

Universidade de São Paulo  
Instituto de Química

# **Biotransformações de cetonas aromáticas e cíclicas promovidas por fungos**

**Artur Franz Keppler**  
**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Dr. Leandro Helgueira de Andrade**  
**Orientador**

São Paulo, 14 de fevereiro de 2005

**Ibergekumene tsores iz gut tsu dertseylin**  
Problemas resolvidos são bons para contar  
- Provérbio Judeu

**À Giselle,  
incondicionalmente**

***A importância de cada um não pode ser quantificada e sequer colocada em uma ordem lógica.***

Ao CNPq pela bolsa concedida durante o mestrado.

Ao Leandro; pela amizade, pela liberdade de expressar minhas opiniões, pela inestimável dedicação e pela primorosa orientação.

Ao Prof. Comasseto; pela confiança, pelo exemplo, pela orientação e sobretudo por todas as oportunidades oferecidas.

À Giselle; por todo amor, compreensão, cumplicidade de ideais e sem nenhuma sobra de dúvidas pelo exemplo de dedicação e de eficiência em tudo o que faz. Dedico essa Dissertação a você, que me dá forças para olhar além dos horizontes.....

À minha grande “pequena” família. Especialmente aos meus amados pai, mãe, vô Fredi, minhas irmãs Luciana e Lilica. Sei que sem vocês eu nada seria. Obrigado pelo amor, apoio, carinho, compreensão, exemplo de valores, de vida e muito muito mais. Obrigado por depositarem em mim toda a confiança que uma pessoa precisa ter para conquistar um lugar ao sol.

Às minhas amadas Vó Mia e Vó Nena, pois sei que sempre estarão comigo e todo esse amor me dá forças para continuar; eternamente.....

À minha nova família; Toninho e Vera, que me acolheram como um filho e por isso e muito mais serei eternamente grato.

Aos amigos do Bloco Zero: Adriana, André, Édna, Leandro, Leonardo, Luís, Pedro, Roberto, Roberta e Thaís; pelos agradáveis momentos de trabalho e descontração, pela indiscutível contribuição, ajuda nos momentos difíceis (e fáceis claro!), pelas discussões científicas e por “aquelas” não tanto, que somadas acrescentaram muito para meu desenvolvimento.....em especial ao Luís, pela amizade e colaboração.

Aos amigos do Bloco Onze: Alcindo, Álvaro, Bruno, Carlos Eduardo, Cristiano, Giuliano, Fabiano, Priscila, Rodrigo, Zé; pela ajuda e pelos agradáveis momentos de trabalho e descontração.

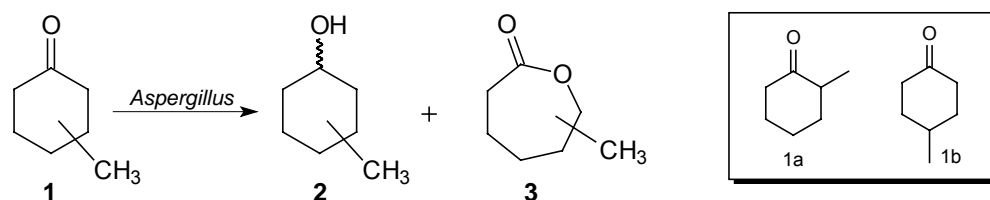
Aos amigos André Augusto, Camila e Ruy; mesmo distantes, sempre presentes.

Aos amigos da Secretaria de Pós; pela ajuda nas horas mais difíceis.

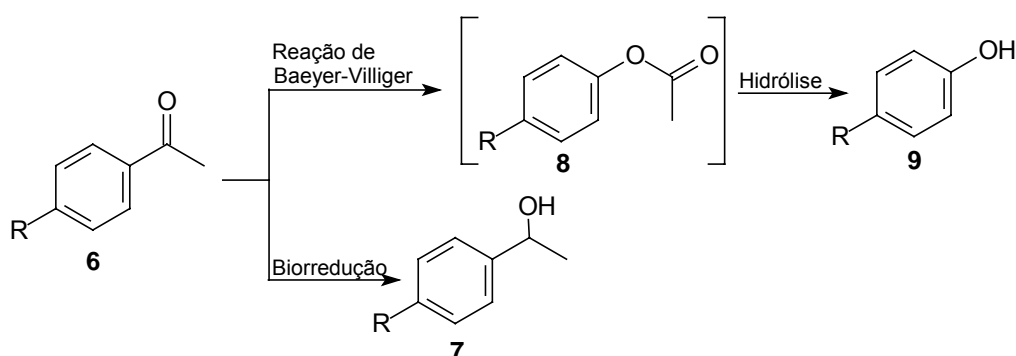
Aos meus amigos fungos (*em memória*); pois fizeram o trabalho “*sujo*” em troca de alimento e que, sem sombra de dúvidas, foram os co-autores dessa dissertação.

