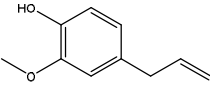
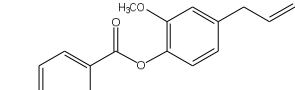
**Tabela 8-** Comparação do efeito antibacteriano entre o eugenol e os derivados **4** e **5**.

Característica apresentada	Substâncias		
	 eugenol	 <b>4</b>	 <b>5</b>
Sensibilidade bacteriana	Atividade sobre 4 cepas bacterianas	Atividade sobre 1(1) cepas bacterianas	Atividade sobre 2(2) cepas bacterianas
Halos de inibição (mm)	6 a 12	12	6 e 12

Fonte: dados da pesquisa

O derivado **8**, obtido através da reação de esterificação do eugenol com o ácido 4-bromobenzóico apresentou atividade antimicrobiana frente as cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* com halos de inibição de 12 e 6mm, respectivamente. Destaca-se que apesar desse derivado possuir um espectro menor de ação, pois só foi ativo para duas cepas enquanto o eugenol foi para quatro, o derivado apresentou ação em cepas na qual o eugenol demonstrou-se inativo, evidenciando que a modificação química resultou em substância com maior especificidade que a molécula original (eugenol). A análise comparativa resumida pode ser visualizada na Tabela 9.

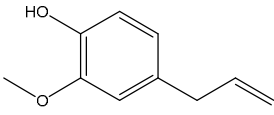
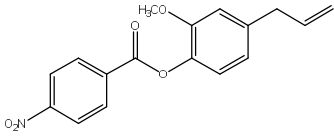
**Tabela 9-** Comparação do efeito antibacteriano entre o eugenol e o derivado **8**.

Característica apresentada	Substâncias	
	 eugenol	 <b>8</b>
Sensibilidade bacteriana	Atividade sobre 4 cepas bacterianas	Atividade sobre 2 cepas bacterianas
Halos de inibição (mm)	6 a 12	6 e 12

Fonte: dados da pesquisa

O derivado **9**, formado através da esterificação do ácido 4-nitrobenzóico com o eugenol apresentou efeito inibitório apenas frente a cepa de *Streptococcus*, contudo a zona de inibição foi maior (11 mm) que para o eugenol (6 mm) para esta bactéria, demonstrando que apesar de possuir espectro de ação menor, para a bactéria em questão, o potencial inibitório foi 92% maior que o eugenol.

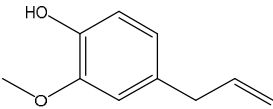
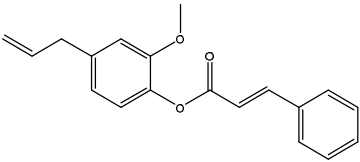
**Tabela 10-** Comparação do efeito antibacteriano entre o eugenol e o derivado **9**.

	Substâncias	
Característica apresentada	 eugenol	 <b>9</b>
Sensibilidade bacteriana	Ação sobre 4 cepas bacterianas	Ação sobre 1(1) cepas bacterianas
Halos de inibição apresentados (mm)	6 a 12	11

Fonte: dados da pesquisa

O éster cinamato de eugenila, derivado **10**, também apresentou atividade antibacteriana, sendo ativo frente as cepas bacterianas de *Streptococcus* e *Klebsiella pneumoniae*, com halos de inibição de 12 e 6mm, respectivamente. Observa-se para a bactéria *Streptococcus* o potencial antibacteriano do derivado foi 100% superior ao do eugenol. Contudo para *Klebsiella pneumoniae* foi inferior. Ou seja, isso evidencia que **10** possui espectro de ação menor que o eugenol, pois, é ativo frente a um menor número de bactérias, contudo, mostra maior especificidade para a *Klebsiella pneumoniae*.

**Tabela 11-** Comparação do efeito antibacteriano entre o eugenol e o derivado 10.

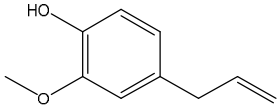
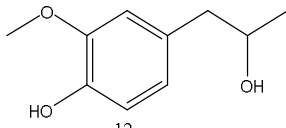
	Substâncias	
Característica apresentada	 eugenol	 <b>10</b>
Sensibilidade bacteriana	Atividade sobre 4 cepas bacterianas	Atividade sobre 2(2) cepas bacterianas
Halos de inibição (mm)	6 a 12	6 e 12

Fonte: dados da pesquisa

Outro estudo recente realizou a síntese de ésteres e éteres derivados do eugenol sendo que os ésteres **5**, **6**, **7**, **8** e **9** coincidem com os produzidos no presente estudo. Porém, os autores citados realizaram a síntese dos mesmos partindo-se do eugenol e dos haletos de ácidos correspondentes, enquanto o atual estudo optou por reação de esterificação do eugenol com os respectivos ácidos carboxílicos catalisada por dicloexilcarboimida (DCC) e dimetilamino piridina (DMAP). Apesar das rotas de síntese serem diferentes, os rendimentos apresentados foram semelhantes. Com relação a avaliação antibacteriana, realizada também por disco difusão naquele trabalho, os resultados demonstraram halos de inibição entre 6 e 11mm (RAHIM, ASARI, *et al.*, 2017).

A substância **12**, originada a partir da reação de hidratação do eugenol também apresentou halo de inibição, com atividade para a bactéria *Streptococcus*, com zona de inibição de 10mm, superior ao apresentado pelo eugenol (6mm), tabela 12. Nota-se que o derivado **12** além de possuir para determinada bactéria capacidade inibitória superior ao do eugenol, o mesmo ainda possuir polaridade significativamente mais elevada, resultando em molécula de caráter mais hidrofílico. Esse fato é bastante requerido em agentes terapêuticos, pois o aumento do grau de polaridade da molécula resulta em uma maior solvatação da mesma em meio aquoso, podendo contribuir para aumento biodisponibilidade do medicamento bem como facilidade na sua eliminação e outras consequências vinculadas a modificação molecular (CHUNG e FERREIRA, 1999) (BLAU e MENEGON, 2006) (AVER, KREUTZ e SUYENAGA, 2015).

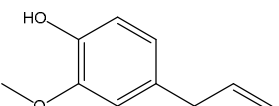
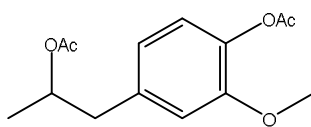
**Tabela 12-** Comparação do efeito antibacteriano entre o eugenol e o derivado **12**.

	Substâncias	
Característica apresentada	 eugenol	 12
Sensibilidade bacteriana	Atividade sobre 4 cepas bacterianas	Atividade sobre 1(1) cepas bacterianas
Halos de inibição (mm)	6 a 12	10

Fonte: dados da pesquisa

Após realização da síntese **13**, que se constitui no derivado acetilado de **12**, a avaliação antibacteriana mostrou que além de manter o efeito inibitória já apresentado por **12** frente a bactéria *Streptococcus* o mesmo também mostrou atividade frente a bactéria *Bacillus cereus*, com halo de inibição de 8 mm.

**Tabela 13-** Comparação do efeito antibacteriano entre o eugenol e o derivado **13**.

	Substâncias	
Característica apresentada	 eugenol	 <b>13</b>
Sensibilidade bacteriana	Atividade sobre 4 cepas bacterianas	Atividade sobre 2(2) cepas bacterianas
Halos de inibição (mm)	6 a 12	8 e 10

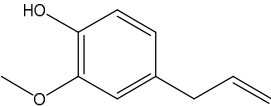
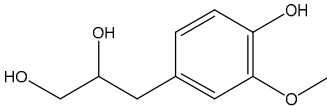
Fonte: dados da pesquisa

O derivado **14**, que se constitui um diol vicinal formado a partir da reação de epoxidação do eugenol seguido de hidrólise alcalina demonstrou atividade frente a bactéria *Streptococcus*, apresentando halo de inibição de 9 mm, ainda que tenha resultado em uma substância com espectro de aplicação antimicrobiana menor do que o eugenol, para essa

bactéria em específico o derivado resultou em potencial inibitório maior que a molécula precursora.

Destaca-se ainda que **14** possui hidrofiliabilidade diferente do eugenol, característica essa que pode ser importante e diferencial em tratamentos terapêuticos, uma vez que fatores como intimamente relacionados com estrutura molecular podem afetar sua bioatividade. Serafim *et al.* (2011) destacou que o desenvolvimento de novos fármacos desempenhar papel central na resolução de problemas relacionados aos fármacos atuais, tais como: alterar a farmacocinética do fármaco in vivo, para melhorar sua absorção, distribuição, biotransformação e excreção; diminuir sua toxicidade e os efeitos adversos; aumentar sua especificidade e tempo ação e sua solubilidade e estabilidade.

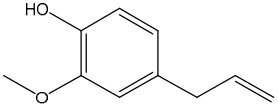
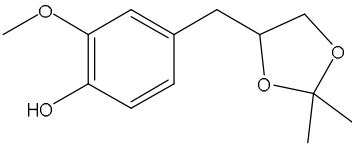
**Tabela 14-** Comparação do efeito antibacteriano entre o eugenol e o derivado **13**.

	Substâncias	
Característica apresentada	 eugenol	 <b>13</b>
Sensibilidade bacteriana	Atividade sobre 4 cepas bacterianas	Atividade sobre 1(1) cepas bacterianas
Halos de inibição (mm)	6 a 12	9

Fonte: dados da pesquisa

O derivado **18**, que foi gerado a partir da reação de formação de cetal do derivado **14** com a propanona apresentou halo de inibição de 9 mm para bactéria *Streptococcus*, zona igual a 14 e superior ao eugenol (6 mm).

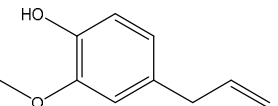
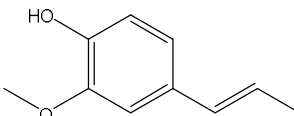
**Tabela 15-** Comparação do efeito antibacteriano entre o eugenol e o derivado 18.

	Substâncias	
Característica apresentada	 eugenol	 <b>18</b>
Sensibilidade bacteriana	Atividade sobre 4 cepas bacterianas	Atividade sobre 1(1) cepas bacterianas
Halos de inibição (mm)	6 a 12	9

Fonte: dados da pesquisa

Além dos derivados produzidos avaliou-se também o potencial antibacteriano dos análogos do eugenol, metileugenol e isoeugenol. Este apresentou-se ativo frente ao crescimento da cepa bacteriológica de *Staphylococcus aureus*, sendo neste caso mais específico que o eugenol que não apresentou halo de inibição para essa cepa, tabela 16. O metileugenol, assim como os derivados **1, 2, 3, 6, 7 e 11** não apresentara halos de inibição para as bactérias testadas.

**Tabela 16-** Comparação do efeito antibacteriano entre o eugenol e isoeugenol.

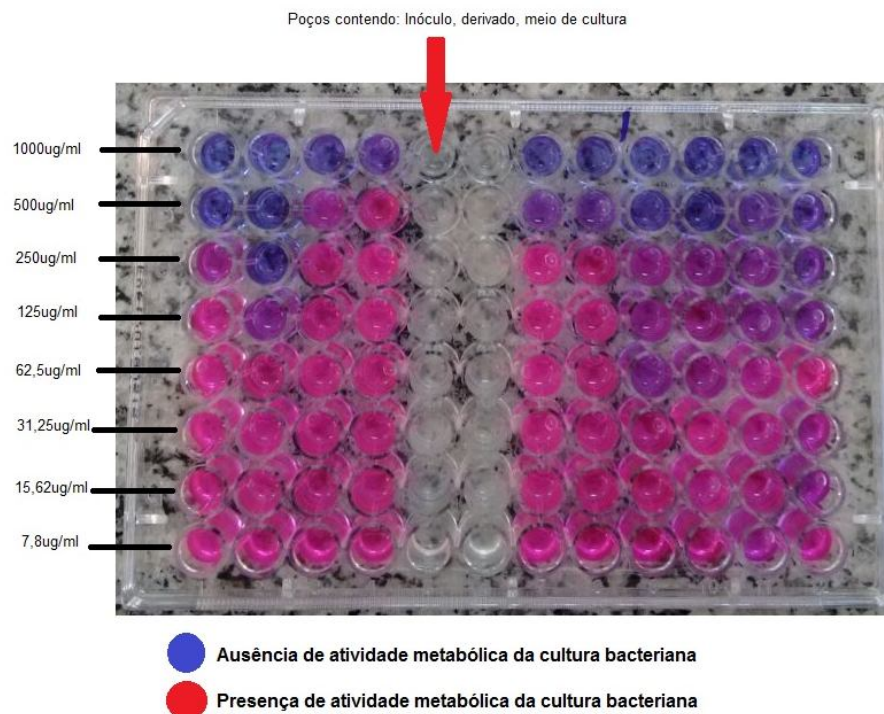
	Substâncias	
Característica apresentada	 eugenol	 Isoeugenol
Sensibilidade bacteriana	Atividade sobre 4 cepas bacterianas	Atividade sobre 1(1) cepas bacterianas
Halos de inibição (mm)	6 a 12	9

Fonte: dados da pesquisa

Após a avaliação da atividade antibacteriana através de disco difusão, as substâncias que apresentaram halos de inibição superiores a 6 mm foram sub a teste de microdiluição em caldo Muller Hilton (Figura 90), para determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

dessas substâncias, ou seja, para determinação da concentração que inibe o crescimento bacteriano.

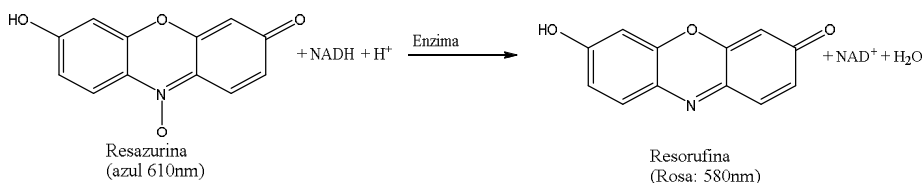
**Figura 90-** Ensaio experimental para determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos derivados que apresentaram halos de inibição no teste por disco difusão.



Fonte: Elaborado pelo autor

A identificação da presença ou ausência de atividade metabólica das bactérias foi realizada através de ensaio bioquímico baseado na redução do corante resazurina através de reação de óxido-redução da desidrogenase bacteriana, que é capaz de reduzir a molécula de resazurina que possui cor azul intensa e quando metabolizada pelos microrganismos transforma-se em derivado com coloração róseo (resorufina) (LIU, 1981).

**Figura 91-** Reação bioquímica baseada na redução do corante resazurina utilizada para identificação de atividade bacteriana.



Fonte: (LIU, 1981)

Os resultados expressos em  $\mu\text{g/ml}$  da substância analisada que foi suficiente para inibir o crescimento bacteriano pode ser visualizado na Tabela 17.

**Tabela 17-** Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) dos derivados com atividade antibacteriana.

Substância	Concentração Mínima Inibitória (CMI)- $\mu\text{g/ml}$					
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Bacillus cereus</i>
4	NA	NA	NA	NA	NA	>1000
5	NA	NA	NA	1000	NA	>1000
8	NA	500	1000	NA	NA	NA
9	NA	NA	NA	1000	NA	NA
10	NA	NA	NA	1000	>1000	NA
12	NA	NA	NA	1000	NA	NA
13	NA	NA	NA	1000	NA	>1000
14	NA	NA	NA	>1000	NA	NA
15	NA	1000	NA	>1000	>1000	NA
16	NA	NA	>1000	>1000	500	500
17	>1000	NA	NA	>1000	>1000	>1000
18	NA	NA	NA	>1000	NA	NA
Eugenol	1000	NA	>1000	1000	1000	1000
Isoeugenol	NA	NA	1000	NA	NA	NA
Penicilina/ eritromicina	125	250	250	250	250	62,5

NA\* Não avaliado a CMI (não apresentou halo de inibição no ensaio por disco difusão).

Fonte: dados da pesquisa

A análise dos dados apresentados na Tabela 17 permite concluir que os derivados **8** e **16** foram os que resultaram em uma menor CMI, demonstrando-se, portanto, mais efetivos como agente antimicrobiano entre as substâncias testadas. Ressalta-se ainda que essa CMI foi superior ao da molécula do eugenol que em todas as cepas avaliadas apresentou CMI igual ou superior a  $1000\mu\text{g/ml}$ . Esses fatos mostram que se o eugenol já é considerado um bom agente antimicrobiano (referência), os referidos derivados também possuem potencial promissor, inclusive sendo ativo em cepas bacteriológicas que o eugenol mostrou-se inativo, como foi o caso da *Escherichia coli*, onde os derivados **8** e **15** foram tão ou mais ativos que o eugenol frente a outras bactérias.

Pesquisa realizada para determinação CMI do eugenol e do derivado **16** (epóxido do eugenol) relatou uma baixa CMI para os referidos compostos, sendo  $115\mu\text{g/ml}$  para eugenol e  $57\mu\text{g/ml}$  para o epóxido frente a bactéria *S. aureus*. Apesar de resultados quantitativos diferentes do presente estudo, um fato em comum, qualitativo, corresponde a observação da



maior ação do epóxido quando comparado com o eugenol, verificado neste estudo pela menor CMI para epóxido apresentada frente as bactérias *Klebsiella pneumoniae* e *Bacillus cereus* (EYAMBE, CANALES e BANIK, 2011). No caso específico do eugenol, encontra-se na Literatura CMI inferior a 20 ug/ml frente a cepas da bactéria *Escherichia coli* (KARACA e NEWMAN, 2015).

Em estudo que analisou o efeito da concentração do eugenol frente a cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, responsáveis por provocar endocardite infecciosa, doença que ataca o endocárdio, relataram CMI de 10 ug/ml. Destaca-se que essa concentração é igual ao do agente terapêutico padrão, penicilina (10 ug/ml), usado pelo autor, evidenciando, portanto, uma excelente atividade antibacteriano para as estirpes avaliadas (LEITE, LIMA, *et al.*, 2007).

Por outro lado, estudo avaliando a capacidade antimicrobiana do eugenol frente a bactéria *Staphylococcus aureus* relatou CMI de 1200 ug/ml para o eugenol (ALBANO, ALVES, *et al.*, 2016). Esse dado está coerente com o encontrado nesse estudo que identificou CMI superior a 1000 ug/ml frente a referida bactéria. Observa-se ainda que CMI do eugenol próximo (950 ug/ml) ou maior que 1000ug/ml frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente, são encontrados na literatura (LEAL, 2013), dados esses que estão alinhados com os identificados nesse trabalho. Outro trabalho investigando a suscetibilidade de estirpes de *Pseudomona aeruginosa* identificaram CMI de 985,2 ug/ml (NUNES, 2016), condizente com as encontradas neste estudo (1000ug/ml).

As CMIs encontradas indicam que tanto o eugenol como os derivados que apresentaram atividade antimicrobiana no presente estudo possui potencial para um amplo espectro de aplicações tendo como finalidade o tratamento de patogenidades provocadas por micro-organismos, uma vez que o próprio eugenol é considerado um agente de significativo efeito antimicrobiano (DEVI, NISHA, *et al.*, 2010) (RAJA, SRINIVASAN, *et al.*, 2015) (OLIVEIRA e FILHO, 2012) seus derivados possuem potencial para ser ainda mais promissores (AWASTHI, DIXIT, *et al.*, 2008) (BENDRE, RAJPUT, *et al.*, 2016) (SOUZA, RAIMUNDO, *et al.*, 2015).

## 5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS DERIVADOS DO EUGENOL (1-21) PRODUZIDOS

A capacidade de capturar radicais livres dos derivados produzidos está expressa na Tabela 18, sendo avaliada frente ao radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH) e expressa na

forma de IC<sub>50</sub>, que representa a concentração necessária para captura 50% dos radicais no meio. Como controle positivo foi usado o trolox e a vitamina C.

**Tabela 18-** Capacidade antioxidante dos derivados do eugenol expressos em IC<sub>50</sub>.

Substância	IC <sub>50</sub> (ug/ml)
1	>200
2	>200
3	>200
4	>200
5	176,8
6	119,14
7	>200
8	>200
9	112
10	>200
11	>200
12	51,12
13	>200
14	20
15	>200
16	19,3
17	>200
18	32
19	30,37
Metileugenol	>200
Isoeugenol	50,7
Eugenol	4,38
Ácido Gálico	0,64
Trolox	16

Fonte: dados da pesquisa

A análise dos resultados apresentados frente a capacidade de capturar radicais livres do eugenol e derivados permite concluir que todos os derivados produzidos (1-19) apresentaram

concentração inibitória capaz de reduzir em 50% ( $IC_{50}$ ) a concentração inicial do radical DPPH menor do que o eugenol, ou seja, a modificação estrutural efetuada resultou em substâncias com efeito antioxidante menor.

Outra característica marcante é o fato de os derivados que foram produzidos através da reação de esterificação do grupo fenol teve uma redução abrupta na atividade antioxidante, de forma que em todas as reações que o grupo hidróxi fenólico foi transformado no respectivo éster (derivados: **1-11** e **13, 15, 17, 20** e **21**) a consequência foi a imediata e significativa redução na capacidade de sequestro de radicais, indicando que o grupo fenol é fundamental para o desempenho da ação antioxidante da substância.

Essa relação de necessidade do grupo hidroxilado ao anel aromático do eugenol para um desempenho da ação antioxidante mais efetivo também foi verificado por (FARIAS, OLIVEIRA, *et al.*, 2013) que avaliou o efeito antioxidante de ésteres e éteres do eugenol, incluído, os derivados **2, 4, 5, 6** e **9**, encontrando em todos os casos  $IC_{50}$  para os derivados inferiores aos encontrados para o eugenol.

Tal comportamento pode ser explicado devido ao fato que a principal característica dos compostos fenólicos, como eugenol, responsável pela atividade antioxidante seja a presença do grupo hidroxilado ao anel aromático que possui a capacidade de doar átomos de hidrogênio, bloqueando a propagação do processo oxidativo (HIDALGO, ROSA, *et al.*, 2009) (NAGABABU, RIFKIND, *et al.*, 2010) (FINDİK, CEYLAN e ELMASTAŞ, 2011).

Quando a modificação química foi realizada na ligação dupla, produzir os derivados **12, 16, 18** e **19** foram observados em todos os casos uma redução na capacidade antioxidante frente ao radical DPPH. Contudo, essa redução é muito inferior a provocada pela esterificação do grupo -OH ligado ao anel aromático, uma vez que, os derivados oriundos das reações de adição ainda mantêm um considerável efeito antioxidante, os derivados **16** ( $IC_{50}$  19,3  $\mu$ g/ml) e **18** ( $IC_{50}$  31,8  $\mu$ g/ml), por exemplo, demonstraram atividades antioxidantes próximas as do padrão trolox ( $IC_{50}$  22,75  $\mu$ g/ml), evidenciando que embora o grupo alila não tenha um efeito tão significativo para a ação antioxidante apresentada pela molécula do eugenol, o mesmo possui uma relativa contribuição na estabilização dos radicais (LUANCHOY, TIANGKUL, *et al.*, 2014).

Esses resultados convergem com dados da literatura (MASTELIC, JERKOVIC, *et al.*, 2008) (BADANAI, SILVA, *et al.*, 2015), que afirmam que grupos ligados ao anel aromático, principalmente grupos doadores, ligados nas posições orto e para, contribuem para melhor atividade antioxidante de compostos fenólicos.

Os derivados do eugenol **12**, **14**, **18** e **19**, que apresentaram melhores atividades antioxidantes, comparado aos demais, possui uma característica estrutural que pode potencializar seu uso como antioxidante. Isso porque, mesmo apresentando valores de IC<sub>50</sub> inferiores ao do eugenol frente ao DPPH, esses dados apenas refletem o comportamento da substância *in vitro*, contudo, em sistemas biológicos vivos, a atividade antioxidante varia em função de: potencial de redução no meio, capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura; capacidade de complexar metais de transição implicados no processo oxidativo; e acesso ao local de ação, dependendo de sua hidrofília ou lipofília e de seu coeficiente de partição (MANACH, SCALBERT, *et al.*, 2004) (SUCUPIRA, SILVA, *et al.*, 2012).

Essa última variável, coeficiente de partição, está intimamente relacionada ao caráter hidrofílico (ou hidrofóbico da molécula) da substância e, no caso dos derivados **12**, **14**, **18** e **19**, embora ambos tenham apresentado ação inibitória de radicais livres menor que o eugenol, a hidrofílicoidade é substancialmente diferente, principalmente para os derivados **12** e **14**, que possuem grupos hidróxi adicionais em sua estrutura conferindo maior grau de hidratação e interação em meios aquosos, os quais constituem os seres vivos e por isso com potencial de ação diferenciada em sistemas vivos dependendo do alvo biológico pretendido (BUNDGAARD, 1991).

Com isso é possível concluir que as modificações químicas impetradas na molécula do eugenol resultou na síntese de substâncias potencialmente ativas, com derivados inibindo crescimento de estirpes bacterianas que o próprio eugenol mostrou-se inativo, caso das substâncias **8**, **15** e **16**, além de maior poder antibacteriano em cepas que o eugenol demonstrou halos de inibição inferiores, caso apresentado pelos compostos **9,10, 12, 13, 14, 15, 16, 17** e **18** frente a bactéria *Streptococcus*. Por isso, esses derivados contribuem para ampliar o espectro de substâncias capazes de suprimir o crescimento microbiano.

O estudo da capacidade antioxidante dos derivados contribuiu para fazer uma avaliação empírica da relação estrutura/atividade das moléculas, sendo que foi possível identificar que o grupo hidróxi (-OH) presente na estrutura do eugenol é decisivo para sua habilidade de inibir a propagação de radicais livres, fato evidenciado experimentalmente pela profunda queda no caráter antioxidante de todos os derivados cujo o grupo hidróxi fenólico foi esterificado. Já alterações na ligação dupla do grupo alil presente no eugenol, apesar de resultar em ligeira redução na capacidade de capturar de radicais DPPH, o aumento do caráter hidrofílico pode compensar e contribuir como diferencial na ação antioxidante em sistemas biológicos.