## RESUMO

Nesse trabalho avaliamos o potencial enzimático de diferentes linhagens de *Aspergillus*, investigando as biotransformações que eles promoveram em dois substratos: 2- e 4-metilciclohexanona (**1a** e **1b**). Todas as linhagens empregadas apresentaram atividade de álcool desidrogenases e Baeyer-Villiger mono-oxigenases (CHMO e CPMO), enzimas que são responsáveis pela biorredução e oxidação da cetona, respectivamente. Utilizando o fungo *A. terreus* SSP 1498 selecionado na triagem, foram preparados álcoois e lactonas com boa enantiosseletividade.



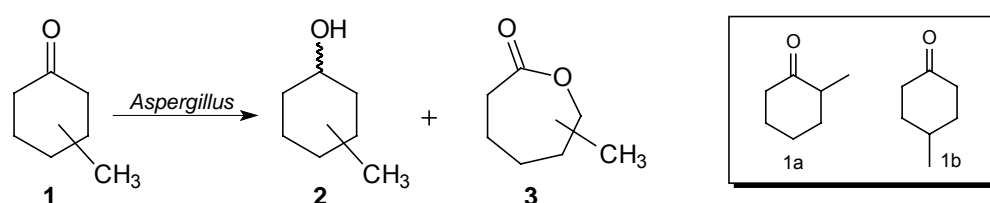
Nesse mesmo contexto, foram estudadas outras linhagens de fungos visando determinar a presença de mono-oxigenases capazes de oxidar cetonas aromáticas. Assim como os fungos *Aspergillus*, verificamos que todas as linhagens empregadas nesse estudo também apresentaram atividade de álcool desidrogenases e Baeyer-Villiger mono-oxigenases (APMO). A 1-fenil-etanona e seus derivados *para* substituídos foram utilizados como substratos.



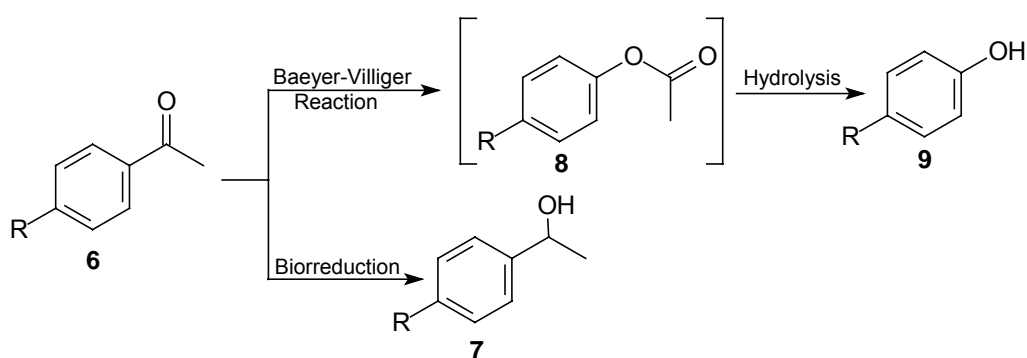
Adicionalmente, sintetizamos oito exemplos de compostos bi-funcionalizados com grupos sulfeto, seleneto e carbonila (cetona). Esses compostos foram submetidos à ação de diferentes fungos selecionados por triagem. Os produtos das reações foram isolados e caracterizados.

## ABSTRACT

In this work, we evaluated the enzymatic potential of different *Aspergillus* strains, through the biotransformations of two substrates: 2- and 4-methylcyclohexanone (**1a** e **1b**). All the strains employed showed alcohol dehydrogenase and Baeyer-Villiger monoxygenase (CPMO and CHMO) activities. These enzymes can perform ketone biorreduction and oxidation. Using the *A. terreus* SSP 1498 selected from the screening study, we prepared alcohols and lactones in good enantioselectivity.