# **CAPÍTULO 3**

## **PROCESSOS BIOCATALÍCOS USANDO ENZIMAS IMOBILIZADAS A PARTIR DAS CASCAS DE LARANJA (*Citrus sinensis*)**

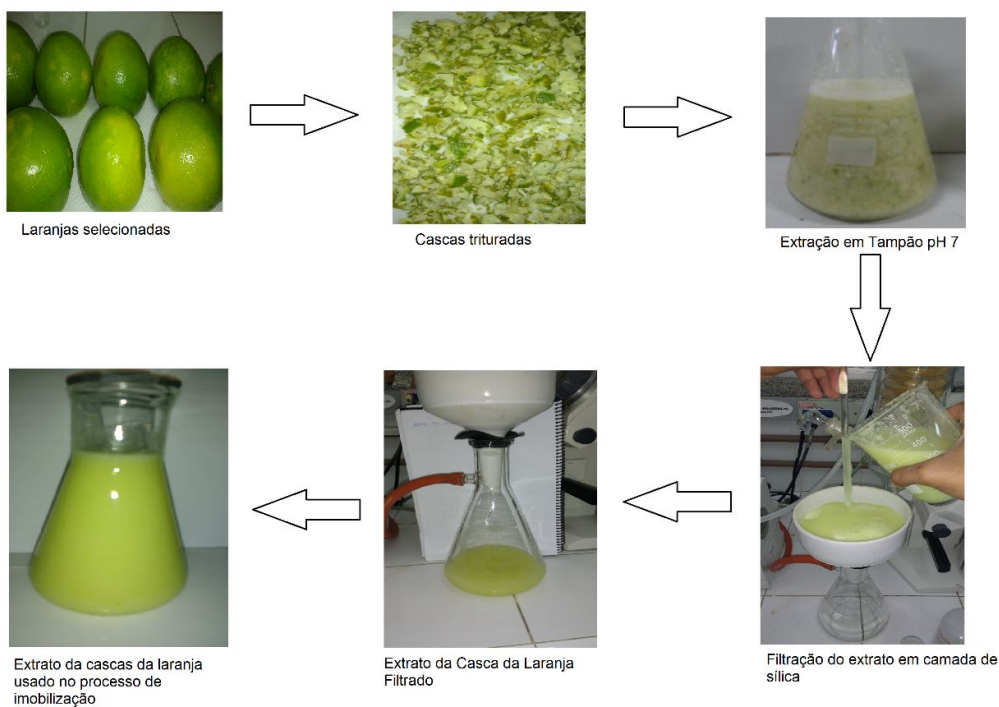
## 6. PROCESSOS BIOCATALÍTICOS COM DOS DERIVADOS DO EUGENOL UTILIZANDO AS CASCAS DA LARANJA.

Dos derivados do eugenol produzidos (1-21) alguns resultaram em misturas racêmicas e foram submetidos a reações biocatalisadas visando a resolução destas misturas. Para tanto, inicialmente, foi realizado um estudo preliminar para coletar dados a respeito da ação catalítica do material vegetal (cascas de laranja), avaliando variáveis como: atividade hidrolítica, tempo de reação, quimiosseletividade, estabilidade térmica, efeito do solvente e uso de peneira molecular.

### 6.1 PREPARAÇÃO DO BIOCATALISADOR

Inicialmente as cascas da laranja foram desinfetadas, trituradas e em seguida extraídas com solução tampão pH 7 (Figura 92).

**Figura 92-** Processo de obtenção do extrato aquoso da casca da laranja.



Fonte: Elaborado pelo autor

Ao extrato aquoso obtido foi adicionado alginato de sódio (1,5%) e após completa dissolução a mistura foi gotejada em solução aquosa de cloreto de cálcio (1,5% m/V) formando as esferas de alginato de cálcio (Figura 93).

**Figura 93-** Esferas de alginato de cálcio sendo formadas (esquerda) e esferas após separação da solução (direita).



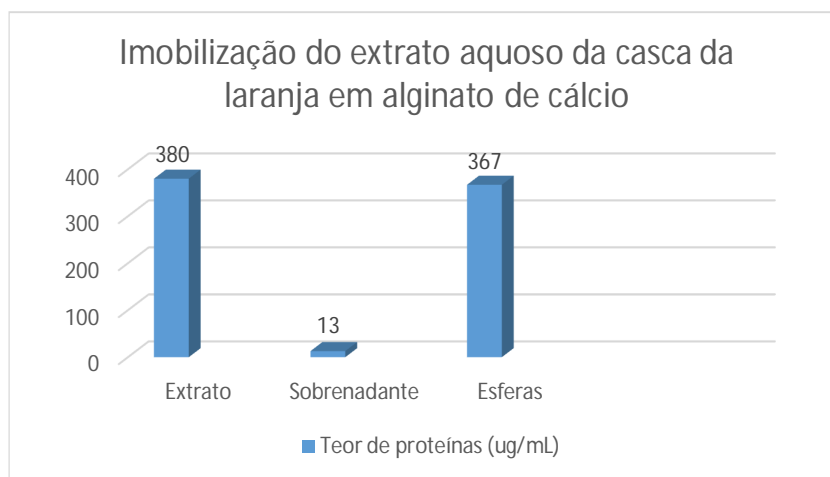
Fonte: Elaborado pelo autor

Após a formação das esferas, o teor de proteínas imobilizadas foi determinado pelo método do Bradford (1976) comparando o teor de proteína do extrato inicial com o sobrenadante do processo de imobilização. Os resultados estão expressos no gráfico da Figura 94, onde é possível verificar que aproximadamente 92,80% das proteínas foram imobilizadas nas esferas.

Esses dados são próximos de alguns relatados na literatura, cujo processo de imobilização utiliza a matriz de alginato para encapsulação de enzimas hidrolíticas (OZYILMAZ e GEZER, 2010) (MARQUES, 2011). A taxa de imobilização das proteínas do ECL, chega a ser superiores aos de Gülay e Sanlı-Mohamed (2012) que relataram taxa de

imobilização entre 23 e 46%. Quando comparado com imobilização em outros suportes que não o alginato, é possível perceber que a metodologia adotada no presente trabalho demonstra índice de imobilização superiores aos encontrados quando utilizados outros suportes, tais como alumina (SILVA, MARCO, *et al.*, 2005) e sílica modificada (Guajardo, Bernal, Wilson, & Cabrera, 2015).

**Figura 94-** Gráfico comparando o teor de proteínas do extrato e do sobrenadante do processo de imobilização das proteínas em alginato de cálcio.

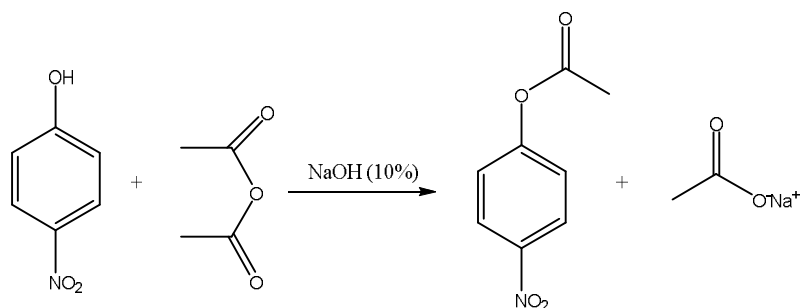


Fonte: Elaborado pelo autor

## 6.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DO BIOCATALISADOR IMOBILIZADO

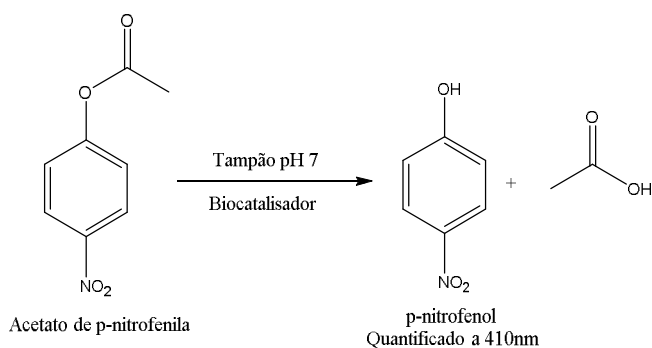
Uma vez que o processo de imobilização de proteínas através do encapsulamento apresentou um bom resultado, foi então verificado a capacidade hidrolítica das enzimas das cascas de laranja imobilizadas nas esferas de alginato de sódio (ECLI). Para tanto foi produzido o éster acetato de para-nitrofenila (Figura 95) (foi caracterizado por espectrometria de massa) e, a partir da sua hidrólise (Figura 96) foi quantificada a atividade hidrolítica do biocatalisador.



**Figura 95-** Reação de síntese do acetato de para-nitrofenila

Fonte: Elaborado pelo autor

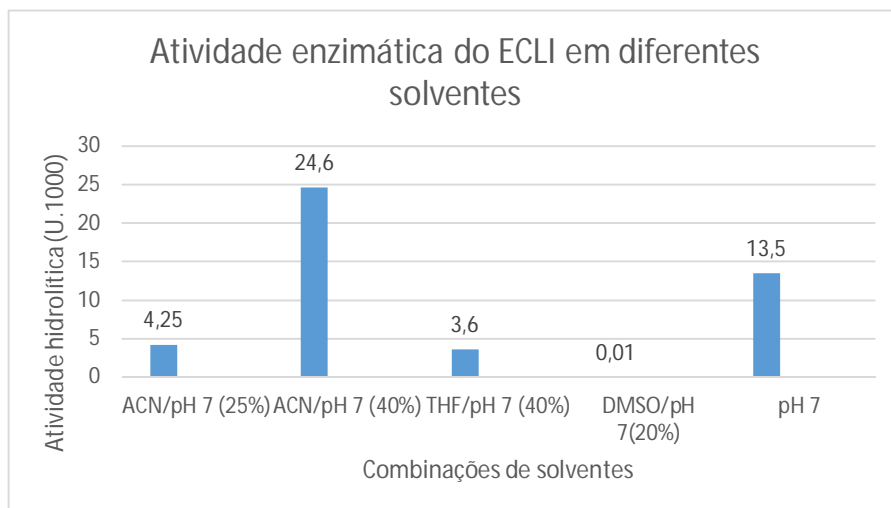
A atividade hidrolítica das esferas obtidas foi quantificada considerando que uma unidade de atividade enzimática (U) foi determinada como a quantidade de biocatalisador (mg) suficiente para liberar  $1\mu\text{mol}$  do substrato (PNP) por minuto  $\text{umol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ .

**Figura 96-** Reação de hidrólise do APNP com o biocatalisador para determinação da atividade enzimática

Fonte: Elaborado pelo autor

### 6.3 CAPACIDADE HIDROLÍTICA DO ECLI EM DIFERENTES SOLVENTES

Visando analisar o potencial hidrolítico do ECLI, em diferentes solventes, a atividade frente a hidrólise do pNPA foi realizada com diferentes misturas de solventes, sendo especificamente avaliados as composições: acetonitrila (ACN)/tampão fosfato pH 7 (75%); acetonitrila (ACN)/tampão fosfato pH 7 (60%); tetrahidrofurano (THF)/tampão fosfato pH 7 (40%) e dimetilssulfóxido (DMSO)/tampão fosfato pH 7 (20%). Os resultados estão apresentados no gráfico (Figura 97), onde é possível perceber que o solvente onde ocorre a atividade hidrolítica mais acentuada é em ACN/tampão pH 7 (60%) com  $24,6\cdot 10^{-3}\text{U}$  seguido da reação conduzida apenas em tampão pH 7 que resultou em uma atividade de  $13,5\cdot 10^{-3}\text{U}$ .

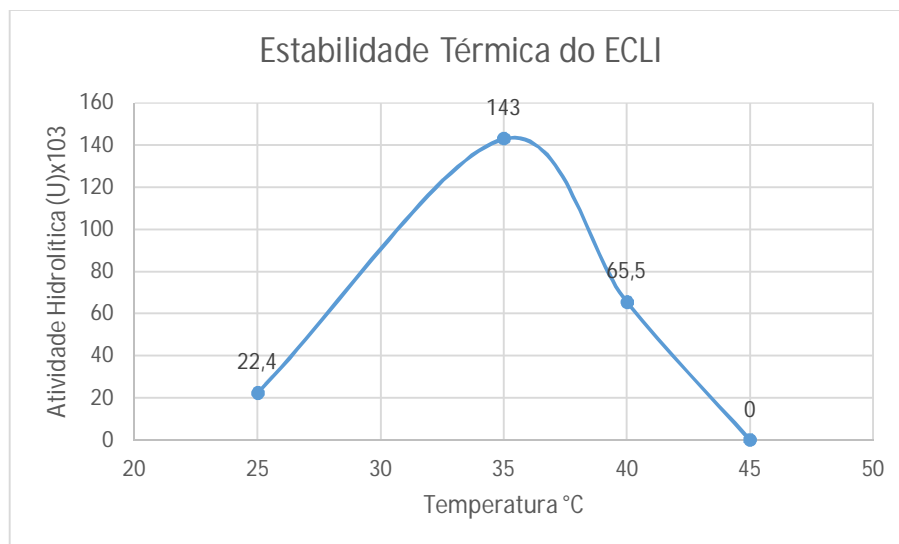
**Figura 97-** Atividade hidrolítica do ECLI em diferentes solventes

Fonte: Elaborado pelo autor

#### 6.4 TERMOESTABILIDADE DO ECLI

A avaliação da termoestabilidade dos biocatalisadores consiste em uma variável importante na execução de processos de síntese. O ECLI foi avaliado em diferentes temperaturas visando identificar seu potencial hidrolítico em condições térmicas distintas.

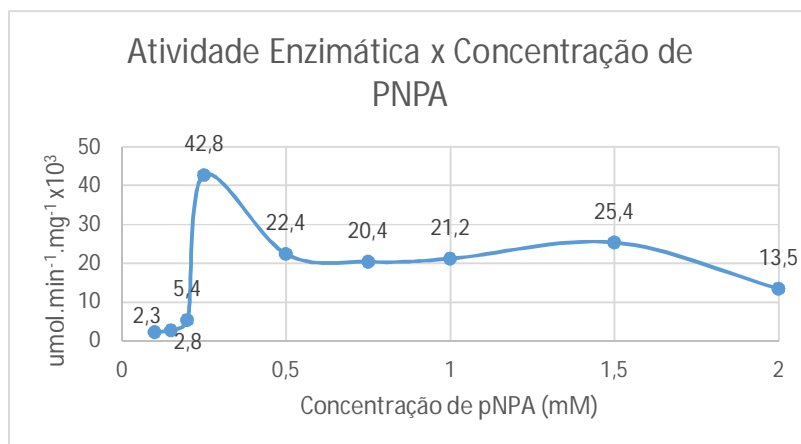
Os resultados apresentados (Figura 98), demonstraram que há um acréscimo atividade hidrolítica do biocatalisador quando se eleva a temperatura de 25°C ( $22,4 \cdot 10^{-3}U$ ) para 35°C ( $143 \cdot 10^{-3}U$ ), decaindo para  $65,5 \cdot 10^{-3}U$  quando a temperatura usada chega a 40°C e tornando-se totalmente inativo quando a temperatura atinge 45°C.

**Figura 98-** Estabilidade térmica do ECLI em diferentes temperaturas

Fonte: Elaborado pelo autor

#### 6.5 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE APNP NA VELOCIDADE DA REAÇÃO.

A determinação da velocidade máxima da reação foi obtida mantendo-se a concentração do biocatalisador constante e variando a concentração do substrato (acetato de *para*-nitrofenila) de acordo com o gráfico da figura 99. A velocidade máxima da reação,  $42,8 \text{ umol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \times 10^{-3}$  foi alcançada quando foi utilizada a concentração de substrato de 0,25mmol.

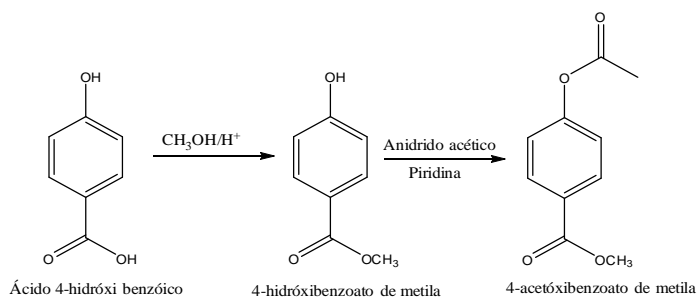
**Figura 99-** Atividade hidrolítica do ECLI frente a diferentes concentrações do substrato (APNP)

Fonte: Elaborado pelo autor

## 6.6 AVALIAÇÃO DA REGIOSSELETIVIDADE DO ECLI

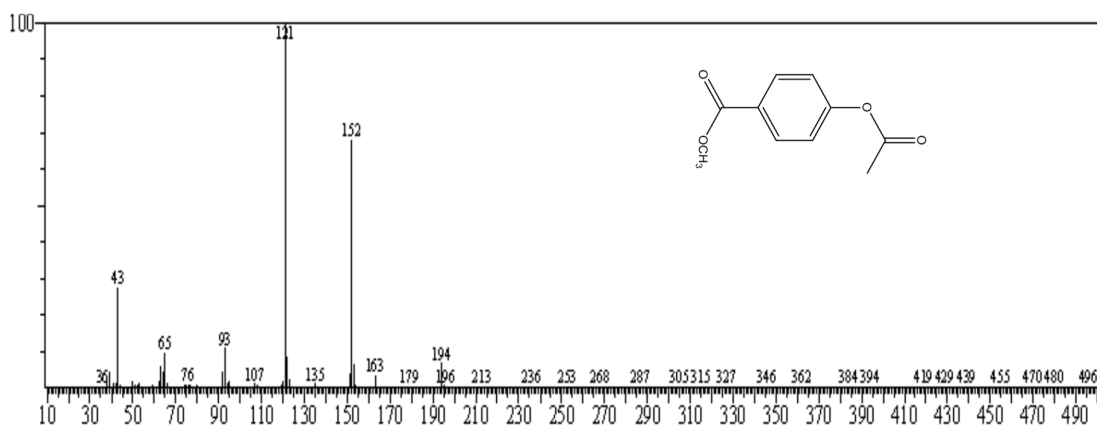
Tendo em vista verificar uma possível regioseletividade, as enzimas imobilizadas da casca da laranja (ECLI) foram avaliadas através de reação com o substrato 4-acetoxibenzoato de metila. Este éster foi sintetizado conforme mostrado abaixo (Figura 100) e caracterizado por espectrometria de massa ( $M^+$  194 e pico base em  $m/z$  121) (Figura 101).

**Figura 100-** Reação de síntese do 4-acetóxi benzoato de metila



Fonte: Elaborado pelo autor

**Figura 101-** Espectro de massa do 4-acetóxi benzoato de metila



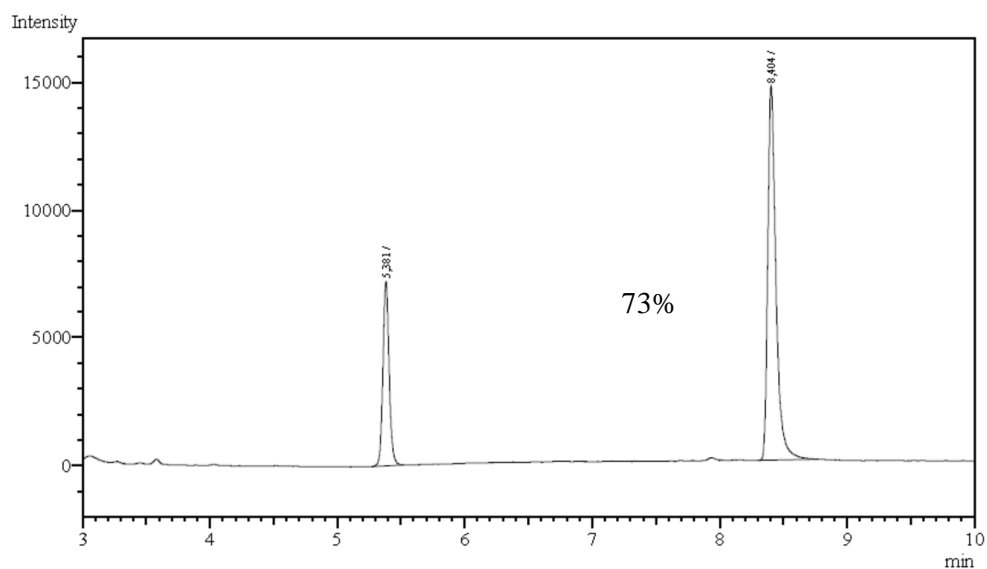
Fonte: Elaborado pelo autor

O 4-acetoxibenzoato de metila foi submetido a reação de hidrólise com EICL nos períodos de 24h, 48 e 72h, apresentando uma excelente regioseletividade em todos os períodos avaliados, uma vez que, apenas o grupo acetoxi foi hidrolisado, deixando o grupo benzoato intacto (Figura 102), conforme identificado pelo cromatograma CG-DIC (Figura 103).

**Figura 102-** Hidrólise regioseletiva do ECLI frente ao 4-acetóxibenzoato de metila

Fonte: Elaborado pelo autor

**Figura 103-** Reação de hidrólise regioseletiva do 4-acetóxibenzoato de metila com ECLI



Fonte: Elaborado pelo autor

### 6.7 ENANTIOSELETIVIDADE DO ECLI EM REAÇÕES DE HIDRÓLISE E ESTERIFICAÇÃO.

A enantioselectividade do ECLI foi avaliada tanto em reações de hidrólise, conduzidas em meio tamponado pH 7, quanto em reações de esterificação (acetilação), realizadas em solvente orgânico (hexano) tendo o acetato de vinila como reagente doador de grupo acil. Na

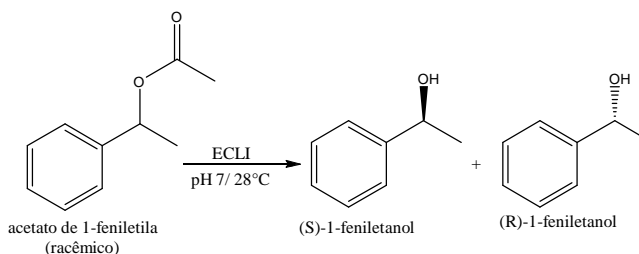
hidrólise foi utilizado o éster (*R,S*)-acetato de 1-feniletila e na esterificação o álcool (*R,S*)-1-feniletanol como substratos padrões.

### 6.7.1 Efeito do tempo na reação de hidrólise do (*RS*)- acetato de 1-feniletila

As reações foram efetuadas nos tempos de 24, 48 e 72 h, analisadas em cromatógrafo gasoso equipado com coluna quiral e detector de ionização em chama e o excesso enantiomérico (*ee*) foi obtido a partir das áreas dos picos referentes a cada um dos enantiômeros.

Na reação de hidrólise (Figura 104) foi observado um aumento na conversão do éster nos alcoóis à medida que o tempo de reação foi aumentado de 24 até 72 h. Entretanto, os excessos enantioméricos (*ee*) do álcool diminuíram enquanto os do éster aumentaram com o aumento do tempo de reação (Tabela 19).

**Figura 104-** Esquema reacional da reação de hidrólise do éster racêmico (*RS*)- acetato de 1-feniletila



Fonte: Elaborado pelo autor

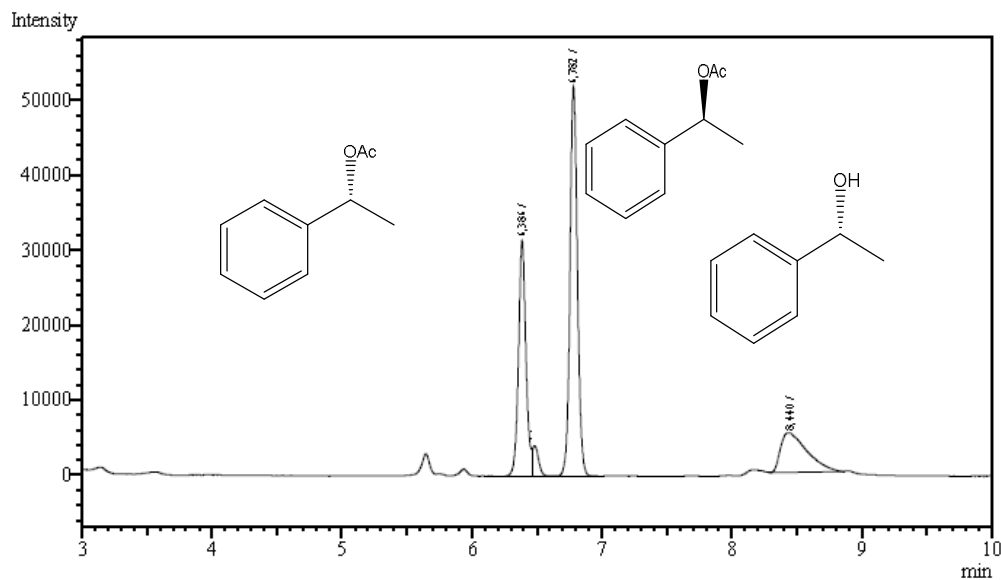
**Tabela 19-** Teor de conversão e excessos enantiomérico da reação de hidrólise do (*RS*)-acetato de 1-feniletila em diferentes tempos de reação.