In this way, other fungal strains were studied aiming to determine the presence of monoxygenase activity by means of the biotransformation of aromatic ketones. Like the *Aspergillus*, we observed that all strains used in this study showed alcohol dehydrogenase and Baeyer-Villiger monoxygenase (APMO) activities. We selected 1-phenyl-ethanone and its *para* substituted derivates as substrates.



Additionally, we synthesized eight examples of bi-functionalized compounds with sulfide, selenide and ketone groups. These compounds were submitted to the action of enzymatic system of different fungi which were selected from the initial screening. The products from the biotransformation were isolated and characterized.

CCD = cromatografias em camada delgada  
CG-EM = cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa  
HPLC = cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)  
RMN = espectroscopia de ressonância magnética nuclear  
IV = espectroscopia de absorção na região do infravermelho  
APMO = acetofenona mono-oxigenase  
BVMO's = Baeyer-Villiger mono-oxigenases  
CHMO = ciclohexanona mono-oxigenase  
CPMO = ciclopentanona mono-oxigenase  
NADH = nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)  
NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)  
FAD = flavina adenina di-nucleotídeo  
FMN = flavina mono-nucleotídeo  
THF = tetraidrofurano  
LDA = diisopropilamideto de lítio  
e.e. = excesso enantiomérico  
uL ou  $\mu\text{L}$  = microlitro  
mg = miligrama  
mL = mililitro  
 $\text{MgSO}_4$  = sulfato de magnésio  
 $\text{NH}_4\text{Cl}$  = cloreto de amônio  
 $\text{Na}^0$  = sódio metálico  
 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e  $\text{K}_2\text{CO}_3$  = carbonato de sódio e de potássio  
 $\text{NaHCO}_3$  = bicarbonato de sódio  
 $\text{NaBH}_4$  = boroidreto de sódio  
 $\text{NaCl}$  = cloreto de sódio  
*m*-CPBA = ácido *meta*-cloroperbenzóico  
HCl = ácido clorídrico  
LiI = iodeto de lítio  
 $\text{Et}_3\text{N}$  = trietilamina  
 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  = diclorometano  
AcOEt = acetato de etila

Outras siglas serão explicadas no decorrer do texto.

## I.1 – Introdução

A incorporação de etapas sintéticas que utilizam as biotransformações, usando microrganismos e/ou enzimas isoladas, está em crescente expansão na indústria e na área acadêmica. O principal apelo para o uso das biotransformações em uma síntese é o controle estereo/regioquímico que pode ser obtido usando reações catalisadas por enzimas. A busca por metodologias de produção de fármacos enriquecidos enantiomericamente é um desafio atual na química fina, conseqüência da crescente demanda por drogas mais eficientes e seguras. Encaixando-se neste perfil, as biotransformações estão sendo aceitas como um método eficiente de obtenção de compostos opticamente puros e freqüentemente estão presentes em rotas sintéticas de moléculas-chave (*building blocks*).

Um tema que vem sendo amplamente debatido na academia e na indústria é o emprego de processos não agressivos ao meio ambiente, também conhecidos como química sustentável (*green chemistry*).<sup>42</sup> Neste novo conceito, o uso de solventes orgânicos e materiais tóxicos como reagentes que contenham metais pesados devem ser reduzidos ou, idealmente, eliminados. As biotransformações atendem a este compromisso e utilizam como catalisadores uma enorme gama de enzimas. Comparadas estas metodologias com as tradicionais, observa-se que o uso de biocatalisadores é viável, haja vista o crescente interesse por estas metodologias.<sup>43</sup>

As enzimas podem catalisar diversas reações químicas e, de acordo com as transformações que elas podem promover, são divididas em seis classes:<sup>44</sup> Óxido-redutases, Transferases, Hidrolases, Lipases, Isomerases e Ligases.

A reação de Baeyer-Villiger é uma das mais importantes reações em síntese orgânica e pode ser catalisada por uma oxidase, denominada mono-oxigenase. Nessa oxidação uma cetona é transformada em um éster, isto é, ocorre a clivagem de uma ligação carbono-carbono seguida de um processo de inserção de oxigênio (Esquema I.1). A preparação de lactonas (ésteres cíclicos) a partir de cetonas cíclicas, foi descrita pela primeira vez no ano de 1899<sup>45</sup> por Adolf Baeyer e por Victor Villiger, no entanto foi utilizado um peróxido derivado como oxidante. Nesses mais de cem anos de oxidação

---

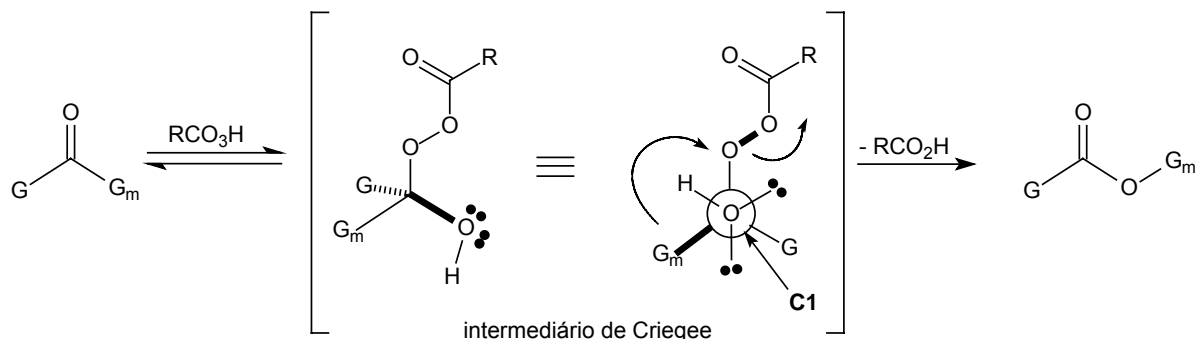
<sup>42</sup> Lenardão, E. J.; Freitag, R. A.; Dabdoub, M. J.; Batista, A. C. F.; Silveira, C. C. *Química Nova* **2003**, 26, 123.

<sup>43</sup> Schoemaker, H. E.; Mink, D.; Wubbolts, M. G. *Science* **2003**, 299, 1694.

<sup>44</sup> Silverman, R. B. em *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions*. Academic Press: Califórnia, 2000. pg 35. ISBN: 0-12-643745-9.

<sup>45</sup> Baeyer, A.; Villiger, V. *Ber. Disch. Chem. Ges.* **1899**, 32, 3625.

de Baeyer-Villiger, a reação foi usada na síntese de inúmeras moléculas orgânicas.<sup>46</sup> Desde sua descoberta, ocorreu um grande avanço na elucidação do mecanismo<sup>47</sup> da reação e na aplicação dessa transformação em escala preparativa.



**Esquema I.1:** Mecanismo da oxidação de Baeyer-Villiger promovida por perácidos, onde:  $G_m$  = grupo migrante.

No entanto, a metodologia clássica apresenta diversas desvantagens porque: (a) os reagentes e solventes halogenados são tóxicos; (b) os perácidos são oxidantes fortes, fazendo com que em sínteses com várias etapas sejam necessárias etapas de proteção e desproteção, para evitar produtos indesejados; (c) os perácidos são sensíveis ao choque e em reações de grande escala o risco de acidentes é maior; (d) a oxidação de Baeyer-Villiger promovida por perácidos não é enantiosseletiva.

Para evitar o uso dos perácidos, foram desenvolvidos procedimentos alternativos. Atualmente, além das condições mais brandas, os trabalhos exploraram o aspecto assimétrico da reação de Baeyer-Villiger, tendo em vista que as lactonas quirais são intermediários valiosos para a química orgânica (síntese de fármacos<sup>48</sup>) e estão presentes na estrutura de diferentes feromônios,<sup>49</sup> fragrâncias<sup>50</sup> e de inúmeras outras moléculas bioativas.<sup>51</sup>

<sup>46</sup> Rens, M.; Meunier, B. *Eur. J. Chem.* **1999**, 737.

<sup>47</sup> (a) Doering, W. E.; Speers, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 5515. (b) Noyori, R.; Kobayashi, H.; Sato, T. *Tetrahedron Lett.* **1980**, 21, 2573. (c) Noyori, R.; Sato, T.; Kobayashi, H. *Tetrahedron Lett.* **1980**, 21, 2569. (d) Chandrasekhar, S.; Roy, C. D. *Tetrahedron Lett.* **1980**, 28, 6371. (e) Crudden, C. M.; Chen, A. C.; Calhoun, L. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 2852. (f) Itoh, Y.; Yamanaka, M.; Mikami, K. *Organic Lett.* **2003**, 25, 4083.