Tempo	Conversão	<i>ee</i> álcool	<i>ee</i> éster
24	41,5	28	24
48	75	15	40
72	81	12	48

Fonte: dados da pesquisa

O sistema enzimático imobilizado apresentou maior preferência para hidrólise do enantiômero de configuração *S*, identificado no cromatograma (Figura 105) com o tempo de retenção de 8,4 minutos.

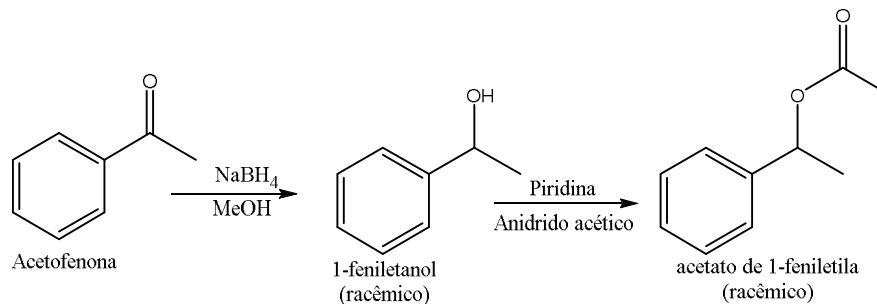
**Figura 105-** Cromatograma (CG-DIC) da reação de hidrólise do (*RS*)-acetato de 1-feniletila catalisada por ECLI.



Fonte: Elaborado pelo autor

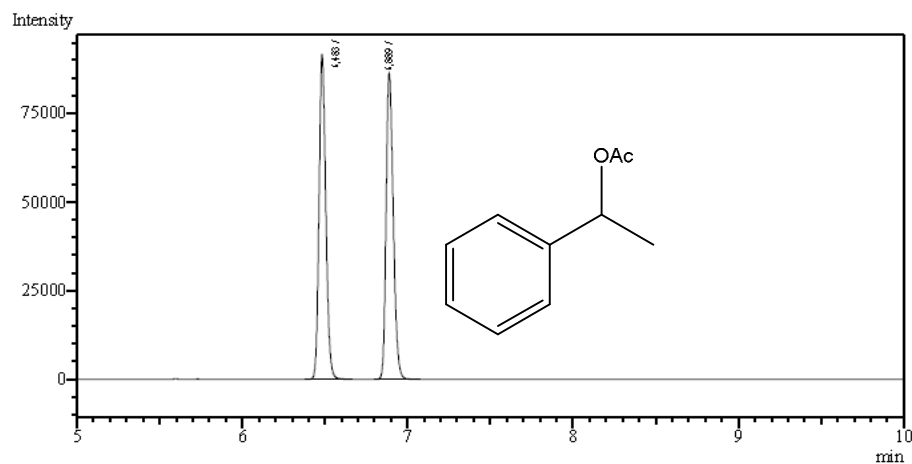
Os cromatogramas representados nas figuras 107 e 108, são referente a análise dos padrões racêmicos do éster (*RS*)-acetato de 1-feniletila e do álcool (*RS*)-1-feniletanol, produzidos através da reação de redução da acetofenona com boroidreto de sódio seguido de acetilação com anidrido acético e piridina, conforme no esquema reacional representado na Figura 106.

**Figura 106-** Esquema reacional da síntese dos substratos (*RS*)-1-feniletanol e (*RS*)-acetato de 1-feniletila



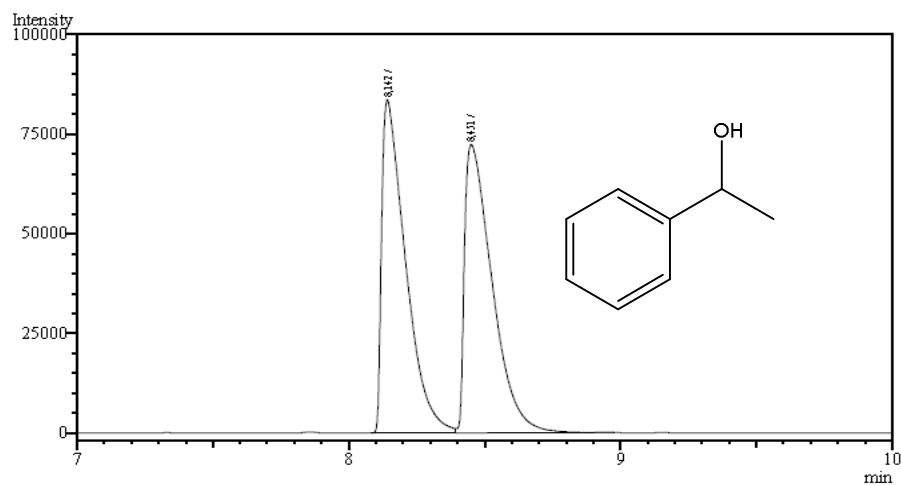
Fonte: Elaborado pelo autor

**Figura 107-** Cromatograma (CG-DIC) do padrão (*RS*)-acetato de 1-feniletila obtido por via química.



Fonte: Elaborado pelo autor

**Figura 108-** Cromatograma (CG-DIC) do padrão (*RS*)-1-feniletanol obtido por via química.



Fonte: Elaborado pelo autor

### 6.7.2 Efeito do tempo na reação de acetilação do (*RS*)-1-feniletanol

A reação de acetilação (Figura 109), conduzida em meio orgânico (hexano) em três tempos com intervalos de vinte e quatro horas (24, 48 e 72 h), apresentou um melhor teor de conversão no tempo intermediário (48 horas) (Tabela 20), porém, com melhor excesso enantiomérico do éster no maior tempo (72 h).

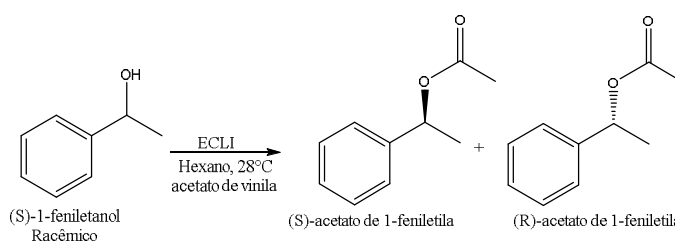


**Tabela 20-** Teor de conversão e excessos enantiomérico da reação de esterificação do (RS)-1-feniletanol em diferentes tempos de reação.

Tempo	Conversão	<i>ee</i> <sub>álcool</sub>	<i>ee</i> <sub>éster</sub>
24	17	2,71	49
48	60	17	50
72	32	33	75

Fonte: dados da pesquisa

**Figura 109-** Reação de esterificação do (RS)-1-feniletanol catalisada por ECLI



Fonte: Elaborado pelo autor

Quando se compara os dados da reação de hidrólise com aqueles obtidos da reação de esterificação é possível notar que ambos conduzem a reação enantiosseletivas, porém, na reação de hidrólise foi possível constatar uma leve degradação das esferas que continha o biocatalisador após 72h de uso, além da mesma resultar em menor *ee*.

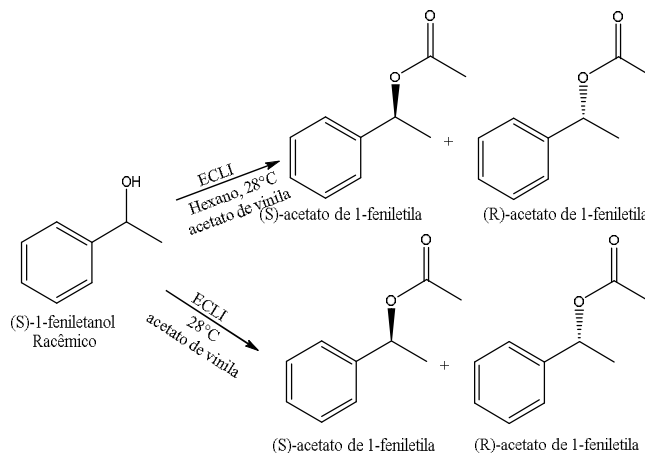
Já as reações de esterificação, mesmo após 72h de reação, não foi identificado nenhuma degradação do catalisador e seu suporte, característica que é muito requerida, uma vez que, potencializa a capacidade de reuso do catalisador. Além disso, a reação de esterificação resultou em melhor *ee*.

Por isso, as demais variáveis, assim com os demais substratos foram analisados frente a reação de esterificação conduzidas em meio orgânico.

### 6.7.3 Efeito do solvente na reação de acetilação do (RS)-1-feniletanol

A capacidade de síntese do ECLI na presença de solvente orgânico (ausência de água) e em meio livre de solvente (hexano) também foi verificada conforme reação representada na Figura 110.

**Figura 110-** Esquema reacional de reação de esterificação do (RS)-1-feniletanol catalisada com ECLI na presença de solvente (hexano) e na ausência de solvente.



Fonte: Elaborado pelo autor

O ECLI demonstrou capacidade de catálise tanto em ambiente com solvente orgânico (hexano) como em sistema livre de solvente (Tabela 21).

**Tabela 21-** Conversão e *ee* apresentados pela reação de esterificação catalisada por ECLI.

Sistema	Conversão	<i>ee</i> álcool	<i>ee</i> éster
Hexano	32	33	75
Sem solvente	4	100	5

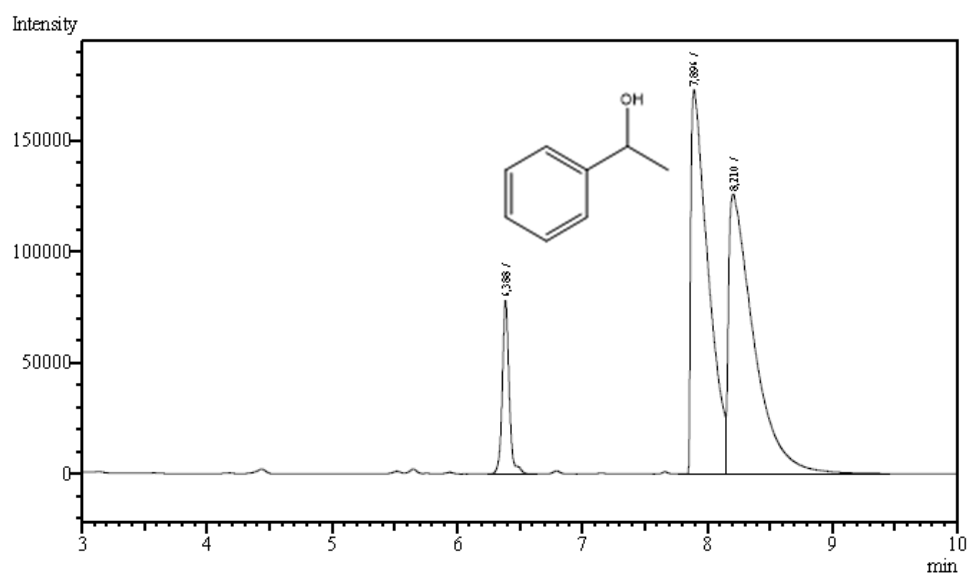
Fonte: dados da pesquisa

Esses resultados ampliam o espectro de possibilidade de aplicações do ECLI em sistemas de síntese, uma vez que, reações conduzidas na ausência de solventes representam em geral menores custos de processo, isso porque não necessita de etapa para recuperação e separação de solventes, além de menores investimentos em reatores, pois operam em menor volume, somando-se ao fato de requerer menos energia para atingir a temperatura reacional desejada (YAHYA, ANDERSON e MOO-YOUNG, 1998) (GHAMGUI, KARRA-CHAABOUNI, *et al.*, 2006) (YADAV e THORAT, 2012). Por isso, essa habilidade de esterificação tanto em meio com solvente orgânico como livre de solvente (apenas com o álcool e o doador acila) torna o ECLI um biocatalisador em potencial para reações de síntese orgânica.

Mesmo operando em ambos os meios (com e sem solvente orgânico), a reação com uso do hexano como solvente resultou em maior enantiosseletividade e maior conversão. Por

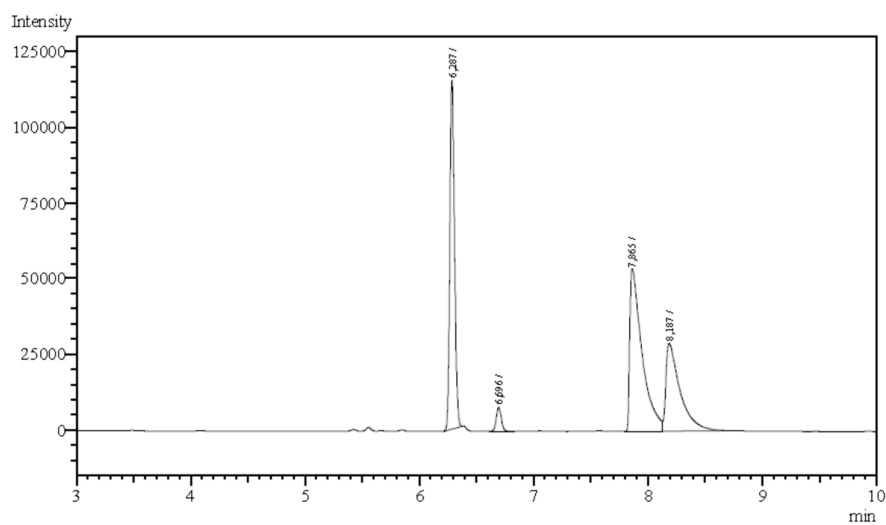
isso, as demais reações foram conduzidas usando hexano como meio reacional. Os cromatogramas das reações de acetilação catalisada por ECLI com e sem solvente, estão representados nas Figuras 111 e 112.

**Figura 111-** Cromatograma (CG-DIC) da reação de esterificação do (*RS*)-1-feniletanol catalisada por ECLI em sistema livre de solvente.



Fonte: Elaborado pelo autor

**Figura 112.** Cromatograma (CG-DIC) da reação de esterificação do (*RS*)-1-feniletanol catalisada por ECLI em sistema com solvente (hexano).



Fonte: Elaborado pelo autor

#### 6.7.4. Efeito da concentração do substrato na reação de acetilação do (RS)-1-feniletanol

O (R,S)-1-feniletanol em diferentes concentrações (2mg, 5mg e 10mg) foi submetido a reação de esterificação em presença de acetato de vinila como doador acila e catalisada por ECLI tendo em vista determinar a quantidade de substrato que conduzisse a reação com maior conversão e melhor excesso enantiomérico (*ee*). Os resultados estão apresentados na Tabela 22.

**Tabela 22-** Teores de conversão e *ee* na reação de esterificação catalisada por ECLI com diferentes massas de substrato.

Substrato (mg)	Conversão	<i>ee</i> <sub>álcool</sub>	<i>ee</i> <sub>éster</sub>
2	32	33	75
5	34	28	73
10	35	23	86

Fonte: dados da pesquisa

#### 6.7.5 Efeito da quantidade de catalisador na reação de acetilação do (RS)-1-feniletanol

O impacto da quantidade de biocatalisador utilizada na reação de esterificação foi verificado variando-se a massa de ECLI em cada reação, usando para tanto as condições de tempo (72h) e massa de substrato (10mg) otimizadas anteriormente. Os resultados podem ser analisados na Tabela 23.

**Tabela 23-** Teores de conversão e *ee* na reação de esterificação catalisada por diferentes massas de ECLI.

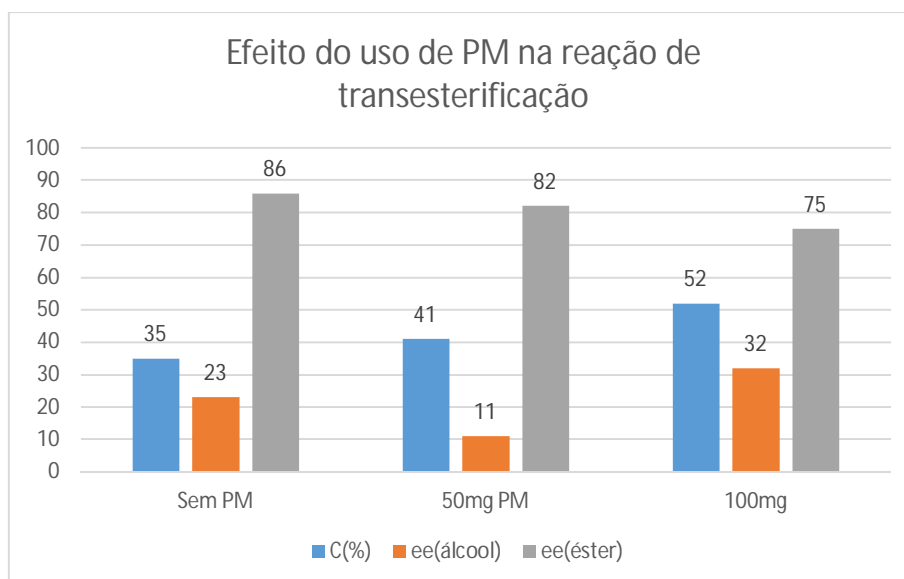
ECLI (mg)	Conversão	<i>ee</i> <sub>álcool</sub>	<i>ee</i> <sub>éster</sub>
100	8	32	92
250	28	20	76
500	35	23	86

Fonte: dados da pesquisa

### 6.7.6 Efeito do uso de peneira molecular na reação de acetilação do (RS)-1-feniletanol.

O efeito do uso de peneira molecular foi avaliado na reação conduzida com o substrato modelo. A Figura 113, apresenta os resultados, comparando a reação com e sem o uso de peneira molecular. O uso de peneira molecular é justificado pelo fato de a mesma ser capaz de absorver moléculas de água, característica que contribui para que o equilíbrio da reação de esterificação seja deslocado para formação dos produtos (formação do éster), evitando assim a reação de hidrólise do éster formado na reação inversa.

**Figura 113-** Efeito do uso de PM na reação de esterificação catalisada pelo ECLI.

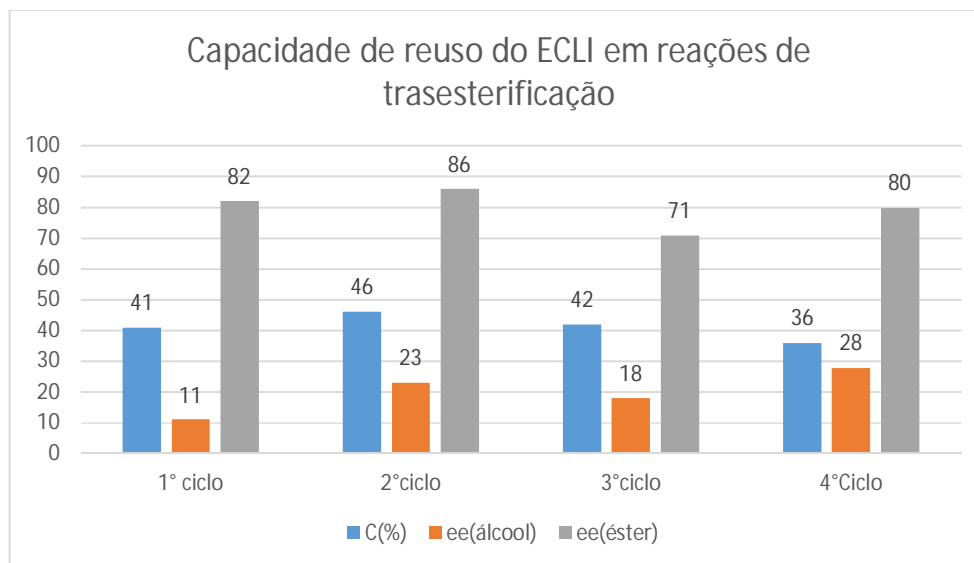


PM\* Peneira molecular

Fonte: Elaborado pelo autor

### 6.7.7 Capacidade de reuso do biocatalisador (ECLI)

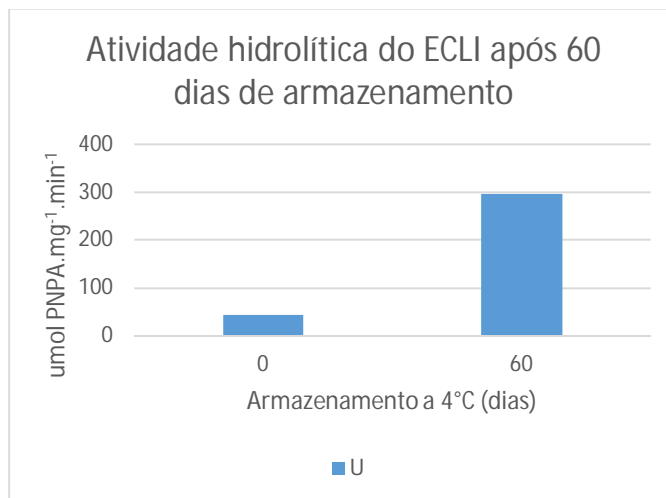
O ECLI foi submetido sucessivas vezes a reação esterificação e em seguida verificada sua atividade hidrolítica remanescente frente a hidrólise do APNP. Os resultados (Figura 114) mostram bom potencial de reuso nas reações de esterificação, uma vez que o ECLI, após os vários ciclos de reação, ainda mantém sua atividade hidrolítica próxima a inicial.

**Figura 114-** Capacidade de reuso do ECLI em reações de transesterificação

Fonte: Elaborado pelo autor

### 6.7.8 Capacidade de armazenamento.

O ECLI assim que preparado foi armazenado em refrigerador a 4°C por um período de 60 dias. Em seguida foi verificado sua atividade hidrolítica e comparado com a atividade hidrolítica inicial (Figura 115).

**Figura 115-**Gráfico da atividade hidrolítica do ECLI fresco e após armazenamento de 60 dias.

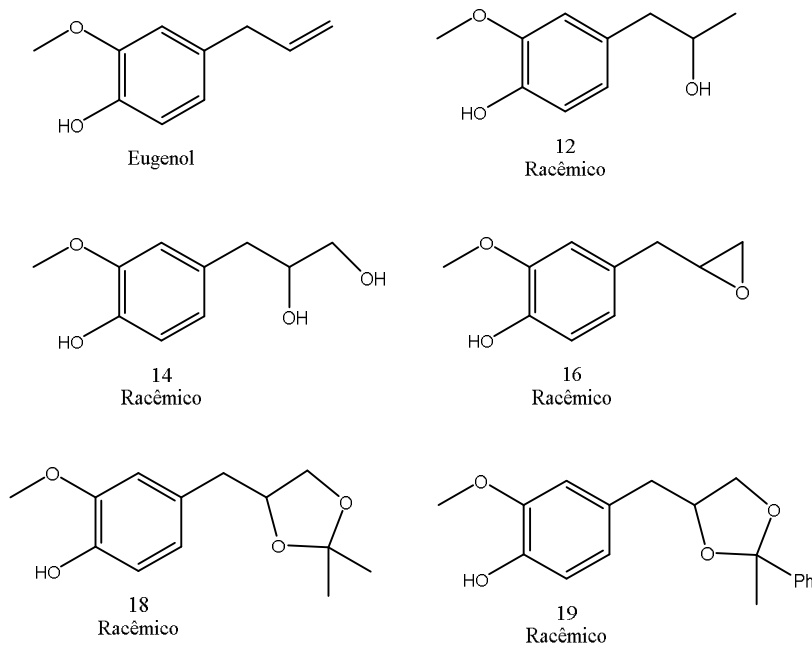
Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados da capacidade de armazenamento inicialmente de mostram promissores, uma vez que a atividade catalítica não sofre danos durante a estocagem, pelo contrário, registra aumento na sua capacidade hidrolítica. Fato este, que pode está relacionado com mudanças na porosidade e estrutura morfológica do suporte durante o resfriamento e acondicionamento modificando assim o acesso do substrato ao biocatalisador.

### 6.7.9 Reações biocatalíticas com EICL frente aos derivados racêmicos do eugenol

Após alguns estudos acerca do biocatalisador (EICL) e de algumas condições de reação de esterificação por ele catalisadas, o eugenol e derivados do eugenol (**12**, **14**, **16**, **18** e **19**) que resultaram em misturas racêmicas quando produzidos por via química convencional e que possuíam grupos hidroxila, ou seja, fénois ou alcoóis, portanto, passíveis de acetilação, foram submetidos a reação catalisada pelo ECLI, sendo observados os detalhes reacionais enantiosseletividade, quimiosseletividade e regioseletividade (Figura 116).

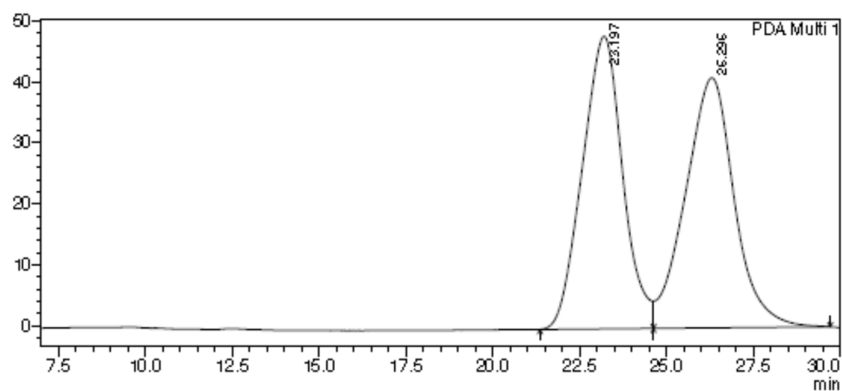
**Figura 116-** Compostos submetidos a reação de acilação catalisada por ECLI em meio orgânico.



Fonte: Elaborado pelo autor

No cromatograma (Figura 117) do derivado (*R,S*)-**12** [registrado em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), equipado com coluna quiral], foi possível perceber picos com áreas semelhantes para ambos os componentes do racemato, conforme esperado na reação química clássica na ausência de catalisador quiral.

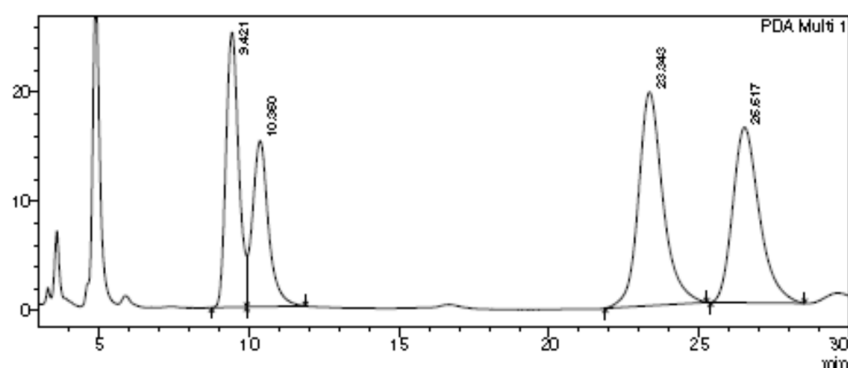
**Figura 117-** Cromatograma em CLAE com coluna quiral do derivado **12**



Fonte: Elaborado pelo autor

Na reação de **12** com acetato de vinila catalisada por ECLI, a análise por CLAE após 48 h, indicou a formação do produto acetilado, conforme demonstrado no cromatograma (Figura 118) obtido a partir do produto de reação, com picos com tempos de retenção dos reagentes e produtos.

**Figura 118-** Cromatograma CLAE da reação de acilação do derivado **12** com ECLI

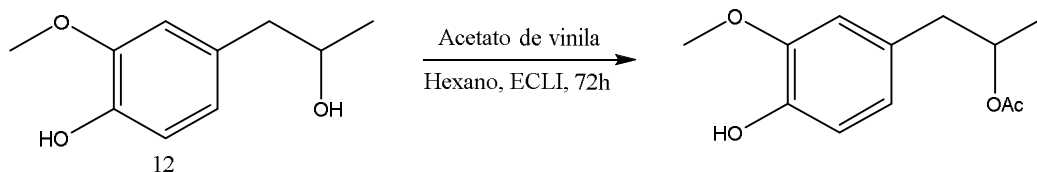


Fonte: Elaborado pelo autor



A reação se mostrou altamente quimiosseletiva, sendo obtido apenas o produto monoacetilado apenas no grupo hidroxila da função álcool, conforme representado na equação química abaixo (Figura 119).

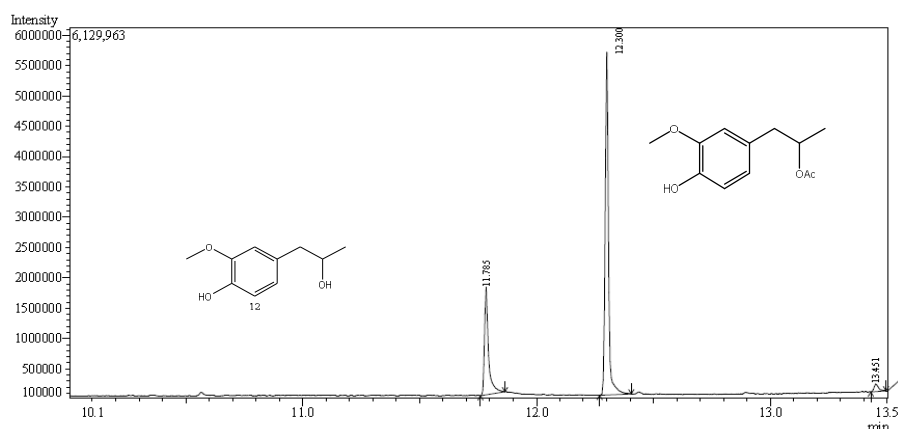
**Figura 119-** Reação da acetilação quimiosseletiva realizada pelo ECLI com o derivado 12



Fonte: Elaborado pelo autor

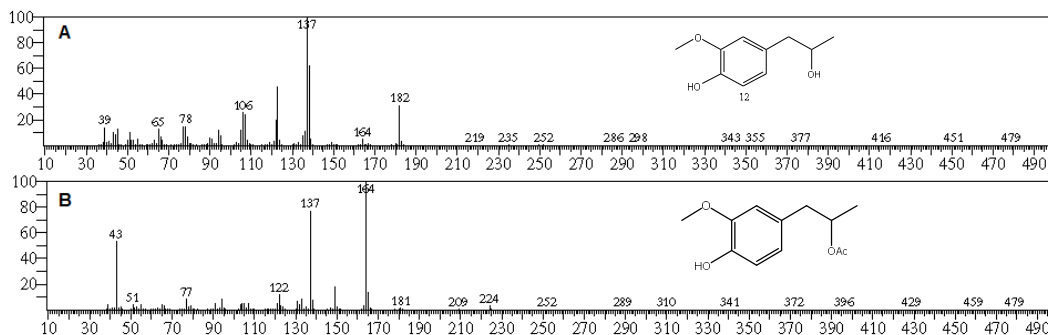
Esse resultado é bastante promissor uma vez que mostra uma via de síntese que permite a acetilação de moléculas com função mista (fenol e álcool), de forma direcionada para produção do éster somente a partir do álcool. Esta característica pode ser valiosa uma vez que, como salientado neste trabalho, o grupo fenol é crucial para a atividade antioxidante do eugenol e derivados. O produto monoacetilado foi caracterizado por CG-EM (Figura 120). O espectro de massa (Figura 121 A) do produto monoacetilado registrou o pico do íon molecular ( $[m/z\ 224]^+$ ) e o íon pico base em  $m/z\ 164$  (M-60,  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ ), entre outros importantes  $[m/z\ 137: \text{M} - 87$  ( $\text{H}_3\text{CCH}_2\text{OAc}$ );  $m/z\ 43, \text{H}_3\text{CO}^+$ ).

**Figura 120-** Cromatograma CG-EM da reação de esterificação de 12 catalisada pelo ECLI



Fonte: Elaborado pelo autor

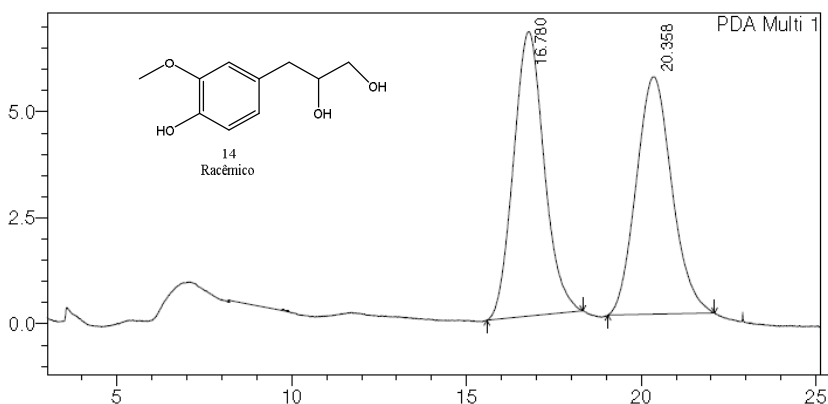
**Figura 121-** Espectro de massa do derivado **12** (A) e do produto resultante da reação de monoacetilação (**B**) via processo catalítico com ECLI.



Fonte: Elaborado pelo autor

No cromatograma (Figura 122) do derivado (*R,S*)-**14** [registrado em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), equipado com coluna quiral], é possível perceber picos com áreas semelhantes para ambos os componentes do racemato, como esperado na reação química convencional.

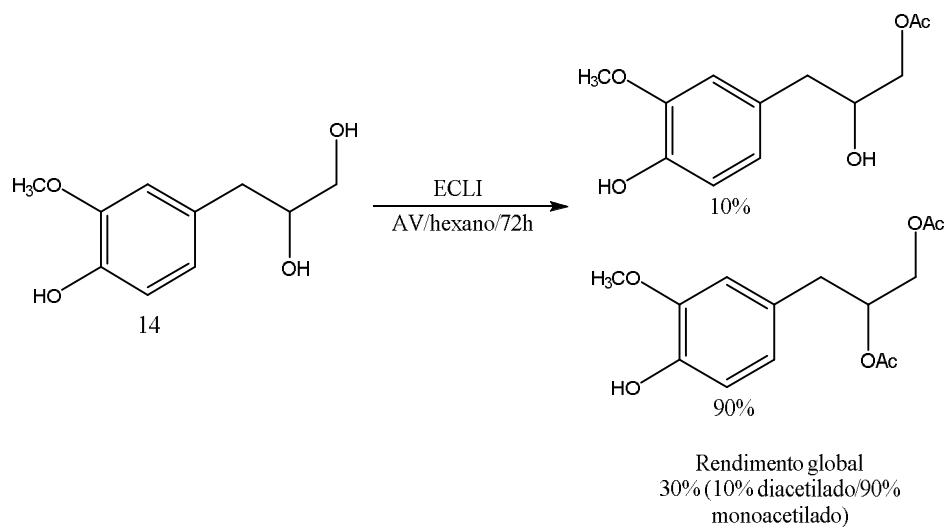
**Figura 122-** Cromatograma CLAE gerado na análise do derivado 14 obtido por via química.



Fonte: Elaborado pelo autor

Após ser submetido ao processo biocatalítico operado com ECLI com o derivado 14 demonstrou a ação catalítica do ECLI, resultando na formação dos produtos conforme representado na equação química (Figura 123). O produto diacetilado foi formado preferencialmente e mais uma vez a hidroxila do grupo fenol permaneceu intacta frente a esse processo biocatalítico.

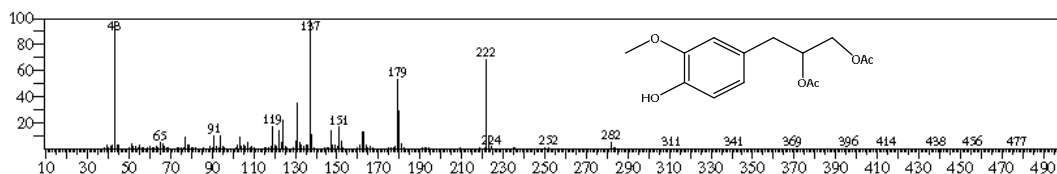
**Figura 123-**Reação de esterificação do derivado **14** catalisada pelo ECLI.



Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro de massa (Figura 124) do produto da acetilação de **14** exibiu o pico do íon molecular ( $[m/z\ 282]^+$ ) além de picos outros picos compatíveis com a fragmentação molecular esperada [ $m/z\ 222$  ( $M - 60$ ),  $m/z\ 137$  ( $M - 87$ ),  $m/z\ 179$  ( $m/z\ 222 - 43$ ) e  $m/z\ 43$ ].

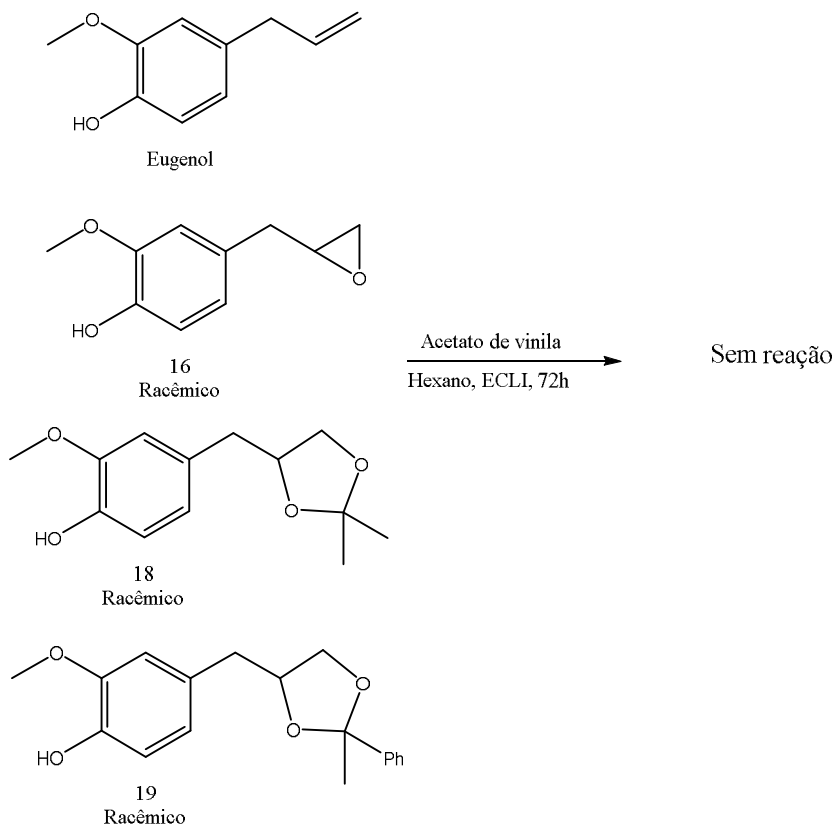
**Figura 124-** Espectro de massas do produto da reação do derivado **14** diacetilado catalisada por ECLI.



Fonte: Elaborado pelo autor

O eugenol, assim como, os derivados **16**, **18** e **19**, todos apenas com o grupo hidroxila da função fenol não resultaram nos respectivos produtos acetilados (Figura 125).

**Figura 125-** Esquema reacional dos derivados com grupos fenólicos frente a esterificação catalisada por ECLI.

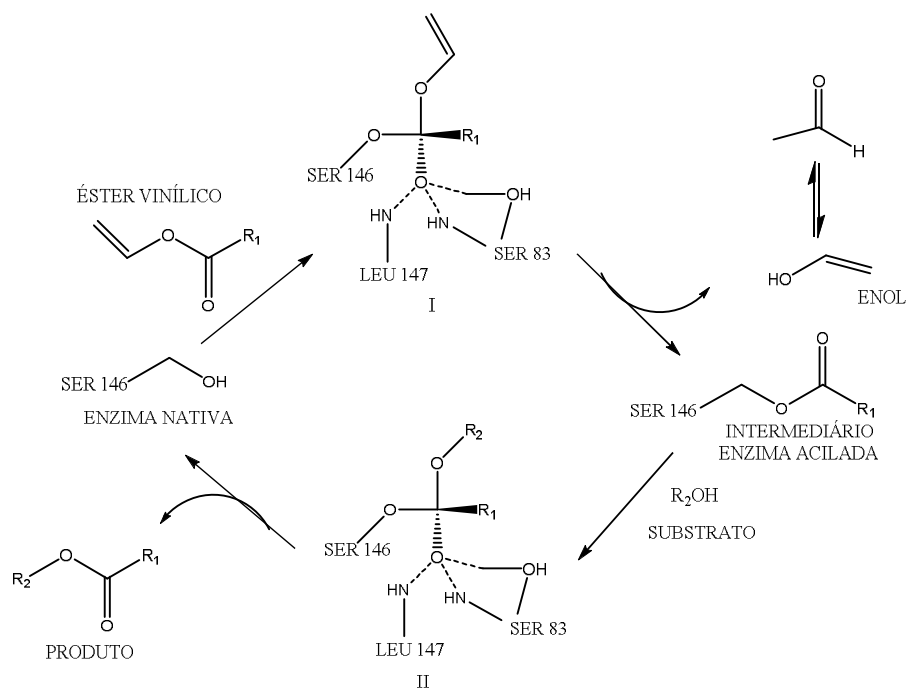


Fonte: Elaborado pelo autor

Esta situação, isto é, a não acetilação de hidroxilas fenólicas se manteve mesmo quando o tempo de reação foi estendido até 96 horas. Isto pode estar em parte relacionado com a basicidade do grupo fenólico ( $pK_a$  10), que é inferior ao do grupo hidróxi de um álcool ( $pK_a$  16) e, portanto, é observado uma redução no caráter nucleofílico daquele substrato.

O mecanismo de esterificação enzimática (Figura 126) também auxilia no entendimento da questão. A menor reatividade afeta o equilíbrio da reação, uma vez, que nesse processo a primeira etapa catalítica envolve o ataque nucleofílico do álcool (ou fenol, no caso) ao grupo acila intermediário ligado a enzima, sendo que quanto menor a sua basicidade, menor será o grau de formação do intermediário tetraédrico subsequente e menor probabilidade de formação do produto (LAWSON, BRZOZOWSKI, *et al.*, 1994) (COSTA e AMORIM, 1999).

**Figura 126-** Esquema do mecanismo de reação para catálise enzimática na esterificação.

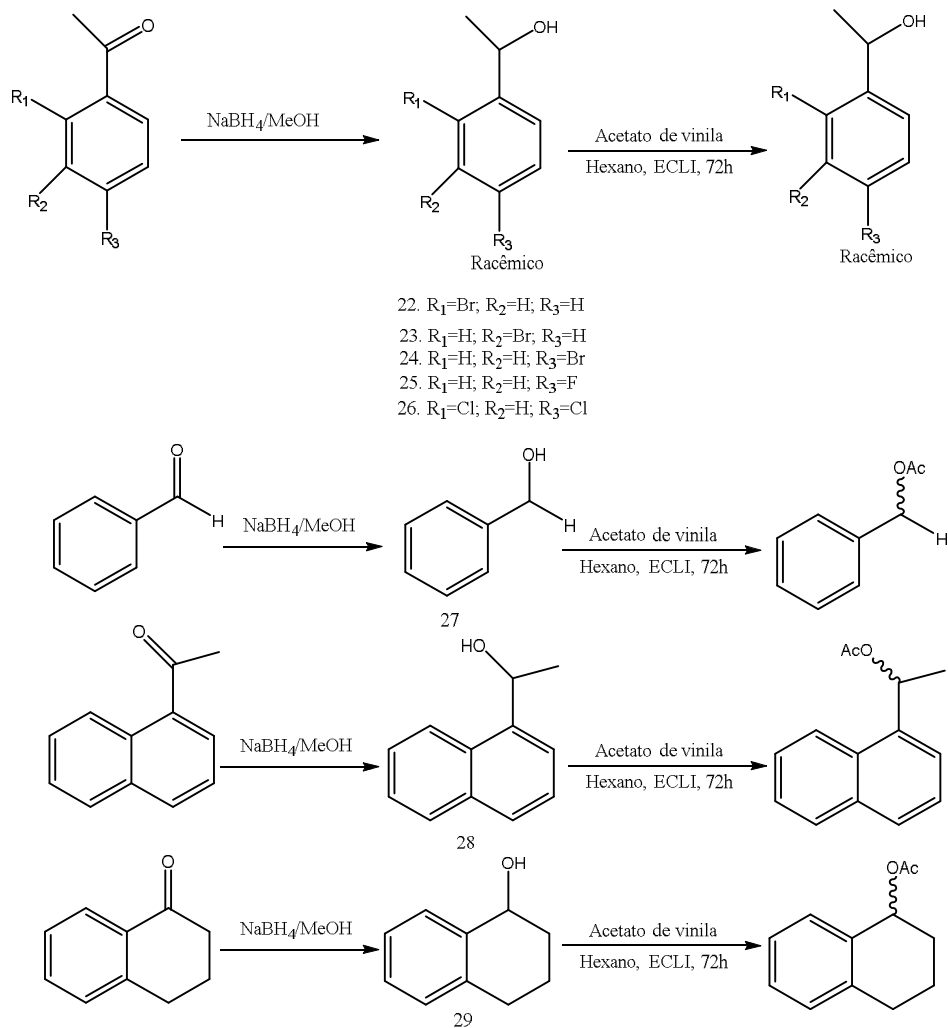


Fonte: (LAWSON, BRZOZOWSKI, *et al.*, 1994)

## 6.8 USO DO BIOCATALISADOR EM REAÇÕES COM ÁLCOOIS PRIMÁRIOS SECUNDÁRIOS.

Considerando a capacidade de esterificação apresentada pelo ECLI, outros alcoóis racêmicos foram produzidos através de reação de redução dos respectivos aldeídos e cetonas por via química clássica (Figura 127) e, então, submetidos a reação de esterificação catalisada pelo ECLI, buscando ampliar o espectro de aplicações desse biocatalisador. As condições usadas nas reações foram as mesmas otimizadas para o (*R,S*)-1-feniletanol.

**Figura 127-** Síntese de álcoois racêmicos (22 – 29)



Fonte: Elaborado pelo autor

O ECLI apresentou capacidade catalítica na reação de esterificação frente aos substratos **22** a **27**. Apresentando teores de conversão entre 8 e 53% e *ee* variando entre 13 e 98 % (Tabela 24).

**Tabela 24-** Teores de conversão e ee dos diferentes substratos submetidos a reação de esterificação catalisada por ECLI.

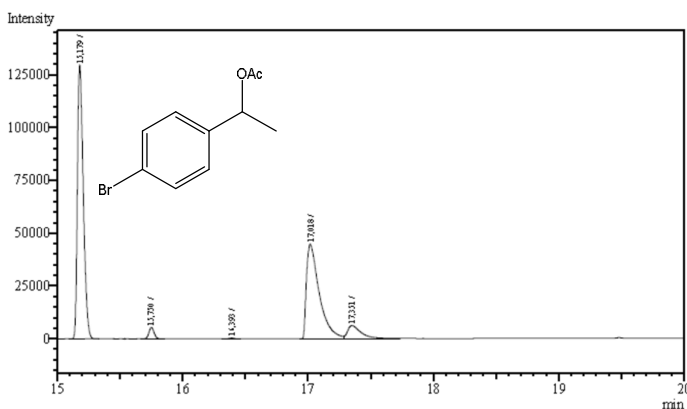
Substrato	Conversão (%)	ee(álcool)	ee(éster)
22	24	62	ND
23	29	81	ND
24	53	74	93
25	50	86	ND
26	23	24	96
27	48	NA	NA
28	8	13	98
29	NI	NI	NI

NA\* Não Aplicável; ND\* Não Determinado; NI\* Não Identificado

Fonte: dados da pesquisa

O substrato 24, conforme o cromatograma (Figura 128) demonstrou o maior teor de conversão (53%), aliado a relevantes ee (74%) do álcool e do éster (93%).

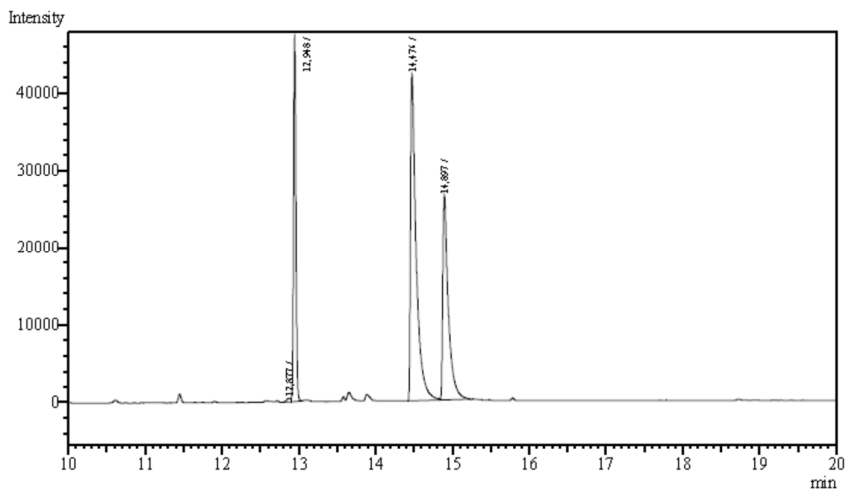
**Figura 128-** Cromatograma CG-DIC da reação de esterificação de **24** catalisada pelo ECLI



Fonte: Elaborado pelo autor

O substrato 26, um álcool de natureza aromática dihalogenado, produziu o álcool derivado com razoável rendimento (24%) e o éster com excelente excesso enantiomérico (96%), segundo o cromatograma (Figura 129) do produto bruto de reação.

**Figura 129-** Cromatograma CG-DIC da análise da reação de esterificação do substrato **26** catalisada por ECLI.



Fonte: Elaborado pelo autor

Importante destacar que esse biocatalisador na forma como preparado e aplicado nesse trabalho se mostra bastante promissor uma vez que, esse nível de ee algumas vezes não são alcançados nem com uso de enzimas puras (FUJII, ISHII, et al., 2009) (RÍOS, RANTWIJK e SHELDON, 2012) (ZHOU, NI, et al., 2014), que possuem um custo econômico significativamente superior. Por outro lado, a fonte de biocatalisador usada neste trabalho que faz uso de uma parte vegetal que é considerado um resíduo industrial e domiciliar.

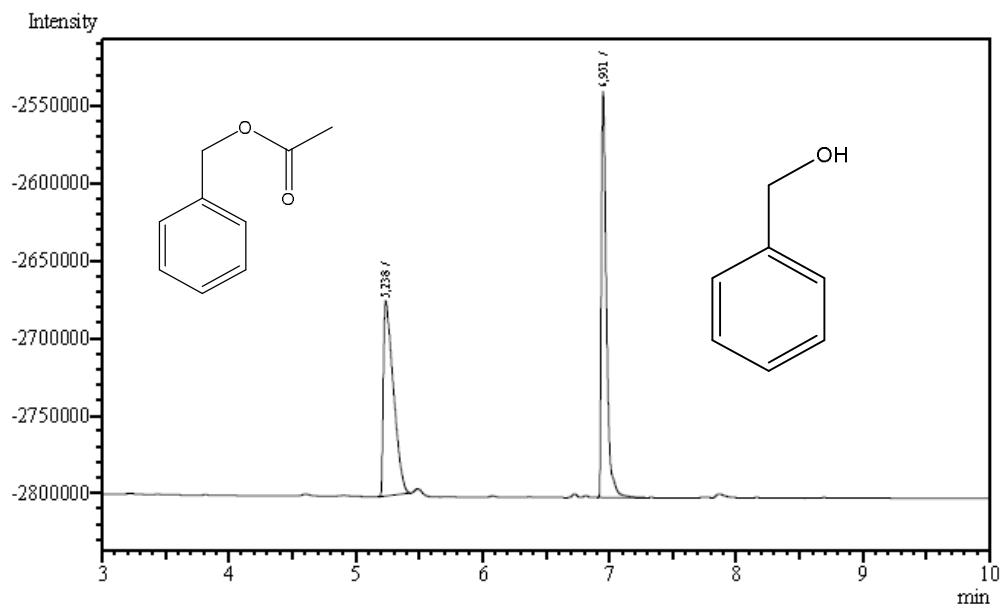
O substrato 28, com baixo valor de conversão (10%) e baixo e.e. do álcool (13%), embora com um excelente e.e. (98%) do éster, o que restringe um pouco seu uso catalítico nessas condições.