<sup>48</sup> Mazzini, C.; Lebreton, J.; Alphand, V.; Furstoss, R. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 1195.

<sup>49</sup> (a) Baraldi, P. T.; Zarkin, P. H. G.; Vieira, P. C.; Corrêa, A. G. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, 13, 621. (b) Lebreton, J.; Alphand, V.; Furstoss, R. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 7, 1011. (c) Paruch, E.; Ciunik, Z.; Nawrot, J.; Wawrzenczyk, C. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 4973. (d) Stritzke, K.; Schulz, S.; Nishida, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 3884. (e) Clososki, G. C.; Ricci, L. C.; Costa, C. E.; Comasseto, J. V. *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, 15, 809.

<sup>50</sup> Brenna E.; Fuganti, C.; Serra, S. *Tetrahedron: Asymmetry Report Number 54* **2003**, 14, 1.

<sup>51</sup> (a) Alphand, V.; Furstoss, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, 3, 379. (b) Alphand, V.; Furstoss, R.; Moreau, S. P.; Roberts, S. M.; Willetts, A. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1996**, 1867. (c) Murga, J.; García-Fortanet, J.; Carda, M.; Marco, J. A. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 1737.



Levando em consideração o controle quiral da oxidação de Bayer-Villiger, foram desenvolvidos catalisadores de metais de transição<sup>52</sup> e metodologias organo-catalíticas livres de metais.<sup>53</sup> O uso desses catalisadores mostrou modesto sucesso,<sup>54</sup> até a publicação do artigo de Bernini et al. (2003),<sup>55</sup> que apresentou um sistema catalítico eficiente que combina CH<sub>3</sub>ReO<sub>3</sub> com líquidos iônicos. Nos últimos 10 anos, a oxidação de Baeyer-Villiger enzimática vem sendo uma estratégia muito atrativa,<sup>56</sup> pois dessa forma pode-se ter o controle estereosseletivo da reação e, ao mesmo tempo o emprego desses processos biocatalíticos atendem ao compromisso de preservar o meio ambiente.

O biocatalisador equivalente aos peroxi-ácidos é representado pelas mono-oxigenases, que são flavoproteínas. As flavoproteínas são uma sub-classe das oxidases e são divididas em quatro grupos bem definidos:<sup>57</sup> (a) desidrogenases, (b) elétron transferases, (c) oxidases e (d) mono-oxigenases. As mono-oxigenases são as enzimas responsáveis pela oxidação de Baeyer-Villiger e por esse motivo são denominadas “Baeyer-Villiger mono-oxigenases” (BVMO’s). Todas as BVMO’s caracterizadas até hoje são dependentes de NAD(P)H e têm a flavina como grupo prostético.<sup>58</sup> Elas são sub-divididas em dois grupos:<sup>15d</sup>

- as BVMO’s do Tipo I têm a flavina adenina di-nucleotídeo (FAD) como co-fator, utilizam o NADPH como fonte de elétrons e são compostas por sub-unidades idênticas.
- as BVMO’s do Tipo II têm a flavina mono-nucleotídeo (FMN) como co-fator, utilizam o NADH como fonte de elétrons e são compostas por trímeros  $\alpha_2\beta$ .

---

<sup>52</sup> (a) Murahashi S. I., Oda Y., Naota T. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 7557. (b) Inokuchi T., Kanazaki M., Sugimoto T., Torii S. *Synlett* **1994**, 4193. (c) Bolm C., Shlingloff G., Weickhardt K.; *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 3045. (d) Gusso A., Baccin C., Pinna F., Strukul G. *Organometallics* **1994**, 13, 3442. (e) Strukul, G. *Angew. Chem.* **1998**, 37, 1198. (f) Watanabe, A.; Uchida, T.; Ito, K.; Katsuki, T. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 4481.

<sup>53</sup> Murahashi, S. I.; *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2472.