O substrato 29, um álcool cíclico, não sofreu ação do biocatalisador dentro dos limites de detecção das análises efetuadas.

Já, frente a um álcool primário, o álcool benzílico (27), o ECLI demonstrou boa capacidade biocatalítica, com um teor de conversão ao respectivo éster (48%), identificado no cromatograma CG-DIC (Figura 130), comparado com ao da enzima comercial CALB.



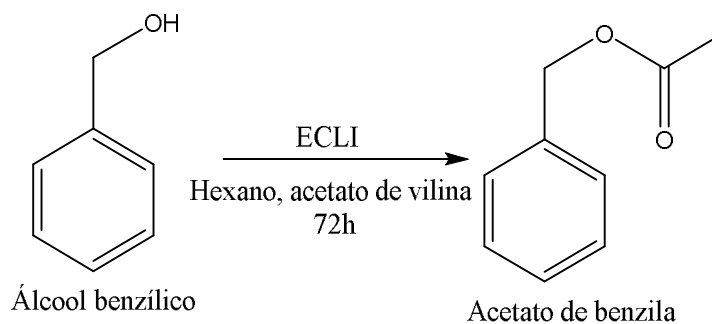
**Figura 130-** Cromatograma CG-DIC da reação de esterificação de **27** catalisada pelo ECLI.



Fonte: Elaborado pelo autor

O acetato de benzila, ora produzido como um dos componentes presentes na essência de jasmim e cereja é amplamente utilizado como flavorizante na indústria de alimentos, cosméticos e farmacêutica (KUMAR, RAWLINGS e BEAMAN, 1993) (BALBANI, STELZER e MONTOVANI, 2006) (OLIVEIRA, SOUZA, *et al.*, 2014). Assim, fica evidenciado uma aplicação em potencial para o uso catalítico do ECLI (Figura 131) na síntese de aromatizantes.

**Figura 131.** Reação de esterificação de **27** catalisada pelo ECLI.



Fonte: Elaborado pelo autor

Os dados ora apresentados evidenciam que o uso do ECLI em reações de esterificação se mostra vantajosos, principalmente por três pontos fundamentais em processos químicos em

geral e, em especial em química fina. O primeiro, refere-se ao custo do catalisador, pois, sendo as cascas da laranja um rejeito industrial, o valor envolvido na aquisição desse biocatalisador torna-se demasiadamente baixo quando comparado com o uso de enzimas puras, o que em termos produtivos implica em maior competitividade na produção de compostos orgânicos.

O segundo, envolve a quimiosseletividade e regioseletividade apresentada pelo ECLI, sendo eficiente na hidrólise de ésteres com grupo fenólicos frente a outros ésteres e na reação de esterificação mantém seletividade elevada para modificações químicas em grupos hidróxi dos álcoois em detrimento dos grupos fenólicos. Essas características de elevada região e quimiosseletividade junto com a obtenção de elevados ee (>98%) potencializam seu uso para obtenção de substâncias de alto valor agregado, onde pureza ótica das substâncias é essencial.

O terceiro e último ponto a destacar é quanto à capacidade de armazenamento e, no caso das reações de esterificação, de reuso do catalisador. Essas características permitem uma redução substancial nos custos uma vez que o biocatalisador pode ser usado em vários ciclos de produção, além de permite o uso em uma faixa relativamente ampla de tempo, propriedades essas que aliadas ao fato do ECLI ser capaz de catalisar reações tanto em meio aquoso, como orgânico e, até mesmo na ausência de solvente, amplia o espectro de possibilidades desse biocatalisador, em especial, conforme demonstrado em parte desse trabalho, para obtenção de ésteres, que são substâncias extensivamente utilizadas nas indústrias cosméticas, alimentícias e farmacêuticas.

## 7. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 7.1 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO E ANÁLISES

As análises necessárias para obtenção dos espectros e cromatogramas, incluindo técnicas de cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria na região do infravermelho e espectroscopia na região do UV/VIS foram realizadas na Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

### 7.2 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Para cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatoplasmas de gel de sílica 60 ( $\Phi = 2-25\mu\text{m}$ ) sobre poliéster T-6145 provenientes da marca SIGMA CHEMICAL CO com camada de 250  $\mu\text{m}$  de espessura e dimensões de 10x5 cm. Também foram utilizadas placas de vidro revestidas com uma camada de aproximadamente 0,5 mm de espessura de sílica gel 60 ( $\Phi = 0,004 - 0,005 \text{ mm}$ ) código 1094 da marca VETEC.

Após eluição das substâncias nas cromatoplasmas, as mesmas foram reveladas através de aspersão com solução de vanilina ( $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ , 5,0 g) e ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ , 0,75 mol/L, 100 mL) em etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ , 100 mL) seguida de aquecimento a 100°C com pistola aquecedora da marca Steinel, modelo HL500, por aproximadamente 1 min.

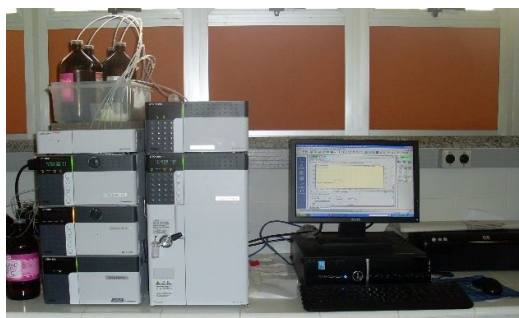
### 7.3 CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO

Os produtos reacionais, após extração, foram purificados em coluna cromatográfica utilizando como adsorvente gel de sílica 60 ( $\Phi = 0,025 - 0,020 \text{ mm}$ ), código 45 337, de procedência VETEC. O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser purificada e de sílica utilizadas. Como eluentes foram usados hexano e acetato de etila de qualidade PA da marca Synth, puros ou em misturas binárias na proporção 8:2, respectivamente.

#### 7.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

O excesso enantiomérico dos produtos de biorredução das cetonas pró-quirais e de hidrólise dos racematos foram determinados por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), Figura 132, de marca Shimadzu, com bomba L201147, equipado com coluna quiral OB-H e OD-H de dimensões 150 x 4,6 mm e detector UV-Vis Shimadzu SPD-M20A. Na análise foi utilizado como fase móvel mistura binária de Hexano/Isopropanol variando-se a composição da mesma de acordo com as necessidades da análise.

**Figura 132-** Foto ilustrativa do Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) situado no Laboratório de Biotecnologia e Produtos Naturais da UFC

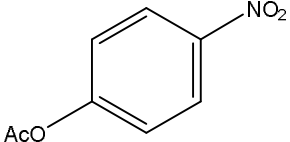
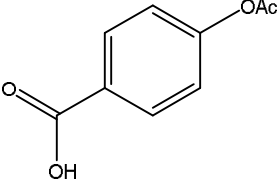
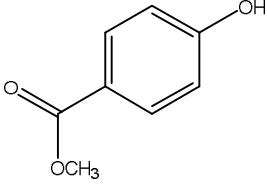
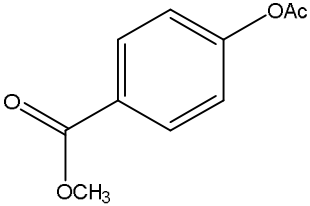
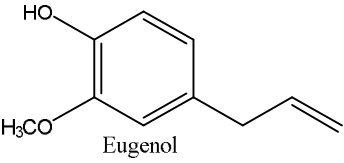
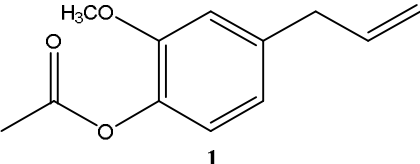


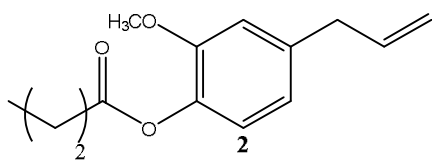
Fonte: Elaborado pelo autor

#### 7.5 CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO DOS SUBSTRATOS

As condições (fluxo, fase móvel, tempo de retenção) nas quais foi realizada a separação dos substratos estão reunidas na Tabela 25.

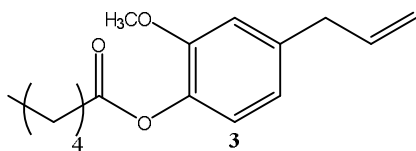
**Tabela 25-** Fórmulas moleculares das substâncias e as condições de caracterização utilizadas na análise de CLAE

SUBSTÂNCIA	CARACTERIZAÇÃO
	CG-EM; Tr = 11, 84min-coluna Rtx®-5MS
	CG-DIC; Tr = 11min- coluna Chirasil-Dex CB
SUBSTÂNCIA	CARACTERIZAÇÃO
	CG-DIC; Tr = 8,41 min- Chirasil-Dex CB
	CG-EM; Tr = 11, 9min-coluna Rtx®-5MS
 <p data-bbox="418 1562 500 1593">Eugenol</p>	CG-EM; Tr = 11, 2min-coluna Rtx®-5MS
 <p data-bbox="483 1793 500 1824">1</p>	<p>CG-MS: coluna capilar Rtx®-5MS, Tr 12.10 min. MS m/z 206 (M<sup>+</sup>), 164 (M-42, 100), 149, 131, 91, 43. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2.31 (s, 3H), 3.40 (d, 6.6 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 5.10 (sl, 1H), 5.50 (dl, 1H), 6.00 (m, 1H), 6.78 (dl, 8.0 Hz, 1H), 6.79 (sl, 1H), 6.97 (d, 7.1 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 20.82;</p>

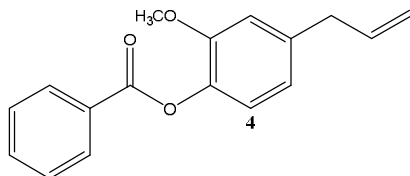


40.26; 55.99; 112.94; 116.31; 120.85; 122.70; 137.22; 138.22; 139.18; 151.07; 169.37.

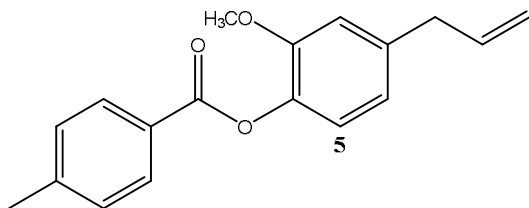
**CG-MS:**coluna capilar Rtx®-5MS,  $T_R$  12.50 min. MS m/z 234 ( $M^+$ ), 164 (M-70, 100), 149, 131, 91, 43. :  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  1.07 (t, 7.4 Hz, 3H), 1.80 (m, 2H), 2.58 (t, 7.3 Hz, 2H), 3.39 (d, 6.7 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 5.10 (sl, 1H), 5.51 (dl, 1H), 6.00 (m, 1H), 6.77 (dl, 1H), 6.79 (sl, 1H), 6.97 (d, 7.9 Hz, 1H).  $^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  13.75; 18.77; 36.10; 40.26; 55.98; 112.97; 116.26; 120.85; 122.75; 137.28; 138.33; 139.02; 151.13; 172.00.



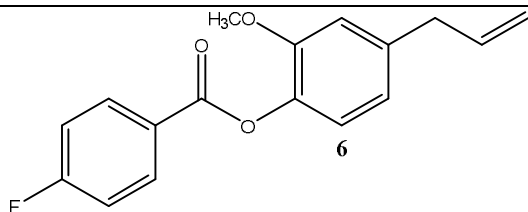
**CG-MS:** coluna capilar Rtx®-5MS,  $T_R$  13.30 min. MS m/z 262 ( $M^+$ ), 164 (M-98, 100), 149, 132, 121, 104, 91, 43.  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  0.94 (t, 6.9 Hz, 3H), 1.41 (m, 4H), 1.76 (m, 2H), 2.57 (t, 7.4 Hz, 2H), 3.38 (d, 6.7 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 5.08 (sl, 1H), 5.14 (dl, 1H), , 6.00 (m, 1H), 6.77 (dl, 1H), 6.79 (sl, 1H), 6.94 (d, 7.9 Hz, 1H).  $^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  14.13; 22.52; 24.94; 31.43; 34.22; 40.28; 55.98; 112.97; 116.27; 120.86; 122.74; 137.29; 138.34; 139.02; 151.14; 172.22.



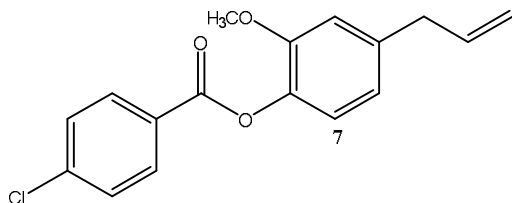
**CG-MS:** coluna capilar Rtx®-5MS,  $T_R$  14.70 min. MS m/z 268 ( $M^+$ ), 105 (M-163, 100), 77, 51.  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  3.42 (d, 6.6 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 5.11 (sl, 1H), 5.16 (dl, 1H), 6.00 (m, 1H), 6.83 (dl, 9.0 Hz, 1H), 6.85 (sl, 1H), 7.08 (d, 7.8 Hz, 1H), 7.51 (m, 2H), 7.61 (tl, 1H), 8.06 (d, 8.1 Hz, 2H).  $^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  40.30; 56.09; 113.14; 116.30; 120.94; 122.85; 128.48; 130.47; 132.96; 133.54; 137.30; 138.47; 139.23; 151.34; 165.05.



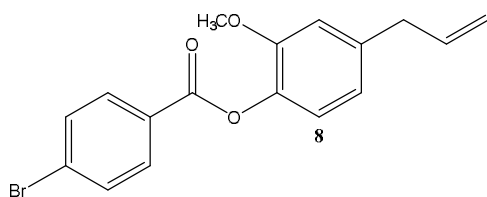
**CG-MS:** coluna capilar Rtx®-5MS,  $T_R$  15.28 min. MS m/z 282 ( $M^+$ ), 119 (M-163, 100), 91, 65.  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  2.42 (s, 3H), 3.42 (d, 6.6 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 5.10 (sl, 1H), 5.15 (dl, 1H), 6.00 (m, 1H), 6.82 (dl, 1H), 6.84 (sl, 1H), 7.07 (d, 7.8 Hz, 1H), 7.29 (d, 7.9 Hz, 2H), 8.11 (d, 7.9 Hz, 2H).  $^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  21.91; 40.31; 56.11; 113.15; 116.28; 120.94; 122.92; 127.04; 129.38; 130.53; 137.34; 138.57; 139.12; 144.32; 151.41; 165.12.



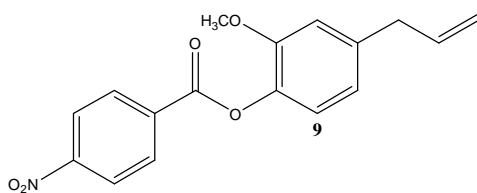
**CG-MS:** coluna capilar Rtx®-5MS,  $T_R$  14.25 min. MS  $m/z$  286 ( $M^+$ ), 123/124 (M-163, 100), 103, 95, 51.  **$^1H$  NMR** (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  3.42 (d, 6.2 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 5.10 (sl, 1H), 5.14 (dl, 1H), 6.00 (m, 1H), 6.82 (dl, 1H), 6.85 (sl, 1H), 7.07 (d, 7.8 Hz, 1H), 7.19 (tl, 2H), 8.15 (dtl, 2H).  **$^{13}C$  NMR** (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  40.30; 56.09; 113.13; 115.71; 116.00; 120.96; 122.81; 126.05, 133.15; 137.26; 138.35; 139.37; 151.29; 164.13; 164.60.



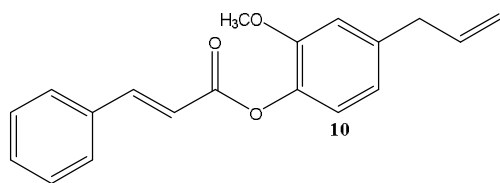
**CG-MS:** coluna capilar Rtx®-5MS,  $T_R$  15.20 min. MS  $m/z$  302 ( $M^+$ ), 139/141 (M-163, 100), 111, 91, 51.  **$^1H$  NMR** (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  3.42 (d, 6.6 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 5.07 (sl, 1H), 5.13 (dl, 1H), 6.00 (m, 1H), 6.82 (dl, 9.0 Hz, 1H), 6.85 (sl, 1H), 7.06 (d, 8.1 Hz, 1H), 7.50 (d, 8.2 Hz, 2H), 8.15 (d, 8.2 Hz, 2H).  **$^{13}C$  NMR** (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  40.30; 56.06; 113.08; 116.37; 120.94; 122.74; 128.21, 129.03; 131.85; 137.23; 138.25; 139.41; 140.09; 151.21; 164.22.



**CG-MS:** coluna capilar Rtx®-5MS,  $T_R$  15.20 min. MS  $m/z$  302 ( $M^+$ ), 139/141 (M-163, 100), 111, 91, 51.  **$^1H$  NMR** (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  3.42 (d, 6.7 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 5.10 (sl, 1H), 5.14 (dl, 7.83, 1H), 6.00 (m, 1H), 6.82 (dl, 9.2 Hz, 1H), 6.84 (sl, 1H), 7.06 (d, 7.9 Hz, 1H), 7.65 (d, 8.6 Hz, 2H), 8.08 (d, 8.6 Hz, 2H).  **$^{13}C$  NMR** (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  40.29; 56.07; 113.11; 116.37; 120.95; 122.73; 128.68, 128.77; 131.97; 137.22; 138.26; 139.43; 151.21; 164.36.

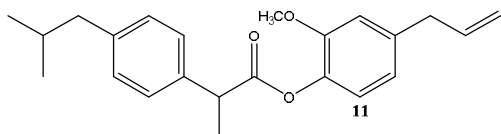


**CG-MS:** coluna capilar Rtx®-5MS,  $T_R$  16.65 min. MS  $m/z$  313 ( $M^+$ ), 150 (M-163, 100), 134, 120, 104, 92, 76, 65, 50, 41.  **$^1H$  NMR** (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  3.42 (d, 6.6 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 5.07 (sl, 1H), 5.12 (dl, 1H), 6.00 (m, 1H), 6.71 (dl, 1H), 6.84 (sl, 1H), 7.08 (d, 7.9 Hz, 1H), 8.35 (d, 8.9 Hz, 2H), 8.38 (d, 8.9 Hz, 2H).  **$^{13}C$  NMR** (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  40.30; 56.07 113.14; 116.49; 121.01; 122.54; 123.82; 130.85; 131.58; 137.12; 138.02; 139.85; 148.51; 151.03; 163.21.

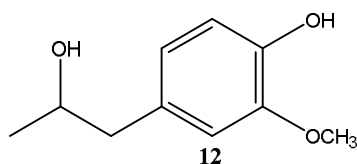


**CG-MS:** coluna capilar Rtx®-5MS,  $T_R$  16.40 min. MS  $m/z$  294 ( $M^+$ ), 131 (M-163, 100), 103, 77, 65, 51.  **$^1H$  NMR** (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  3.42 (d, 6.6 Hz, 2H), 3.85 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 5.12 (sl, 1H), 5.16 (dl, 1H), 6.00 (m, 1H), 6.82 (dl, 1H), 6.84 (sl, 1H), 7.05 (d, 7.8 Hz, 1H), 7.06 (d, 15.9 Hz, 1H), 7.43 (m, 2H), 7.43 (m, 1H), 7.59 (tl,

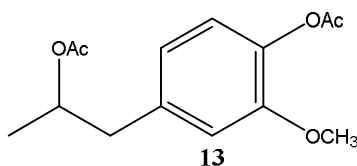
2H), 7.90 (d, 15.9 Hz, 1H).  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  40.28; 56.04; 112.99; 116.31; 117.31; 120.89; 122.82; 128.45, 129.11; 130.73; 134.49; 137.26; 138.22; 139.15; 146.58; 151.22; 165.26.



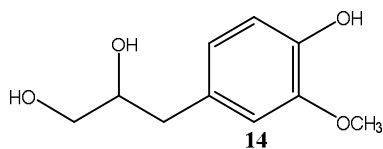
**CG-MS:** coluna capilar Rtx®-5MS,  $T_R$  16.60 min. MS  $m/z$  352 ( $M^+$ ), 161/188 (M-163, 100), 145, 117, 91, 57, 43.  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.95 (d, 6.5 Hz, 6H), 1.65 (d, 7.1 Hz, 3H), 1.91 (m, 1H), 2.50 (d, 7.1 Hz, 2H), 3.38 (d, 6.6 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.00 (q, 7.1 Hz, 1H), 5.08 (sl, 1H), 5.13 (dl, 1H), 6.00 (m, 1H), 6.72 (sl, 1H), 6.74 (dl, 1H), 6.88 (d, 7.8 Hz, 1H), 7.17 (d, 7.9 Hz, 2H), 7.32 (d, 7.9 Hz, 2H).  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  18.94; 22.58; 30.39; 40.23; 45.22; 45.28; 55.94; 113.12; 116.22; 120.82; 122.55; 127.61, 129.46; 137.31; 137.71; 138.52; 138.99; 140.74; 151.21; 173.12.



**CG-MS:** coluna capilar Rtx®-5MS,  $T_R$  12.00 min. MS  $m/z$  182 ( $M^+$ ), 137 (M-45, 100), 122, 94, 45.  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.24 (d, 6.2 Hz, 3H), 1.74 (sl, 1H, OH); 2.60 (dd, 13.6 e 5.2 Hz, 1H), 2.73 (dd, 13.6 e 4.6 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 5.68 (sl, 1H, OH); 6.69 (dl, 1H), 6.72 (sl, 1H), 6.85 (d, 7.6 Hz, 1H).  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  22.85; 45.60; 56.07; 69.14; 112.11; 114.68; 122.18; 130.48; 144.50; 146.76.

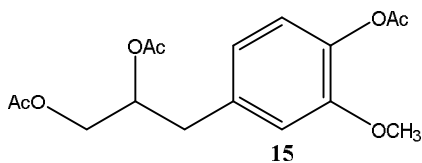


**CG-MS:** coluna capilar Rtx®-5MS,  $T_R$  13.10 min. MS  $m/z$  266 ( $M^+$ ), 164 (M-102, 100), 224, 206, 137, 122, 77, 65, 43.  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.23 (d, 6.3 Hz, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.30 (s, 3H), 2.71 (dd, 13.7 e 6.5 Hz, 1H), 2.91 (dd, 13.7 e 6.6 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 5.11 (m, 1H); 6.76 (d, 8.0 Hz, 1H), 6.80 (sl, 1H), 6.94 (d, 8.0 Hz, 1H).  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  19.65; 20.80; 21.45; 42.28; 56.05; 71.52; 113.70; 121.77; 122.69; 136.73; 138.61; 151.04; 169.29; 170.78.



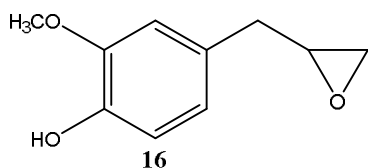
**CG-MS:** coluna capilar Rtx®-5MS,  $T_R$  13.11 min. MS  $m/z$  198 ( $M^+$ ), 137 (M-61, 100), 107, 77, 65, 39.  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2.69 (dd, 13.7 e 4.1 Hz, 1H), 2.73 (dd, 13.7 e 6.4 Hz, 1H), 3.42 (dd, 11.1 e 6.2 Hz, 1H), 3.46 (dd, 11.1 e 4.1 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.85 (m, 1H); 6.65 (dd, 8.0 e 1.8 Hz, 1H), 6.71 (d, 8.8 Hz, 1H), 6.81



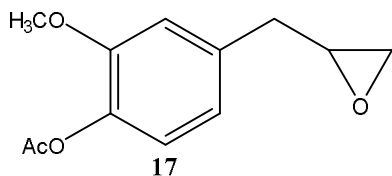


(d, 1.7 Hz, 1H).  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  40.63; 56.50; 74.79; 114.29; 116.17; 123.02; 131.67; 145.99; 148.88.

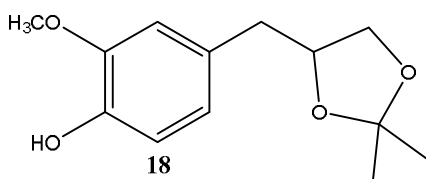
**CG-MS:** coluna capilar Rtx®-5MS,  $T_R$  14.27 min. MS  $m/z$  324 ( $M^+$ ), 222 (M-102, 100), 179, 163, 137, 124, 91, 65, 43.  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2.03 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.29 (s, 3H), 2.88 (m, 2H), 3.80 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.03 (dd, 12.0 e 6.1 Hz, 1H), 4.24 (dd, 12.0 e 3.2 Hz, 1H), 5.25 (m, 1H); 6.77 (d, 8.0 Hz, 1H), 6.81 (sl, 1H), 6.93 (d, 8.0 Hz, 1H).  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  20.78; 20.89; 21.16; 37.10; 56.02; 64.34; 72.05; 113.49; 121.64; 122.91; 135.40; 138.80; 151.17; 169.17; 170.47; 170.81.



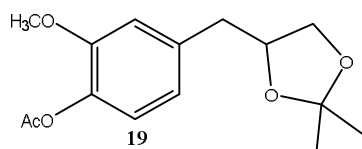
**CG-MS:** coluna capilar Rtx®-5MS,  $T_R$  12.40 min. MS  $m/z$  180 ( $M^+$ ), 137 (M-43, 100), 165, 151, 122, 107, 91, 77, 65, 51.  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2.80 (dl, 5.0 Hz, 2H), 2.81 (dl, 5.0 Hz, 2H), 3.13 (m, 1H), 3.89 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 5.66 (sl, 1H, OH); 6.74 (dl, 8.0 Hz, 1H), 6.76 (sl, 1H), 6.86 (d, 7.9 Hz, 1H).  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  38.54; 46.96; 52.87; 56.10; 111.84; 114.59; 121.84; 129.21; 144.64; 146.73.



**CG-MS:** coluna capilar Rtx®-5MS,  $T_R$  13.30 min. MS  $m/z$  222 ( $M^+$ ), 180 (M-42, 100), 162, 124, 91, 77, 43.  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.94 (t, 3H) 1.41 (m, 2H), 1.76 (m, 2H), 2.57 (t, 2H), 3.38 (d, 6.6 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 5.08 (dd, 1H), 5.14 (dd, 1H), 5.90-6.04 (m, 1H), 6.77 (dd, 1H), 6.79 (d, 1H), 6.94 (d, 8.0 Hz, 1H).  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  14.10; 22.50; 24.94; 31.42; 34.22; 40.27; 55.98; 112.96; 116.27; 120.86; 122.73; 137.29; 138.34; 139.02; 151.13; 172.22.



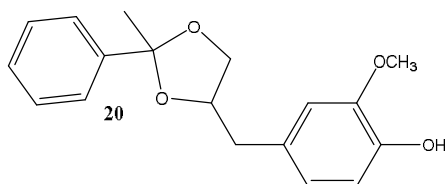
**CG-MS:** coluna capilar Rtx®-5MS,  $T_R$  13.20 min. MS  $m/z$  238 ( $M^+$ ), 101 (M-137, 100), 223, 163, 147, 137, 122, 94, 73, 59, 43.  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.36 (s, 3H), 1.44 (s, 3H), 2.71 (dd, 13.7 e 7.2 Hz, 1H), 2.93 (dd, 13.7 e 5.9 Hz, 1H), 3.65 (m, 1H), 3.95 (tl, 1H), 3.87 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.28 (m, 1H); 6.68 (dl, 8.1 Hz, 1H), 6.72 (sl, 1H), 6.83 (d, 7.9 Hz, 1H).  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  25.88; 27.18; 39.83; 56.05; 69.07; 77.02; 109.30; 111.99; 114.59; 121.99; 129.52; 144.49; 146.64.



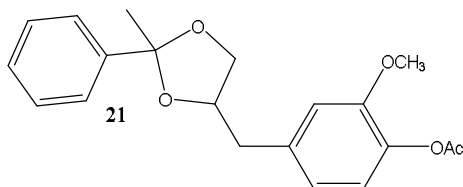
**CG-MS:** coluna capilar Rtx®-5MS,  $T_R$  13.20 min. MS  $m/z$  280 ( $M^+$ ), 101 (M-179, 100), 265, 163, 137, 122, 91, 73, 59, 43.  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.94 (t, 3H) 1.41 (m, 2H), 1.76 (m, 2H), 2.57 (t, 2H), 3.38 (d, 6.6 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 5.08 (dd, 1H), 5.14 (dd,

---

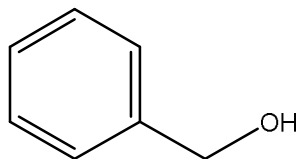
1H), 5.90-6.04 (m, 1H), 6.77 (dd, 1H), 6.79 (d, 1H), 6.94 (d, 8.0Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 14.10; 22.50; 24.94; 31.42; 34.22; 40.27; 55.98; 112.96; 116.27; 120.86; 122.73; 137.29; 138.34; 139.02; 151.13; 172.22.



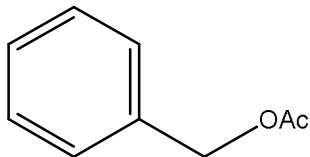
**CG-MS:** coluna capilar Rtx®-5MS, T<sub>R</sub> 15.90 min. MS m/z 286 (M<sup>+</sup>), 91 (M-195, 100), 164, 149, 137, 122, 105, 77, 65, 51. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,94 (t, 3H) 1.41 (m, 2H), 1.76 (m, 2H), 2.57 (t, 2H), 3.38 (d, 6.6 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 5.08 (dd, 1H), 5.14 (dd, 1H), 5.90-6.04 (m, 1H), 6.77 (dd, 1H), 6.79 (d, 1H), 6.94 (d, 8.0Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 14.10; 22.50; 24.94; 31.42; 34.22; 40.27; 55.98; 112.96; 116.27; 120.86; 122.73; 137.29; 138.34; 139.02; 151.13; 172.22.



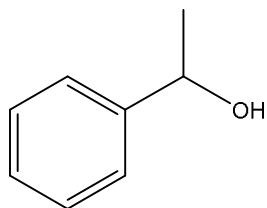
**CG-EM;** Tr = 16,00 min-coluna Rtx®-5MS



**CG-EM;** Tr = 7,60 min-coluna Rtx®-5MS

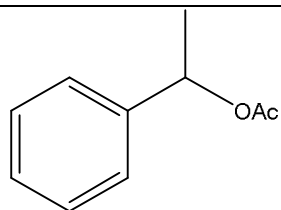


**CG-DIC;** Tr = 7,11 min-coluna Rtx®-5MS

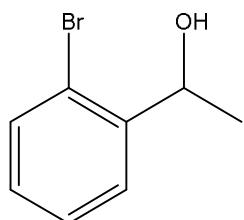


**CG-DIC;** Tr = 7,80 e 8,11 min- coluna Chirasil-Dex CB

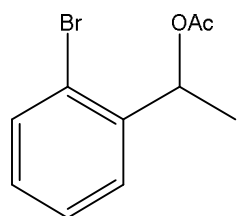
---



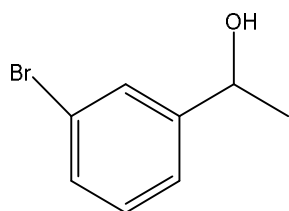
CG-EM; Tr = 6,30 e 6,70min- colona Chirasil-Dex CB



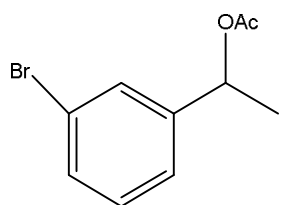
CLAE; Tr= 7,30 e 10min-coluna OB-H,  
hexano/isopropanol (5%), 0,5ml/min.



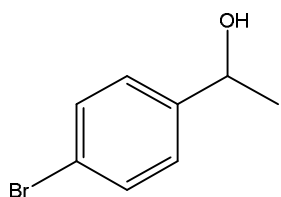
CLAE; Tr= 6,30- colona OB-H, hexano/isopropanol  
(5%), 0,5ml/min



CG-EM; Tr= 11, 9min-colona Rtx®-5MS

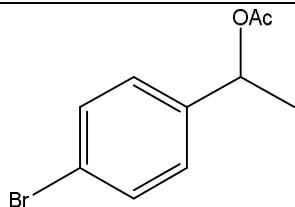


CG-EM; Tr= 11, 9min-colona Rtx®-5MS

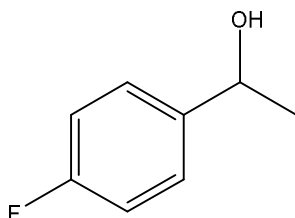


CLAE; Tr= 8,00 e 9,40 min-coluna OB-H,  
hexano/isopropanol (5%), 0,5ml/min.

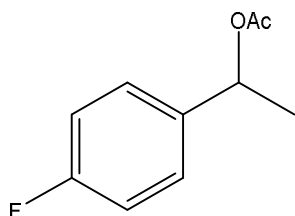
---



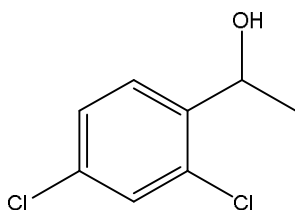
CLAE; Tr= 6,80 e 8,20 min-coluna OB-H,  
hexano/isopropanol (5%), 0,5ml/min



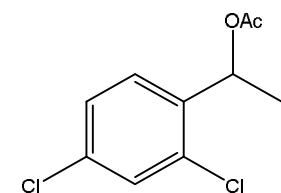
CLAE; Tr= 9,20 e 10,20 min-coluna OB-H,  
hexano/isopropanol (2%), 0,8ml/min.



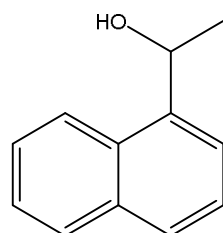
CLAE; Tr= 5,33 e 5,33 min-coluna OB-H,  
hexano/isopropanol (2%), 0,8ml/min.



CG-DIC; Tr= 14,50 e 14,80min- coluna Chirasil-Dex CB

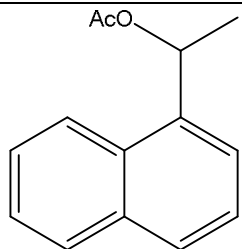


CG-DIC; Tr= 12,80 e 12,90min- coluna Chirasil-Dex CB

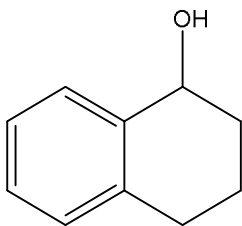


CLAE; Tr= 5,33 e 5,33 min-coluna OB-H,  
hexano/isopropanol (2%), 0,8ml/min.

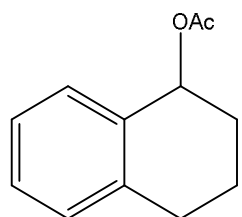
---



CLAE; Tr = 6,33min -coluna OB-H, hexano/isopropanol (2%), 0,5 ml/min.



CLAE; Tr = 8,30 e 13,60 min -coluna AS-H, hexano/isopropanol (25%), 1,0 ml/min.



CLAE; Tr = 4,33min -coluna OB-H, hexano/isopropanol (5%), 0,5 ml/min.

Fonte: dados da pesquisa

## 7.6 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-EM) E CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A DETECTOR DE IONIZAÇÃO EM CHAMA (CG-DIC)

**CG-EM:** As análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM) foram efetuadas em aparelho Shimadzu GC/MS, modelo QP2010SE Plus usando coluna capilar Rtx®-5MS (95% dimetilpolisiloxano e 5% difenil) de 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,1 µm de espessura do filme da fase fixa; as temperaturas do injetor e do detector foram 240 e 280 °C, respectivamente; condições da coluna: 60 °C para 80 °C a 5 °C min<sup>-1</sup>, permanecendo por 3 minutos; então de 80 °C min<sup>-1</sup> até 280 °C a 30 °C min<sup>-1</sup> permanecendo nesta temperatura por 10 minutos, usando He como gás de arraste com vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. A análise com o detector de massa foi no modo *scan* com tempo de análise em 23,67 min.; o registro dos espectros de massa foi na faixa de 35 a 500 Daltons por impacto de

elétrons (EMIE) com energia de ionização de 70 eV (voltagem de 1,5 KV), analisador do tipo quadrupolo e fonte de íons a 240 °C.

**CG-DIC:** No cálculo dos excessos enantioméricos foi utilizado cromatógrafo gasoso acoplado com detector de ionização em chama (CG/DIC), Shimadzu GC-2010 equipado com um autoinjeter AOC-20i e uma coluna capilar quiral de ciclodextrina (CP-Chirasil-Dex CB 25 m x 0,25 mm x 0,25 µm) utilizando hélio como gás de arraste com fluxo de 1,2 mL min<sup>-1</sup> no modo *split*; as temperaturas do injetor e do detector foram 200 e 220 °C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada em 80 °C por 7 min, depois 10 °C min<sup>-1</sup> até 120 °C e, então, em 6 °C min<sup>-1</sup> a partir de 120 até 200 °C. O tempo total de análise foi de 24,33 min. Os excessos enantioméricos (*ee*) foram determinados por CG/DIC, mais precisamente através das áreas dos picos observados para cada álcool conforme a equação abaixo.

$$ee = \frac{A-a}{A+a} \times 100$$

Onde:

A = área do enantiômero em maior quantidade

a = área do enantiômero em menor quantidade

*ee* = excesso enantiomérico

## 7.7 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO E CARBONO (RMN <sup>1</sup>H)

Outra técnica utilizada para determinação do teor de conversão das biotransformações realizadas foi a Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os espectros de RMN <sup>1</sup>H foram obtidos no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de Ceará (CENAUREMN/UFC), utilizando-se Espectrômetros da Bruker, modelo Avance DPX –300 e modelo Avance DRX-500, que operam na frequência de 300,15 e 499,6 MHz para hidrogênio, respectivamente. A dissolução das amostras analisadas foi realizada utilizando clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) como solvente.

## 7.8 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (IV)

A espectrometria na região do infravermelho (IV) foi utilizada para caracterização dos álcoois e acetatos obtidos por via química. Os espectros de IV foram obtidos utilizando espectrômetro Perkin Elmer, modelo (SPECTRUM 100) FT-IR. Nas análises foi utilizado um filme de KBr para substâncias líquidas e solúveis em clorofórmio.

## 7.9 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS)

As medidas de absorbância na região do ultravioleta-visível foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro modelo 600 S da FEMTO. As leituras foram realizadas no comprimento de onda determinado para cada análise, todas em triplicata.

## 7.10 SÍNTESE DOS DERIVADOS DO EUGENOL

**Acetato de 4-alil-2-metóxfenila (1):** 2 mmol (328mg) do eugenol foram dissolvidos junto com 3mmol (306 mg) de anidrido acético, em 1mL de piridina, sob agitação e a temperatura ambiente. As reações foram acompanhadas por CCD, utilizando como eluente uma mistura binária de hexano/acetato de etila 80:20, até a completa acetilação do fenol. Em seguida, foram adicionados 20mL de acetato de etila P.A. ao meio reacional, que foi então particionado com uma solução aquosa 20% (m/v) de Sulfato de Cobre II pentaidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) (3x20mL), em seguida a fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) (3x10mL) e por fim, seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

**Butirato de 4-alil-2-metóxfenila (2):** 4 mmol (656mg) do eugenol foram dissolvidos junto com 6mmol (948 mg) de anidrido butanóico, em 2mL de piridina, sob agitação e a temperatura ambiente. As reações foram acompanhadas por CCD, utilizando como eluente uma mistura binária de hexano/acetato de etila 80:20, até a completa acilação do fenol. Em seguida, foram adicionados 20mL de acetato de etila P.A. ao meio reacional, que foi então particionado com uma solução aquosa 20% (m/v) de Sulfato de Cobre II pentaidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) (3x20mL), em seguida a fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) (3x10mL) e por fim, seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

**Hexanoato de 4-alil-2-metóxfenila (3):** 4 mmol (656mg) do eugenol foram dissolvidos junto com 6mmol (1284 mg) de anidrido hexanóico, em 2mL de piridina, sob agitação e a temperatura ambiente. As reações foram acompanhadas por CCD, utilizando como eluente uma mistura binária de hexano/acetato de etila 80:20, até a completa acilação do fenol. Em seguida, foram adicionados 20mL de acetato de etila P.A ao meio reacional, que foi então particionado com uma solução aquosa 20% (m/v) de Sulfato de Cobre II pentaidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) (3x20mL), em seguida a fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) (3x10mL) e por fim, seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

**Benzoato de 4-alil-2-metóxfenila (3):** 3 mmol (366 mg) do ácido benzóico foi adicionado a 5mL de diclorometano (DCM) junto com 50mg de dimetilaminopiridina (DMAP) seguido da adição de 3mmol (618 mg) de dicicloehilcarboimida (DCC). A reação permaneceu sob agitação por 24h a temperatura ambiente. Em seguida a reação foi filtrada a vácuo e a fase líquida lavada com 3x5ml com solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) a 5% (m/v). Logo após a fase orgânica foi lavada com 3x5mL com solução de bicarbonato de sódio a 5% (m/v) seguido da lavagem com água destilada (3x5mL). A fase orgânica foi então seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

**4-metilbenzoato de 4-alil-2-metóxfenila (4):** 3 mmol (432 mg) do ácido 4-metilbenzóico foi adicionado a 5mL de diclorometano (DCM) junto com 50mg de dimetilaminopiridina (DMAP) seguido da adição de 3mmol (618 mg) de dicicloehilcarboimida (DCC). A reação permaneceu sob agitação por 24h a temperatura ambiente. Em seguida a reação foi filtrada a vácuo e a fase líquida lavada com 3x5ml com solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) a 5% (m/v). Logo após a fase orgânica foi lavada com 3x5mL com solução de bicarbonato de sódio a 5% (m/v) seguido da lavagem com água destilada (3x5mL). A fase orgânica foi então seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

**4-flúorobenzoato de 4-alil-2-metóxfenila (6):** 3 mmol (420 mg) do ácido 4-flúorobenzóico foi adicionado a 5mL de diclorometano (DCM) junto com 50mg de dimetilaminopiridina (DMAP) seguido da adição de 3mmol (618 mg) de dicicloehilcarboimida (DCC). A reação permaneceu sob agitação por 24h a temperatura ambiente. Em seguida a reação foi filtrada a vácuo e a fase líquida lavada com 3x5ml com solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) a 5% (m/v). Logo após a fase orgânica foi lavada com 3x5mL com solução de bicarbonato de sódio a 5% (m/v) seguido da lavagem com água destilada (3x5ml). A fase



orgânica foi então seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

**4-clorobenzoato de 4-alil-2-metóxfenila (7):** 3 mmol (469,5 mg) do ácido 4-clorobenzóico foi adicionado a 5mL de diclorometano (DCM) junto com 50mg de dimetilaminopiridina (DMAP) seguido da adição de 3mmol (618 mg) de dicicloehilcarboimida (DCC). A reação permaneceu sob agitação por 24h a temperatura ambiente. Em seguida a reação foi filtrada a vácuo e a fase líquida lavada com 3x5ml com solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) a 5% (m/v). Logo após a fase orgânica foi lavada com 3x5mL com solução de bicarbonato de sódio a 5% (m/v) seguido da lavagem com água destilada (3x5ml). A fase orgânica foi então seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

**4-bromobenzoato de 4-alil-2-metóxfenila (8):** 3 mmol (603 mg) do ácido 4-bromobenzóico foi adicionado a 5mL de diclorometano (DCM) junto com 50mg de dimetilaminopiridina (DMAP) seguido da adição de 3mmol (618 mg) de dicicloehilcarboimida (DCC). A reação permaneceu sob agitação por 24h a temperatura ambiente. Em seguida a reação foi filtrada a vácuo e a fase líquida lavada com 3x5ml com solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) a 5% (m/v). Logo após a fase orgânica foi lavada com 3x5mL com solução de bicarbonato de sódio a 5% (m/v) seguido da lavagem com água destilada (3x5ml). A fase orgânica foi então seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

**4-nitrobenzoato de 4-alil-2-metóxfenila (9):** 3 mmol (501 mg) do ácido 4-nitrobenzóico foram adicionados a 5mL de diclorometano (DCM) junto com 50mg de dimetilaminopiridina (DMAP) seguido da adição de 3mmol (618 mg) de dicicloehilcarboimida (DCC). A reação permaneceu sob agitação por 24h a temperatura ambiente. Em seguida a reação foi filtrada a vácuo e a fase líquida lavada com 3x5ml com solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) a 5% (m/v). Logo após a fase orgânica foi lavada com 3x5mL com solução de bicarbonato de sódio a 5% (m/v) seguido da lavagem com água destilada (3x5mL). A fase orgânica foi então seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

**4-nitrobenzoato de 4-alil-2-metóxfenila (10):** 3 mmol (501 mg) do ácido 4-nitrobenzóico foi adicionado a 5mL de diclorometano (DCM) junto com 50mg de dimetilaminopiridina (DMAP) seguido da adição de 3mmol (618 mg) de dicicloehilcarboimida (DCC). A reação permaneceu sob agitação por 24h a temperatura ambiente. Em seguida a

reação foi filtrada a vácuo e a fase líquida lavada com 3x5ml com solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) a 5% (m/v). Logo após a fase orgânica foi lavada com 3x5mL com solução de bicarbonato de sódio a 5% (m/v) seguido da lavagem com água destilada (3x5ml). A fase orgânica foi então seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

**Trans-cinamato de 4-alil-2-metóxfenila (10):** 3 mmol (444 mg) do ácido transcinâmico foi adicionado a 5mL de diclorometano (DCM) junto com 50mg de dimetilaminopiridina (DMAP) seguido da adição de 3mmol (618 mg) de dicioehilcarboimida (DCC). A reação permaneceu sob agitação por 24h a temperatura ambiente. Em seguida a reação foi filtrada a vácuo e a fase líquida lavada com 3x5ml com solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) a 5% (m/v). Logo após a fase orgânica foi lavada com 3x5mL com solução de bicarbonato de sódio a 5% (m/v) seguido da lavagem com água destilada (3x5ml). A fase orgânica foi então seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

**2-(4-isopropilfenil)propanoato de 4-alil-2-metóxfenila (11):** (i) 10 comprimidos triturados contendo ibuprofeno (500mg cada) foram adicionados a 100mL de etanol permanecendo sob agitação por 3h, em seguida a suspensão foi filtrada e a solução resultante seca com sulfato de sódio e concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida, resultando no ácido 2-(4-isopropilfenil)propanoico (ibuprofeno). (ii) 3 mmol (618 mg) do ácido 2-(4-isopropilfenil)propanoico foi adicionado a 5mL de diclorometano (DCM) junto com 50mg de dimetilaminopiridina (DMAP) seguido da adição de 3mmol (618 mg) de dicioehilcarboimida (DCC). A reação permaneceu sob agitação por 24h a temperatura ambiente. Em seguida a reação foi filtrada a vácuo e a fase líquida lavada com 3x5ml com solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) a 5% (m/v). Logo após a fase orgânica foi lavada com 3x5mL com solução de bicarbonato de sódio a 5% (m/v) seguido da lavagem com água destilada (3x5ml). A fase orgânica foi então seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

**4-(2-hidroxiopropil)-2-metóxfenol (12):** 5mmol (1483 mg) do sulfato de mercúrio II ( $\text{HgSO}_4$ ) foi adicionado a 5mL de água destilada seguido de 5mL de THF. A suspensão de coloração amarela formada foi agitada vigorosamente seguido da adição de 5mmol do eugenol (820mg). O término da reação foi determinado pelo desaparecimento da coloração amarela (4h). Em seguida foi adicionado 5mL de solução aquosa de NaOH (3M) e 5mL de  $\text{NaBH}_4$  0,5 M em NaOH (3M) sob constante agitação. Após 30min, foi acrescentado NaCl até saturação da

solução. A fase aquosa foi extraída com 2x5mL de THF e as fases orgânicas foram unidas, secas com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e posteriormente purificadas através de cromatografia em coluna seguido de análise para caracterização da substância (BROWN e LYNCH, 1981).

**Acetato de 4-(2-acetoxipropil)-2-metóxfenila (13):** 1mmol (182mg) da substância 12 foi dissolvido junto com 3mmol (306mg) de anidrido acético e adicionado 1mL de piridina, sob agitação e a temperatura ambiente. As reações foram acompanhadas por CCD, utilizando como eluente uma mistura binária de hexano/acetato de etila 70:30, até a completa acetilação dos alcoóis. Em seguida, foram adicionados 20mL de acetato de etila P.A ao meio reacional, que foi então particionado (3x5ml) com uma solução aquosa a 20% (m/V) de Sulfato de Cobre II Pentaidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Em seguida a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, evaporada sob pressão reduzida e posteriormente caracterizada.

**3-(4-hidroxi-3-metóxfenil)propano-1,2-diol (14):** 5mmol (820mg) do eugenol foi adicionado sob banho de gelo a 7,5mL de acetonitrila (MeCN) seguido da adição de 7,5mL de solução aquosa a 2M de carbonato de potássio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) e  $4 \cdot 10^{-4}\text{M}$  de EDTA. Em seguida foi adicionado sob agitação magnética 2mL de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a 30%. A mistura foi mantida sob agitação magnética vigorosa e a temperatura de  $0^\circ\text{C}$  por 6h. Passado o tempo de reação, foi adicionado 5mL de acetato de etila a mistura reacional e a fase orgânica separada, a fase aquosa foi extraída com mais 3x20ml de acetato de etila e as fases orgânicas unidas e extraídas com 2x5mL com solução de tiosulfato de sódio 1M e 10mL de solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrada em evaporador rotativo. A 2mmol (360mg) do produto resultante da reação foi adicionado 10mL de solução aquosa de NaOH 20% (m/V) e a mistura mantida a  $80^\circ\text{C}$  por 2h. A reação foi então resfriada até a temperatura ambiente (aproximadamente  $28^\circ\text{C}$ ) e então neutralizada com solução de HCl (10%) até pH 7. A água do meio foi retirada sob pressão reduzida e massa resultante foi extraída com 5x10mL de etanol anidro. A solução resultante foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida. O produto foi então purificado por cromatografia de adsorção e posteriormente caracterizado (WANG, SHU, *et al.*, 2003).