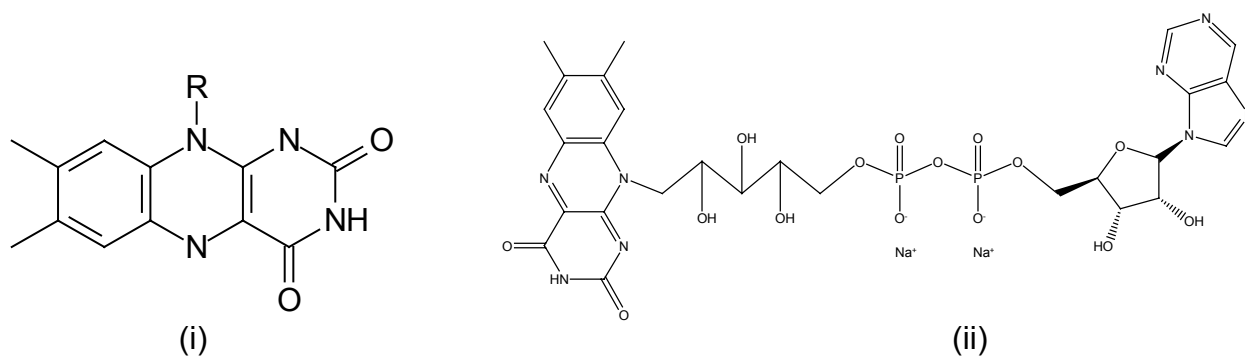
<sup>54</sup> Alphand, V.; Carrea, G.; Wohlgemuth, R.; Furtoss, R.; Woodley, J. M. *Trends in Biotechnol.* **2003**, 21, 318.

<sup>55</sup> Bernini, R.; Coratti, A.; Fabrizi, G.; Goggiamani, A. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 8991.

<sup>56</sup> Para artigos de revisão recentes veja: Stewart, J. D. *Curr. Org. Chem.* **1998**, 2, 195. (b) Roberts, S. M.; Wan, P. W. H. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **1998**, 4, 111. (c) Mihovilovic, M. D.; Müller, B.; Stanetty, P.; *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 271, 3711. (d) Kamerbeek, N. M.; Janssen, D. B.; van Berkel, W. J. H.; Fraaije, M. W. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, 345, 667.

<sup>57</sup> Massey, V. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 22459.

<sup>58</sup> Grupo prostético é uma estrutura organizada e não peptídica de uma proteína.



**Esquema I.2:** Estrutura da flavina (i) e do FAD (ii).

Todas as BVMO's que foram clonadas até o momento são do Tipo I, enquanto que as seqüências genéticas das BVMO's do Tipo II permanecem desconhecidas. Apesar de clonadas, até meados de 2004, ainda não se conhecia a estrutura cristalina das BVMO's. Por apresentarem especificidade frente a diferentes substratos e alta seletividade estérea, as BVMO's despertam um grande interesse industrial. A ciclohexanona mono-oxigenase (EC 1.14.13.22)<sup>59</sup> é a BVMO mais estudada e a primeira a ser caracterizada.<sup>60</sup> Essa enzima mostrou-se capaz de converter mais de 100 substratos não naturais.<sup>15b</sup> Graças a engenharia genética e ao desenvolvimento de processos eficientes em escala preparativa, a aplicação industrial das BVMO's já está sendo alcançada.<sup>61</sup>

Um dos grandes problemas da aplicação sintética das enzimas isoladas é a necessidade de se adicionar no meio reacional o co-fator NADPH. Por ser muito caro, o NADPH tem que ser reciclado *in situ*.<sup>62</sup> Levando em consideração que o metabolismo das células recicla espontaneamente o NADPH, ficou claro ao longo dos anos que o uso de células recombinantes de *Escherichia coli* (contendo a BVMO desejada) é muito mais eficiente e barato do que a abordagem que utiliza as enzimas isoladas.

Em termos econômicos o uso do NADH é muito vantajoso, pois ele é mais barato e estável do que o NADPH. Caso as BVMO's (do Tipo I) expressadas em células de *E. coli* também venham a aceitar o NADH como co-fator, uma alta eficiência

<sup>59</sup> Isolada da *Acinetobacter* sp NCIB 9871. Ref: Donoghue, N. A.; Norris, D. B.; Trudgill, P. W. *Eur. J. Biochem.* **1976**, *63*, 175.

<sup>60</sup> Donoghue, N. A.; Norris, D. B.; Trudgill, P. W. *Eur. J. Biochem.* **1976**, *63*, 175.