**3-(4-acetoxi-3-metóxfenil)propano-1,2-diacetoxi (15):** 1mmol (198mg) da substância 14 foi dissolvido junto com 10mmol (1020mg) de anidrido acético e adicionado 3mL de piridina, sob agitação e a temperatura ambiente. As reações foram acompanhadas por CCD, utilizando como eluente uma mistura binária de hexano/acetato de etila 70:30, até a completa acetilação dos álcoois e fenol. Em seguida, foram adicionados 20mL de acetato de

etila P.A ao meio reacional, que foi então particionado (3x5ml) com uma solução aquosa a 20% (m/V) de Sulfato de Cobre II Pentaidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Em seguida a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, evaporada sob pressão reduzida e posteriormente caracterizada.

**2-metóxi-(4-oxiran-2-ilmetil)fenol (16):** 5mmol (820mg) do eugenol foi adicionado sob banho de gelo a 7,5mL de acetonitrila (MeCN) seguido da adição de 7,5mL de solução aquosa a 2M de carbonato de potássio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) e  $4 \cdot 10^{-4}\text{M}$  de EDTA. Em seguida foi adicionado sob agitação magnética 2mL de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a 30%. A mistura foi mantida sob agitação magnética vigorosa e a temperatura de  $0^\circ\text{C}$  por 6h. Passado o tempo de reação, foi adicionado 5mL de acetato de etila a mistura reacional e a fase orgânica separada, a fase aquosa foi extraída com mais 3x20ml de acetato de etila e as fases orgânicas unidas e extraídas com 2x5mL com solução de tiosulfato de sódio 1M e 10mL de solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrada em evaporador rotativo e o produto posteriormente caracterizado.

**Acetato de 2-metóxi-(4-oxiran-2-ilmetil)fenila (17):** 1mmol (180mg) da substância 16 foi dissolvido junto com 3mmol (306mg) de anidrido acético e adicionado 0,5mL de piridina, sob agitação e banho de gelo (aproximadamente  $2^\circ\text{C}$ ). As reações foram acompanhadas por CCD, utilizando como eluente uma mistura binária de hexano/acetato de etila 80:20, até a completa acetilação do fenol. Em seguida, foram adicionados 20mL de acetato de etila P.A ao meio reacional, que foi então particionado (3x5ml) com uma solução aquosa a 20% (m/V) de Sulfato de Cobre II Pentaidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Em seguida a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, evaporada sob pressão reduzida e posteriormente caracterizada.

**4-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-metóxiifenol (18):** A uma solução de cloreto de zinco (0,634g, 4,95 mmol) em 5 mL de acetona, adicionou-se a substância 14 (396mg, 2 mmol), sob agitação a  $0^\circ\text{C}$  por 10h min e à temperatura ambiente durante 24 h. Para tratamento usual, adicionaram-se 5 mL de clorofórmio e 5 mL de solução saturada de cloreto de sódio. A fase aquosa foi extraída com 3 x 5 mL de clorofórmio, a fase orgânica foi lavada com 2 x 5 mL de solução de hidróxido de amônio 5% (v/v) e tratada com sulfato de sódio. O solvente foi eliminado a vácuo em evaporador rotativo. Em seguida, ao resíduo foi adicionado éter de petróleo e aquecido até ebulição por 30 min. O diol 14 não reagido foi removido por filtração a quente e o produto 18 obtido após evaporação do éter em evaporador rotativo (CITÓ, ARAÚJO, *et al.*, 2009).

**Acetato de 4-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-metóxiifenila (19):** 1mmol (204mg) da substância 18 foi dissolvido junto com 3mmol (306mg) de anidrido acético e

adicionado 0,5mL de piridina, sob agitação a temperatura ambiente. As reações foram acompanhadas por CCD, utilizando como eluente uma mistura binária de hexano/acetato de etila 80:20, até a completa acetilação do fenol. Em seguida, foram adicionados 20mL de acetato de etila P.A ao meio reacional, que foi então particionado (3x5ml) com uma solução aquosa a 20% (m/V) de Sulfato de Cobre II Pentaidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Em seguida a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, evaporada sob pressão reduzida e posteriormente caracterizada.

**4-((2-metil-2-fenil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-metóxfenol (20):** A uma solução de cloreto de zinco (0,634g, 4,95 mmol) em 5 mL de benzaldeído, adicionou-se a substância 14 (396mg, 2 mmol), sob agitação a 0 °C por 10h min e à temperatura ambiente durante 24 h. Em seguida adicionaram-se 5 mL de clorofórmio e 5 mL de solução saturada de cloreto de sódio. A fase aquosa foi extraída com 3 x 5 mL de clorofórmio, a fase orgânica foi lavada com 2 x 5 mL de solução de hidróxido de amônio 5% (v/v) e tratada com sulfato de sódio. O solvente foi eliminado a vácuo em evaporador rotativo. Em seguida, ao resíduo foi adicionado éter de petróleo e aquecido até ebulição por 30 min. O diol 14 não reagido foi removido por filtração a quente e o produto 20 obtido após evaporação do éter em evaporador rotativo e purificação em cromatografia em coluna (CITÓ, ARAÚJO, *et al.*, 2009).

**Acetato de 4-((2-metil-2-fenil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-metóxfenila (21):** 1mmol (266mg) da substância 20 foi dissolvida junto com 3mmol (306mg) de anidrido acético e adicionado 0,5mL de piridina, sob agitação a temperatura ambiente. As reações foram acompanhadas por CCD, utilizando como eluente uma mistura binária de hexano/acetato de etila 80:20, até a completa acetilação do fenol. Em seguida, foram adicionados 20mL de acetato de etila P.A ao meio reacional, que foi então particionado (3x5ml) com uma solução aquosa a 20% (m/V) de Sulfato de Cobre II Pentaidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Em seguida a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, evaporada sob pressão reduzida e posteriormente caracterizada.

## 7.11 PREPARAÇÃO DO BIOCATALISADOR

Após a coleta das frutas no comércio local de Fortaleza-CE entre o período de 11/2015 a 11/2016, estas foram lavadas com água destilada e posteriormente colocadas durante 20min em solução de hipoclorito de sódio a 5%. Depois deste período, as cascas das laranjas foram lavadas várias vezes com água destilada, para a completa retirada do hipoclorito de sódio, e

colocadas a temperatura ambiente por cerca de 2 horas para secagem. Decorrido este período as cascas foram trituradas em ralador manual de 1mm seguido da adição de hexano (5x massa de casca utilizada) e mantido sob agitação a 200rpm por 3h. Após este período as cascas foram separadas da fase orgânica e colocadas para secar a temperatura ambiente. Em seguida acetona foi adicionada (5x massa de casca utilizada) e submetida a agitação por 2h. Na sequência as cascas foram separadas por filtração, secas a temperatura ambiente e denominadas de Casca da Laranja Desidratada (CLD) (Avelar et al., 2013).

#### 7.12 OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA DA LARANJA (EACL)

O extrato aquoso da CLD foi obtido a partir da adição de 10g de CLD em 100mL de água destilada sob agitação a 225rpm por 24h. Em seguida as cascas separadas por filtração e a fase líquida resfriada a 4°C e submetida a centrifugação a 3500rpm por 10min. O sobrenadante resultante foi denominado de extrato aquoso da casca da laranja (EACL) (BUGG, LEWIN e CATLIN, 1997).

#### 7.13 PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS PRESENTES NO EXTRATO DA CASCA DA LARANJA IMOBILIZADO (ECLI).

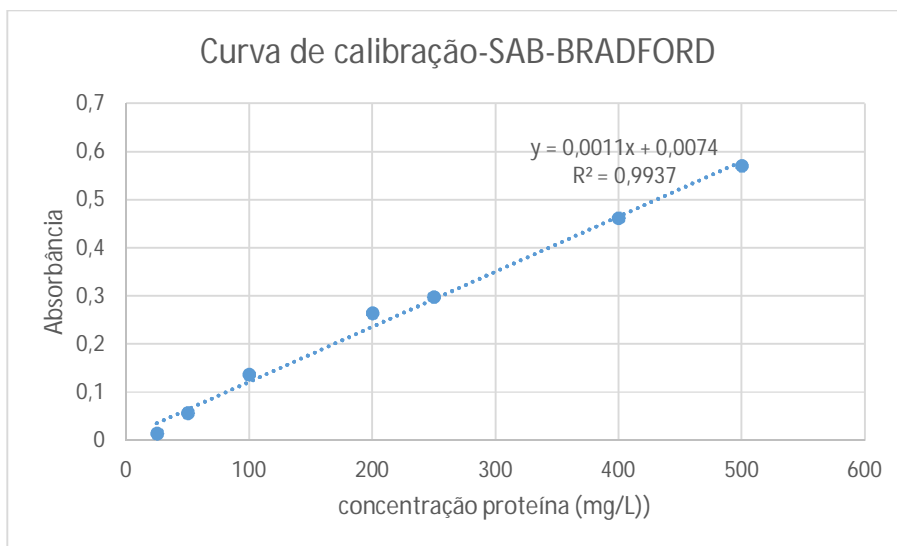
A massa de 1,5g de alginato de sódio foi adicionado a 100ml do extrato aquoso da casca da laranja (EACL) e colocado sob agitação até a formação de uma mistura homogênea. Esta solução foi gotejada com o auxílio de uma pipeta em 300ml de uma solução aquosa de  $\text{CaCl}_2$  (1,5% m/V) para formação das esferas contendo as enzimas imobilizadas. O sobrenadante resultante do processo de imobilização (fase líquida) foi coletado e denominado de fase líquida do processo de imobilização (FLPI). As esferas formadas ficaram 24h submergida na solução de  $\text{CaCl}_2$  e então foram filtradas, lavadas com 100ml de água destilada corrente e colocadas a temperatura ambiente por 3h para remoção do excesso de água e logo após colocadas em estufa a 40°C por 24h (OZYILMAZ e GEZER, 2010).

#### 7.14 MÉTODO PARA DETERMINAR O TEOR DE PROTEÍNAS

O reagente de Bradford foi preparado pela dissolução de 50mg do corante “Coomassie brilliant blue” BG-250 (fabricante: Sigma) em 25 mL de etanol seguida da adição de 50mL de ácido fosfórico 85%. Esta mistura foi transferida para um balão volumétrico de 500mL e seu volume completado com água destilada. A solução final foi guardada em refrigerador a temperatura de aproximadamente 2°C.

Para a determinação da quantidade de proteína no extrato aquoso da casca da laranja (EACL) e da fase líquida do processo de imobilização (FLPI) foi adotado o seguinte procedimento: 0,1mL do EACL/ FLPI foi misturado a 2,5mL do reagente de Bradford e, após 2 minutos, foi realizada a leitura desta amostra em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595nm, usando Soro Albumina Bovina SAB) como padrão de proteína da curva de calibração (Figura 133). Foi feito também um controle, constando este de 0,1mL de água destilada e 2,5mL do reagente de Bradford. O procedimento foi realizado em duplicata (BRADFORD, 1976).

**Figura 133-** Curva de calibração da SAB método de Bradford



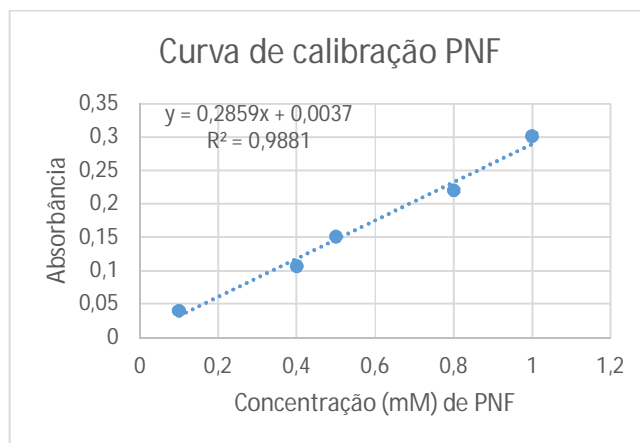
Fonte: Elaborado pelo autor

#### 7.15 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DO ECLI

A atividade hidrolítica das cascas da laranja através da hidrólise do éster acetato de p-nitrofenol (5mM) em acetonitrila/água (95:5). 1g de CLD ou 200mg (EI) foi adicionado a 10ml

do substrato (acetato de p-nitrofenol) por 2h. O teor de p-nitrofenol foi determinado através de curva de calibração (Figura 134) em espectrofotômetro a 410nm. uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de biocatalisador (g) necessária para liberar 1 $\mu$ mol de p-nitrofenol por minuto (Guajardo et al. 2015).

**Figura 134-** Curva de calibração do para-nitrofenol



Fonte: Elaborado pelo autor

## 7.16 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE DISCO DIFUSÃO

A atividade antibacteriana dos derivados do eugenol foi realizada inicialmente pela técnica de disco difusão que consiste em medir a zona de inibição formada em torno da substância avaliada.

### 7.16.1 Preparação do meio de cultura

O meio Ágar Mueller- Hinton é um meio sólido padronizado, recomendado para a realização de testes antimicrobianos. O mesmo foi preparado seguindo a metodologia de padronização Kirby e Bauer, 1996, e pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Foi medido a massa de 35 g de meio de cultura para 1 L de água destilada, em seguida adicionado em um erlenmeyer de 1L. Para a homogeneização do meio de cultura, colocou-se o mesmo em banho maria até a diluição do sólido e ao término do procedimento, o meio foi autoclavado. Em seguida foi colocado em placas de petri (50 ml do meio) e posto na geladeira envolto de papel filme para conservação.



### 7.16.2 Preparação e atividade antibacteriana

Foram utilizadas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas para o experimento, ambas preparadas seguindo o manual para atividade ANTIBIOGRAMA de Kirby; Bauer, 1996. Para a replicação das bactérias o meio de cultura já preparado, foi retirado da geladeira 20 minutos antes para obter temperatura ambiente e evitar qualquer dano nas bactérias. Com o auxílio de um swab, as bactérias foram retiradas das cepas e aplicadas suavemente sobre o meio de cultura, logo após, levadas à estufa de modelo 502 FANEM por um período de 24 horas a uma temperatura de 35°C.

Ao passar o período de 24 horas iniciou-se o teste bacteriológico, em que as mesmas foram retiradas das placas com auxílio de uma alça em platina devidamente flambada e resfriada. Em seguida, transferidas para um tubo de ensaio contendo solução salina (NaCl 0,85%) para diluição até atingir entre 0,08 e 1 em espectrofotômetro à 625 nm. Ao fim deste processo, embebeu-se um swab na suspensão bacteriana comprimindo-o no próprio tubo de ensaio para evitar o excesso de material, aplicou-se em movimentos uniformes sobre o meio de cultura até que toda superfície fosse preenchida. Após a secagem do meio, foram aplicados discos contendo amostras em concentrações de 20µL, juntamente com o controle positivo (amicacina-30mcg), e como solvente o DMSO em concentração de (100mg/ml).

As placas com os discos já aplicados, foram levadas à estufa bacteriológica por 24 e 48 horas para posterior análise dos resultados (NCCLS, 2003).

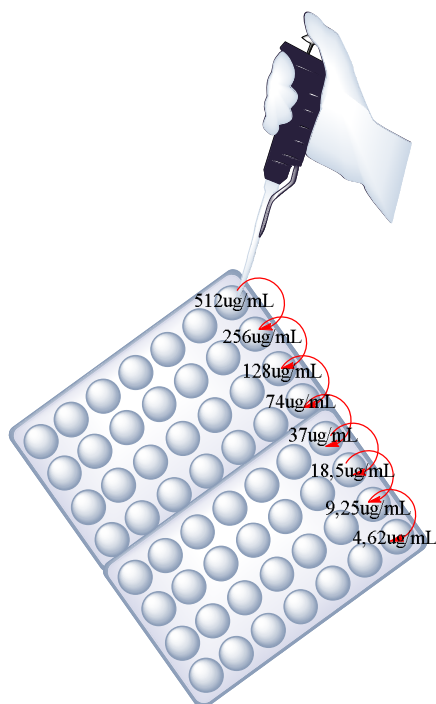
### 7.17 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI) DOS DERIVADOS DO EUGENOL.

A atividade antibacteriana dos derivados do eugenol foi determinada pelo método da microdiluição recomendado Comitê Nacional de Padrão Clínico Laboratorial. M7-A6. Para as análises foram usadas cepas bacteriológicas gram (+) e gram (-), sendo verificada o potencial antimicrobiano em: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*. A cultura bacteriana foi replicada em caldo Muller Hilton (CMH) por 24h a 35°C±2°C. Em seguida o inóculo bacteriano foi diluído em CMH para uma concentração de células de aproximadamente 1x10<sup>8</sup> NTU (escala Mcfarland). Essa suspensão foi novamente diluída em solução salina (NaCl, 0,85%) com 10% de CMH para uma concentração final de 1x 10<sup>6</sup> NTU. O volume de 100uL dessa suspensão

foi adicionada nos poços das microplacas resultando em uma concentração final do inóculo de  $5 \times 10^5$  NTU.

A solução inicial das substâncias foi composta de 10mg da substância a ser analisada diluída em 1ml de dimetissulfóxido (DMSO). Essa solução foi diluída em água para obtenção da solução estoque com concentração de 1000ug/mL. Em seguida foi realizado a diluição seriada em microplaca adicionando 100uL da solução estoque inicial no primeiro poço e após homogeneização o mesmo volume para o poço seguinte resultando em concentração entre 4-512ug/mL como representado na Figura 135. A presença de células bacterianas ativas foi verificada pelo método colorimétrico através da adição de 25uL de solução aquosa de resazurina (0,01% m/V) em cada poço da microplaca. Após incubação em estufa por 2h a concentração mínima inibitória foi definida como a menor concentração da substância capaz de inibir o crescimento bacteriano (indicado pela mudança de coloração do azul para o vermelho na presença de células bacterianas vivas).

**Figura 135-** Representação esquemática da diluição seriada efetuada

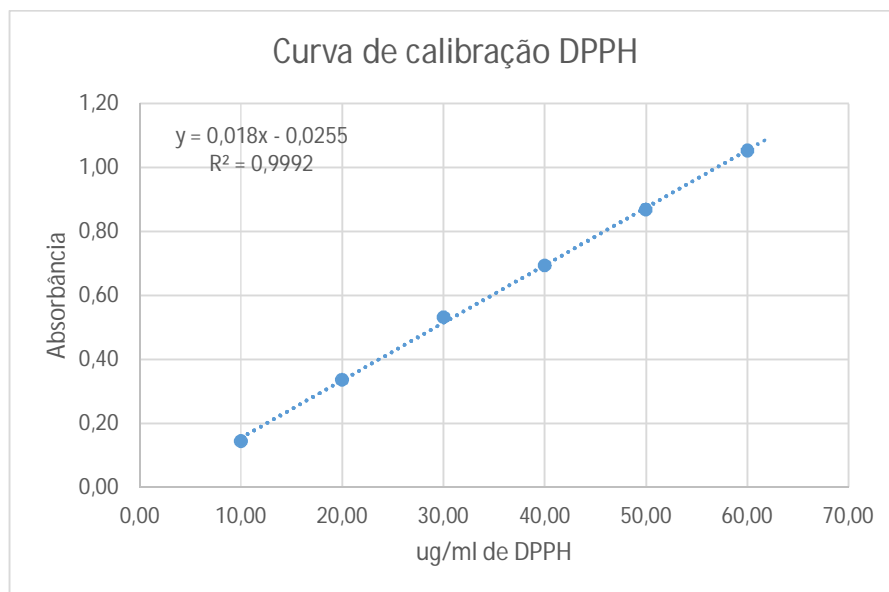


Fonte: Elaborado pelo autor

### 7.18 avaliação da capacidade antioxidante

Os testes para verificar a atividade antioxidante e encontrar a IC50 (Concentração que inibe 50% dos radicais) das frações foram realizados com uma solução de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), onde a mesma foi feita com 1,3mg de DPPH dissolvida em 50mL de metanol ( $6,6 \times 10^{-2}$ mM) e feita sua curva de calibração, figura 136, nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50 e 60ug/ml. Foram feitas diferentes concentrações (10, 20, 30, 50, 70 e 100ug/ml) com os derivados diluídos em metanol e adicionado 1ml da solução da amostra de cada concentração preparada a 1mL da solução de DPPH. As análises foram feitas em triplicata e após 30 minutos foram realizadas as leituras no espectrofotômetro a 520 nm (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). Outro procedimento da mesma forma foi feito com o TROLOX, padrão positivo que foi utilizado para controle e metanol foi utilizado como controle negativo.

**Figura 136-** Curva de calibração do DPPH.



Fonte: Elaborado pelo autor

## 8. CONCLUSÕES

Com o presente trabalho foi possível a síntese, purificação e caracterização de 20 derivados do eugenol por via química clássica, abordando modificações estruturais tanto no grupo hidróxi (-OH) da molécula, formando ésteres diversos, assim como modificações na dupla ligação do grupo alila, resultando em álcoois, epóxido e cetais.

O estudo do potencial antibacteriano desses derivados evidenciou que as modificações moleculares empreendidas na molécula do eugenol resultou em substâncias com potencial de uso bastante promissor sendo possível a ampliação do espectro de ação do eugenol, uma vez que alguns derivados foram capazes de inibir a replicação de estirpes bacterianas que o próprio eugenol não apresentou atividade. Também destaca-se que em alguns casos houve amplificação do efeito antibacteriano dos derivados quando comparado com o eugenol, fazendo com que em alguns casos a sensibilidade de determinadas estirpes bacterianas fossem superiores para os derivados do que para o eugenol.

A análise da capacidade antioxidante dos derivados revelou uma forte dependência do grupo hidróxi do fenol para obtenção de uma boa atividade antioxidante, o que evidencia que o grupo -OH está diretamente relacionado com a transferência de elétrons e por conseguinte com a inibição e/ou retardamento do processo de propagação radicalar, estes, diretamente relacionados com processos oxidativos indesejáveis. Já a modificação química na dupla ligação, apesar de reduzir a capacidade antioxidante dos derivados quando comparado com o eugenol, ainda mantém um potencial de captura de radicais semelhante a padrões como trolox.

Quanto aos processos biocatalíticos foi possível perceber uma boa capacidade do uso do extrato da casca da laranja imobilizado em alginato de cálcio em reações de hidrólise e esterificação. Sendo que nas reações de hidrólise foi possível verificar uma leve degradação do suporte após de três dias de reação.

Já na reação de esterificação não foi observado comprometimento do suporte além de ter sido possível verificar a capacidade reuso e armazenamento do biocatalisador ora empregado. O uso dos processos catalisados pelo ECLI permitiu amplificar o número de derivados do eugenol obtidos, uma vez que, o biocatalisador revelou-se bastante seletivo, acetilando especificamente grupos hidróxi de álcoois e mantendo os grupos fenólicos livres nas reações de esterificação. Essas reações também se mostraram promissoras na obtenção de álcoois aromáticos primários e secundários, contudo, mostrando limitações para álcoois cíclicos.

## REFERÊNCIAS

- ABBASZADEH, S. et al. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. **Journal de Mycologie Médicale**, vol 24, 51-56. 2014.
- AHMAD, A. et al. Synergistic Interactions of Eugenol-tosylate and Its Congeners with Fluconazole against *Candida albicans*. **PLOS ONE**, 1-19. 2015.
- ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? **Archives of Medical Research**, v.36, 697–705. 2005.
- ALBANO, M. et al. Antibacterial and anti-staphylococcal enterotoxin activities of phenolic compounds. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v 38,. 83–90. 2016.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química nova**, 33(10), 2202-2210. 2010.
- ALVES, L. A. et al. Zingiber officinale (GENGIBRE) COMO FONTE ENZIMÁTICA NA REDUÇÃO DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS. **Química Nova**, 38, 2015. 483-487.
- AMOROZO, M. C. M. **A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In:** STASI, L.C. di (org.). *Plantas medicinais: arte e ciência: um guia interdisciplinar*. SÃO PAULO: UNESP, 1996.
- ANDRADE, L. H. et al. Edible catalysts for clean chemical reactions: Bioreduction of aromatic ketones and biooxidation of secondary alcohols using plants. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 38, 84–90. 2006.
- ASSUNÇÃO, J. C. C. et al. Sugar cane juice for the bioreduction of carbonyl compounds. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 52-53 , 194–198. 2008.
- AVELAR, M. H. M. et al. Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. **Industrial Crops and Products**, 44, 452– 458. 2013.
- AVELAR, M. H. M. et al. Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. **Industrial Crops and Products**, 44, 452– 458. 2013.
- AVER, G. M.; KREUTZ, O. C.; SUYENAGA, E. S. MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE FÁRMACOS SOB A ÓPTICA DA QUÍMICA MEDICINAL. **Revista Conhecimento Online**, v 2, 63-73. 2015.
- AWASTHI, P. K. et al. Eugenol Derivatives as Future Potential Drugs. **Journal of Pharmacy Research**, v 1, 215-220. 2008.
- AZEVEDO, F. M. **Microrganismos multirresistentes. In:** Oliveira AC. *Infecções hospitalares: epidemiologia, prevenção e controle*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- BADANAI, J. et al. Ability of scavenging free radicals and preventing lipid peroxidation of some phenols and ascorbic acid. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v 5, 034-041. 2015.

- BALBANI, A. P. S.; STELZER, L. B.; MONTOVANI, J. C. Pharmaceutical excipients and the information on drug labels. **BRAZILIAN JOURNAL OF OTORHINOLARYNGOLOGY**, v **72**, 400-406. 2006.
- BALDASSARRE, F. et al. Preparative synthesis of chiral alcohols by enantioselective reduction with *Daucus carota* root as biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, **11**, 55-58. 2000.
- BARRENTO, S. et al. Cancer pagurus (Linnaeus, 1758) physiological responses to simulated live transport: Influence of temperature, air exposure and AQUI-S. **Journal of Thermal Biology**, vol **36**, 128-137. 2011.
- BASKARANA, Y.; PERIYASAM, V.; , A. C. V. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. **Toxicology**, vol **268**, 204-212. 2010.
- BECKER, K.; HU, Y.; BILLER-ANDORNO, N. Infectious diseases – A global challenge. **International Journal of Medical Microbiology**, **296**, 179-185. 2006.
- BENDRE, R. S. et al. Outlooks on Medicinal Properties of Eugenol and its Synthetic Derivatives. **Natural Products Chemistry & Research**, 1-6. 2016.
- BLAU, L.; MENEGON, R. F. Pró-fármaco ativado por enzima, uma estratégia promissora na quimioterapia. **Química Nova**, v **29**, 1307-1317. 2006.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: interciência, 2008.
- BORDÓN, D. L. et al. Weeds as biocatalysts in the stereoselective synthesis of chiral phenylethanols used as key intermediates for pharmaceuticals. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, **4**, 493-499. 2015.
- BORNSCHEUER, U. T. et al. Engineering the third wave of biocatalysis. **NATURE**, **485**, 185-194. 2012.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, **72**, 248-254. 1976.
- BRONDANI, D. J. et al. Novel Nitrofurazone Derivatives Endowed with Antimicrobial Activity. **Arch. Pharm. Chem. Life Sci**, **341**, 655-660. 2008.
- BROWN, H. C.; LYNCH, G. J. Solvomercuration-Demercuration. 8. Oxymercuration-Demercuration of Methoxy-, Hydroxy-, and Acetoxy-Substituted Alkenes. **The Journal of Organic Chemistry**, **46**, 531-538. 1981.
- BUGG, T. D. H.; LEWIN, A. M.; CATLIN, E. R. Regiospecific Ester Hydrolysis by Orange Peel Esterase - An Undergraduate Experiment. **Journal of Chemical Education**, **74(1)**, 105. 1997.
- BUNDGAARD, H. Novel chemical approaches in prodrug design.. **Drugs of the Future**, v. **16**, 443-458. 1991.

- CALDERON, L. D. A. et al. Amazonian Biodiversity: A View of Drug Development for Leishmaniasis and Malaria. **journal brazilian chemistry society**, vol 20, 1011-1023. 2009.
- CARRASCO, H. et al. Antifungal Activity of Eugenol Analogues. Influence of Different Substituents and Studies on Mechanism of Action. **Molecules**, 17, 1002-1024. 2012.
- CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios**: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. RIBEIRÃO PRETO, SP: Tecmedd, 2004.
- CETIN-KARACA, H.; NEWMAN, M. C. Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against Salmonella and Escherichia Coli. **Food Bioscience**, 11, 8-16. 2015.
- CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM, N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. **food chemistry**, 92, 491-497. 2005.
- CHEN, P. Kinetic resolution of propargylic alcohols via stereoselective acylation catalyzed by lipase PS-30. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 97, 184– 188. 2013.
- CHIN, C. M.; FERREIRA, E. I. O PROCESSO DE LATENCIAÇÃO NO PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS. **QUÍMICA NOVA**, 22(1), 75-84. 1999.
- CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v 22, 75-84. 1999.
- CITÓ, A. M. D. G. L. et al. SÍNTESE DE REGIOISÔMEROS QUIRAIS A PARTIR DE D-MANITOL: OBTENÇÃO DE UMA MISTURA DE ÁLCOOIS ACETILÊNICOS. **Química Nova**, 32, 2355-2359. 2009.
- COELHO, F. A. S. Fármacos e quiralidade. **Cadernos temáticos de Química nova na Escola**, n. 03, 23-32. 2001.
- COHEN, F. L.; TARTASKY, D. Microbial resistance to drug therapy: a review. **American Journal of Infection Control**, 25, 51-64. 1997.
- COMASSETO, J. V. et al. Preparation of chiral organochalcogeno- $\alpha$ -methylbenzyl alcohols via biocatalysis. The role of Daucus carota root. **Tetrahedron Letters**, 45, 473–476. 2004.
- COSTA, A. R. T. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, vol 13, n°2, 240–245. 2011.
- COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. D. O EMPREGO DE LIPASES COMO AGENTES DE RESOLUÇÃO CINÉTICA DE ENANTIÔMEROS EM SÍNTESE ORGÂNICA: ASPECTOS GERAIS SOBRE A INFLUÊNCIA DO SOLVENTE. **QUÍMICA NOVA**, v 22, 863-873. 1999.
- COWING, D.; POWELL, A.; JOHNSON, M. Evaluation of different concentration doses of eugenol on the behaviour of *Nephrops norvegicus*. **Aquaculture**, vol 442, 78–85. 2015.
- COYLE, S. D.; DURBOROW, R. M.; TIDWELL, J. H. Anesthetics in aquaculture. **SRAC Publication No. 3900**, 2004.

- DANIEL, A. N. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. **19**, n.1B, 212–217. 2009.
- DEEP, G. et al. Silybinin inhibits advanced human prostate cancer growth in athymic nude mice: comparison with silymarin and silybinin. **International Journal of Cancer**, **123**, 2750–2758. 2008.
- DEVI, K. P. et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v **130**, 107–115. 2010.
- DHARA, L.; TRIPATHI, A. Antimicrobial activity of eugenol and cinnamaldehyde against extended spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae by in vitro and molecular docking analysis. **European Journal of Integrative Medicine**, vol **5**, 527–536. 2013.
- DICOSIMO, R. et al. Industrial use of immobilized enzymes. **Chem Soc Rev**, 2013.
- EYAMBE, G.; CANALES, L.; BANIK, B. K. ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EUGENOL DERIVATIVES. **heteroletters.org**, v **1**, 154-157. 2011.
- FARIAS, M. D. A. et al. Eugenol derivatives as potential anti-oxidants: is phenolic hydroxyl necessary to obtain an effect? **Journal of Pharmacy And Pharmacology**, v **66**, 733–746. 2013.
- FERRAZ, H. M. C. et al. Enzymatic resolution of  $\alpha$ -tetralols by CALB-catalyzed acetylation. **Tetrahedron: Asymmetry**, **18**, 1070–1076. 2007.
- FERRAZ, H. M. C. et al. BIOREDUCTION OF SUBSTITUTED  $\alpha$ -TETRALONES PROMOTED BY *Daucus carota* ROOT. **Quim. Nova**, **31**, 813-817. 2008.
- FERREIRA, D. A. et al. *Lens culinaris*: A new catalyst for reduction of carbonyl and nitro groups. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, **17**, 407-412. 2012.
- FINDİK, E.; CEYLAN, M.; ELMASTAŞ, M. Isoeugenol-based novel potent antioxidants: synthesis and reactivity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, **46**, 4618-4624. 2011.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, 239-247. 2000.
- FONSECA, A. M. et al. Spectral Assignments and Reference Data. **MAGNETIC RESONANCE IN CHEMISTRY**, 1038-1040. 2003.
- FONSECA, A. M. et al. Coconut water (*Cocos nucifera* L.)—A new biocatalyst system for organic synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, **57**, 78–82. 2009.
- FONTENELLE, R. O. S. et al. Alkylphenol Activity against *Candida* spp. and *Microsporum canis*: A Focus on the Antifungal Activity of Thymol, Eugenol and O-Methyl Derivatives. **Molecules**, vol **16**, 6422-6431. 2011.
- FUJII, M. et al. Enzymatic resolution of albicanol and its application to the synthesis of (–)-copalic acid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, **59**, 254–260. 2009.



- FUJII, M. et al. Enzymatic resolution of albicanol and its application to the synthesis of (–)-copalic acid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, **59**, 254-260. 2009.
- GAZÁKA, R. et al. Preparative method for isosilybin isolation based on enzymatic kinetic resolution of silymarin mixture. **Process Biochemistry**, **48**, 184–189. 2013.
- GHAMGUI, H. et al. Production of isoamyl acetate with immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v **38**, 788–794. 2006.
- GHOSH, R. et al. Eugenol causes melanoma growth suppression through inhibition of E2F1 transcriptional activity. **Journal of Biological Chemistry**, vol **280**, 5812–5819. 2005.
- GUAJARDO, N. et al. Asymmetric hydrolysis of dimethyl-3-phenylglutarate in sequential batch reactor operation catalyzed by immobilized *Geobacillus thermocatenulatus* lipase. **Catalysis Today**, **255**, 21–26. 2015.
- GUAJARDO, N. et al. Asymmetric hydrolysis of dimethyl-3-phenylglutarate in sequential batch reactor operation catalyzed by immobilized *Geobacillus thermocatenulatus* lipase. **Catalysis Today**, v **255**, 21–26. 2015.
- GUERRA, E. J. I. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. **Anales de Medicina Interna**, **18**, 326-335. 2001.
- GUIMARÃES, O. D.; MOMESSO, L. S.; PUPO, T. M. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, 667-679. 2010.
- GÜLAY, S.; SANLI-MOHAMED, G. Immobilization of thermoalkalophilic recombinant esterase enzyme by entrapment in silicate coated Ca-alginate beads and its hydrolytic properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v **50**, 545– 551. 2012.
- HALLIWELL, B. et al. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, **33**, 601-617. 1995.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Oxford University Press, 2007.
- HAMBRAEUS, A. Lowbury Lecture 2005: infection control from a global perspective. **Journal of Hospital Infection**, **64**, 217-223. 2006.
- HAMED, O. A. et al. Synthesis and Antibacterial Activity of Novel Curcumin Derivatives Containing Heterocyclic Moiety. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v **12**, 47-56. 2013.
- HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. **Phytomedicine**, vol **16**, 997–1005. 2009.
- HIDALGO, M. E. et al. ANTIOXIDANT CAPACITY OF EUGENOL DERIVATIVES. **Química nova**, v **32**, 1467-1470. 2009.
- HIYAMA, T.; YAMAMOTO, H. **Organofluorine Compounds: Chemistry and Applications**. Berlin: Springer-Verlag, 2000.

- HUANG, X. et al. Anti-inflammatory effects of eugenol on lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction in acute lung injury via regulating inflammation and redox status. **International Immunopharmacology**, vol 26, 265–271. 2015.
- HUSSAIN, M. M. A. et al. Antimycotic activity of eugenol against selected water molds. **J. Aquat. Anim. Health**, vol 12, 224–229. 2000.
- ITO, M.; MURAKAMI, K.; YOSHINO, M. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. **Food and Chemical Toxicology**, 43, 461–466. 2005.
- JBPML. Alexander Fleming e a descoberta da penicilina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 45, outubro 2009. 1.
- JEONG, K. J. et al. Effects of eugenol on hepatic glucose production and AMPK signaling pathway in hepatocytes and C57BL/6J mice. **Fitoterapia**, vol 93, 150–162. 2014.
- KAMATOU, G. P.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. M. Eugenol—From the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule. **Molecules**, vol 17, n 6, 6953–698. 2012.
- KARACA, H. C.; NEWMAN, M. C. Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against Salmonella and Escherichia Coli. **Food Bioscience**, v 11, 8-16. 2015.
- KARAPMAR, M.; AKTUG, S. E. Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole. **Int. J. Food Microbiol.** vol 4, 161–166. 1987.
- KAUFMAN, T. S. The multiple faces of eugenol. A versatile starting material and building block for organic and bio-organic synthesis and a convenient precursor toward bio-based fine chemicals. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v 26, n. 6, 1055-1085. 2015.
- KONG, X. et al. Advances in Pharmacological Research of Eugenol. **Curr Opin Complement Alternat Med**, 1, 8-11. 2014.
- KRAUT, A. D.; CARROLL, K. S.; HERSCHLAG, D. Challenges in Enzyme Mechanism and Energetics. **Annual Review of Biochemistry**, v 72, 517-571. 2003.
- KUMAR, A.; RAWLINGS, R. D.; BEAMAN, D. C. The mystery ingredients: sweeteners, flavorings, dyes, and preservatives in analgesic/antipyretic antihistamine/decongestant, cough and cold, antidiarrheal, and liquid theophylline preparations. **Pediatrics**, v 91, 927-933. 1993.
- LAWSON, D. M. et al. Probing the nature of substrate binding in Humicola lanuginosa lipase through X-ray crystallography and intuitive modelling. **Protein Engineering, Design and Selection**, v 7, 543-550. 1994.
- LEAL, P. M. AÇÃO ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS MAJORITÁRIOS PRESENTES EM ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE BACTÉRIAS CAUSADORAS DE INFECÇÕES HOSPITALARES. Botucatu. 2013.
- LEITE, A. M. et al. Inhibitory effect of  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v 43, 121-126. 2007.

- LIN, G.-Q.; YOU, Q.-D.; CHENG, J.-F. **Chiral Drugs: Chemistry and Biological Action**. New Jersey: John Wiley and Sons, 2011.
- LIU, D. A Rapid Biochemical Test for Measuring Chemical Toxicity. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v **26**, 145-149. 1981.
- LUANCHOY, S. et al. Antioxidant Activity of a Thai Traditional Formula for Longevity. **Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences**, **41** (3), 1-5. 2014.
- LUND, H. S. et al. Recovery by the Norway lobster *Nephrops norvegicus* (L.) from the physiological stresses of trawling: Influence of season and live-storage position. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, vol **373**, 124–132. 2009.
- MA, N. et al. Preventive Effect of Aspirin Eugenol Ester on Thrombosis in  $\kappa$ -Carrageenan-Induced Rat Tail Thrombosis Model. **PLOS ONE**, jul. 1-14. 2015.
- MACHADO, L. L. et al. Bioreduction of aromatic aldehydes and ketones by fruits barks of *Passiflora edulis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, **54**, 130–133. 2008.
- MAHAPATRA, S. K. et al. Eugenol protects nicotine-induced superoxide mediated oxidative damage in murine peritoneal macrophages in vitro. **European Journal of Pharmacology**, **623**, 132–140. 2009.
- MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 727–747. 2004.
- MANIKANDAN, P. et al. Eugenol induces apoptosis and inhibits invasion and angiogenesis in a rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG. **Life Sciences**, vol **86**, 936–941. 2010.
- MARQUES, P. P. **Estudo da imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* em alginato de Sódio. Dissertação de Mestrado a ser apresentada à Faculdade de Engenharia Química**. Campinas-SP. 2011.
- MARTINS, M. A. et al. **Drogas antibacterianas: antibióticos**. In: Martins MA. Manual de infecção hospitalar: epidemiologia, prevenção e controle. Belo Horizonte: Medsi, 2001.
- MARTINS, R. M. et al. Antimicrobial and cytotoxic evaluation of eugenol derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, **25**, 2360-2367. 2016.
- MASTELIC, J. et al. Comparative Study on the Antioxidant and Biological Activities of Carvacrol, Thymol, and Eugenol Derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v **56**, 3989–3996. 2008.
- MEZTLER, P. D. S. et al. Biocatalytic characterization of a naturally immobilized lipase found in *Araujia sericifera* Brot. (Apocynaceae) latex. **Catalysis Science & Technology**, **4**, 1386–1394. 2014.
- MIHAI, A. L.; POPA, M. E. In vitro Activity of Natural Antimicrobial Compounds against *Aspergillus* Strains. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, **6**, 585-592. 2015.

MODJINO, T. et al. Antibacterial and antioxidant bio-based networks derived from eugenol using photo-activated thiol-ene reaction. **Reactive and Functional Polymers**, **101**, 47–53. 2016.

NAGABABU, E. et al. Assessment of Antioxidant Activity of Eugenol In Vitro and In Vivo. **Methods in Molecular Biology**, **610**, 165-180. 2010.

NAM, H.; KIM, M.-M. Eugenol with antioxidant activity inhibits MMP-9 related to metastasis in human fibrosarcoma cells. **Food and Chemical Toxicology**, **55**, 106–112. 2013.

NASCIMENTO, P. G. G. D. et al. Lithocholic acid and derivatives: Antibacterial activity. **Steroids**, vol **104**, 8–15. 2015.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard**. NCCLS document **M2-A8**. Pennsylvania: NCCLS, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal Natural Products**, vol **79**, 629–661. 2016.

NUNES, A. P. Â. **Impacto da utilização de ácido gálgico, ácido ferúlico e eugenol em modo contínuo na suscetibilidade de Pseudomonas aeruginosa**. Faro, Portugal. 2016.

OLIVEIRA, A. C. D.; SILVA, R. S. D. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, **10**, 189-197. 2008.

OLIVEIRA, C. A. et al. Síntese de Ésteres de Aromas de Frutas: Um Experimento para Cursos de Graduação dentro de um dos Princípios da Química Verde. **Síntese de Ésteres de Aromas de Frutas: Um Experimento para Cursos de Graduação dentro de um dos Princípios da Química Verde**, 152-167. 2014.

OLIVEIRA, J. G. D.; FILHO, B. A. D. A. Propriedade antimicrobiana do eugenol frente às amostras de Alicyclobacillus spp. isoladas de suco de laranja. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v **71**, 410-414. 2012.

OMS, O. M. D. S. **Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance**. [S.l.]. 2014.

OZYILMAZ, G.; GEZER, E. Production of aroma esters by immobilized Candida rugosa and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, **64**, 140–145. 2010.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. LIPASES DE LÁTEX VEGETAIS: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES INDUSTRIAIS. **Química Nova**, **29**, 93-99. 2006.

PEREIRA, F. D. O.; MENDES, J. M.; LIMA, E. D. O. Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against Trichophyton rubrum. **Medical Mycology**, **51**, 507-513. 2013.

PEREIRA-MAIA, E. C. et al. TETRACICLINAS E GLICILCICLINAS: UMA VISÃO GERAL. **Química Nova**, **33**, 700-706. 2010.

PESSOA, L. M. et al. Anthelmintic activity of essential oil of Ocimum gratissimum Linn. and eugenol against Haemonchus contortus. **Vet. Parasitol.** vol **109**, 59–63. 2002.

- PINHEIRO, S.; FERREIRA, V. F. Abordagens em síntese assimétrica. **Química Nova**, 312-318. 1998.
- PISANO, M. et al. Antiproliferative and pro-apoptotic activity of eugenol-related biphenyls on malignant melanoma cells. **Molecular Cancer**, vol 6, 8. 2007.
- PRAMOD, P. K. et al. Comparative efficacy of MS-222 and benzocaine as anaesthetics under simulated transport conditions of a tropical ornamental fish *Puntius filamentosus* (Valenciennes). **Aquaculture Research**, vol 41, 309-314. 2010.
- PRASAD, S. N.; BHARATH, M. M. S.; MURALIDHARA. Neurorestorative effects of eugenol, a spice bioactive: Evidence in cell model and its efficacy as an intervention molecule to abrogate brain oxidative dysfunctions in the streptozotocin diabetic rat. **Neurochemistry International**, 95, 24-36. 2016.
- RAHIM, N. H. C. A. et al. Synthesis and antibacterial Study of Eugenol Derivatives. **Asian Journal of Chemistry**, 29, 22-26. 2017.
- RAJA, M. R. C. et al. EUGENOL: A VERSATILE PHYTOMEDICINE. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v 7, 35-40. 2015.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, vol 39, 603–613. 2001.
- RIBEIRO, S. S.; RAMINELLI, C.; PORTO, A. L. M. Enzymatic resolution by CALB of organofluorine compounds under conventional condition and microwave irradiation. **Journal of Fluorine Chemistry**, 154, 53–59. 2013.
- RIDGWAY, I. D. et al. Morbidity and mortality in Norway lobsters, *Nephrops norvegicus*: physiological, immunological and pathological effects of aerial exposure. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, vol 328, 251 – 264. 2006.
- RÍOS, A. P. D. L.; RANTWIJK, F. V.; SHELDON, R. A. Effective resolution of 1-phenyl ethanol by *Candida antarctica* lipase B catalysed acylation with vinyl acetate in protic ionic liquids (PILs). **Green Chemistry**, v 14, 1584–1588. 2012.
- RUDYANTO, M.; WIDIANDANI, T.; SYAHRANI, A. SOME BENZOXAZINE AND AMINOMETHYL DERIVATIVES OF EUGENOL: CYTOTOXICITY ON MCF-7 CELL LINE. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 7, 229-232. 2015.
- SANTOS, R. R. et al. Biological activities and major components determination in essential oils intended for a biodegradable food packaging. **Industrial Crops and Products** 97, 201–210. 2017.
- SERAFIM, E. O. P. et al. ABORDAGEM DA LATENCIAÇÃO DE FÁRMACOS COMO FERRAMENTA PARA DESCOBERTA DE NOVOS ANTICHAGÁSICOS. **REVISTA UNIARA**, v14, 140-157. 2011.
- SHLAES, D. M. An update on tetracyclines. **Current Opinion in Investigational Drugs**, 7, 167-171. 2006.
- SHU, Y.-Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, vol 61, 1053–1071. 1998.

- SILVA, F. F. M. D. et al. The orange peel as biocatalyst for the hydrolysis of esters. **Industrial Crops and Products**, **84**, 22–27. 2016.
- SILVA, V. D. M. et al. Imobilização da pancreatina em carvão ativado e em alumina para o preparo de hidrolisados de soro de leite. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v **27**, 163-169. 2005.
- SILVER, L. L. Challenges of antibacterial discovery, 24. **Clinical Microbiology Reviews**, 71-109. 2011.
- SOUZA, L. G. D. S. et al. Synthesis, antibacterial and cytotoxic activities of new biflorin-based hydrazones and oximes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol **26**, 435–439. 2016.
- SOUZA, T. B. D. et al. Synthesis and antimicrobial activity of 6-triazolo-6-deoxy eugenol glucosides. **Carbohydrate Research**, v **410**, 1-8. 2015.
- STILTS, C.; BEZOTTE, C.; FONTAINE, S. Synthesis of Sulfanilamide Derivatives and Their Effects on E. coli and B. subtilis: A Collaborative Experiment between Undergraduate Organic and Microbiology Laboratories. **Journal of Laboratory Chemical Education**, v **3**, 76-80. 2015.
- SUCUPIRA, N. R. et al. Methods for Measuring Antioxidant Activity of Fruits. **Cient Ciênc Biol Saúde**, v **14**, 263-269. 2012.
- SUN, W.-J. et al. Eugenol confers resistance to Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) by regulating the expression of SlPer1 in tomato plants. **New Biotechnology**, vol **33**, N **3**, 345-354. 2016.
- SUTILI, F. J. et al. The use of eugenol against Aeromonas hydrophila and its effect on hematological and immunological parameters in silver catfish (Rhamdia quelen). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, **157**, 142– 148. 2014.
- TAKEMOTO, M. et al. Biocatalytic diastereomerization of dibenzylbutanolides by plant cell cultures. **Tetrahedron Letters**, **41**, 499–502. 2000.
- TAVARES, L. C. et al. Linseed (Linum usitatissimum L.) as a Biocatalyst for Reduction of Nitroaromatic Compounds. **ORIENTAL JOURNAL OF CHEMISTRY**, **30**, 485-489. 2014.
- TEIXEIRA, R.; LOURENÇO, N. M. T. Enzymatic kinetic resolution of sec-alcohols using an ionic liquid anhydride as acylating agent. **Tetrahedron: Asymmetry**, **25**, 944–948. 2014.
- VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. Plantas medicinais: cura segura? **QUÍMICA NOVA** v **28**, 519-528. 2005.
- VENKADESWARAN, K.; THOMAS, P. A.; GERALDINE, P. An experimental evaluation of the anti-atherogenic potential of the plant, Piper betle, and its active constituent, eugenol, in rats fed an atherogenic diet. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v **80**, 276–288. 2016.
- VENKADESWARANA, K.; THOMAS, P. A.; GERALDINE, P. An experimental evaluation of the anti-atherogenic potential of the plant, Piper betle, and its active constituent, eugenol, in rats fed an atherogenic diet. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, **80**, 276–288. 2016.

WAGNER, E.; ARNDT, R.; HILTON, B. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility of rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. **Aquaculture**, vol **211**, 353–366. 2002.

WANG, Z.-X. et al. ASYMMETRIC EPOXIDATION OF trans- $\beta$ -METHYLSTYRENE AND 1-PHENYLCYCLOHEXENE USING A D-FRUCTOSE AND 1-PHENYLCYCLOHEXENE USING A D-FRUCTOSE DERIVED (R,R)-1-PHENYLCYCLOHEXENE OXIDE[(Oxirane, 2-methyl-3-phenyl-, (2R,3R)- and 7-Oxabicyclo[4.1.0]heptane,1-phenyl-)]. **Organic Syntheses**, **80**, 9-17. 2003.

WU, J. H. et al. Phenolic antioxidants from the heartwood of *Acacia confusa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **53**, 5917-5921. 2005.

YADAV, G. D.; THORAT, P. A. Microwave assisted lipase catalyzed synthesis of isoamyl myristate in solvent-free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v **83**, 16–22. 2012.

YADAV, J. S. et al. Efficient Enantioselective Reduction of Ketones with *Daucus carota* Root. **Journal of Organic Chemistry**, **67**, 3900–3903. 2002.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v **23**, 438–450. 1998.

YILDIZ, D.; ERCAL, N.; ARMSTRONG, D. W. Nicotine enantiomers and oxidative stress. **Toxicology** **130**, 155–165. 1998.

YOUSEFIA, M.; MOHAMMADI, M.; HABIBIC, Z. Enantioselective resolution of racemic ibuprofen esters using different lipases immobilized on octyl sepharose. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** **104**, 87-94. 2014.

ZHOU, W.-J. et al. Enzymatic resolution of a chiral chlorohydrin precursor for (R)-lipoic acid synthesis via lipase catalyzed enantioselective transacylation with vinyl acetate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v **99**, 102– 107. 2014.

ZILINSKAS, A.; SEREIKAITĖ, J. Stereoselective bioreduction for the resolution of racemic mixtures of bicyclo[3.3.1]nonane-2,6-dione using vegetables. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, **90**, 66-69. 2013.

ZWART, L. L. et al. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Radic Biol Med**, **26**, 202-226. 1999.