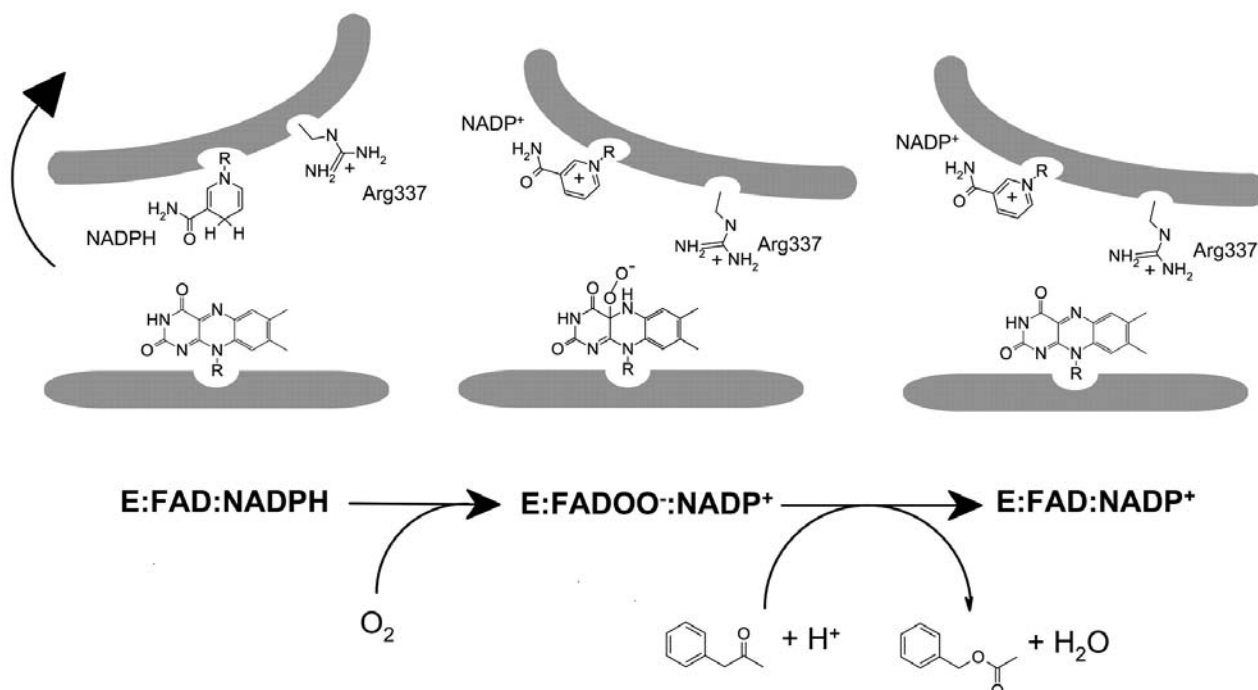
<sup>61</sup> Hilker, I.; Alphand, V.; Wohlgemuth, R.; Furstoss, R. *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 203.

<sup>62</sup> (a) Rissom, S.; Schwarz-Linek, U.; Vogel, M.; Tishkov, V. I.; Kragl, U. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 2523. (b) Zambianchi, F.; Pasta, P.; Carrea, G.; Colonna, S.; Gaggero, J. M.; Woodley, J. M. *Biothechnol. Bioeng.* **2002**, *78*, 488.

catalítica poderá ser alcançada, pois essas células contêm muito mais NADH do que NADPH.<sup>63</sup>

Kamerbeek et al. (2004)<sup>64</sup> sugerem que o resíduo Arg339 de uma seqüência primária de uma HAPMO (acetofenona mono-oxigenase - Tipo I) está envolvido no reconhecimento do NADPH e, visando aumentar a preferência pelo NADH, promoveram mutações genéticas nessa enzima. Outros dois sítios também sofreram modificações genéticas. Os pesquisadores conseguiram uma mutante da HAPMO que apresentava uma elevada preferência pelo co-fator NADH, mas a atividade catalítica dessa enzima mutante se mostrou baixa, isto é, pouco eficiente para aplicações biocatalíticas. De acordo com esse trabalho, a elucidação da estrutura cristalina de qualquer BVMO do Tipo I irá facilitar o estudo e a otimização das características biocatalíticas de BVMO's mutantes.

Alguns meses depois, Mattevi et al. (2004)<sup>65</sup> publicaram a primeira estrutura cristalina de uma BVMO (Tipo I), uma fenilacetona mono-oxigenase (PAMO). Com isso eles apresentaram a conformação do sítio ativo de uma BVMO durante a reação de Baeyer-Villiger e demonstraram que um terminal arginina (nessa enzima a Arg337) participa da estabilização do intermediário de Criegee durante a reação de Baeyer-Villiger (Figura I.1).



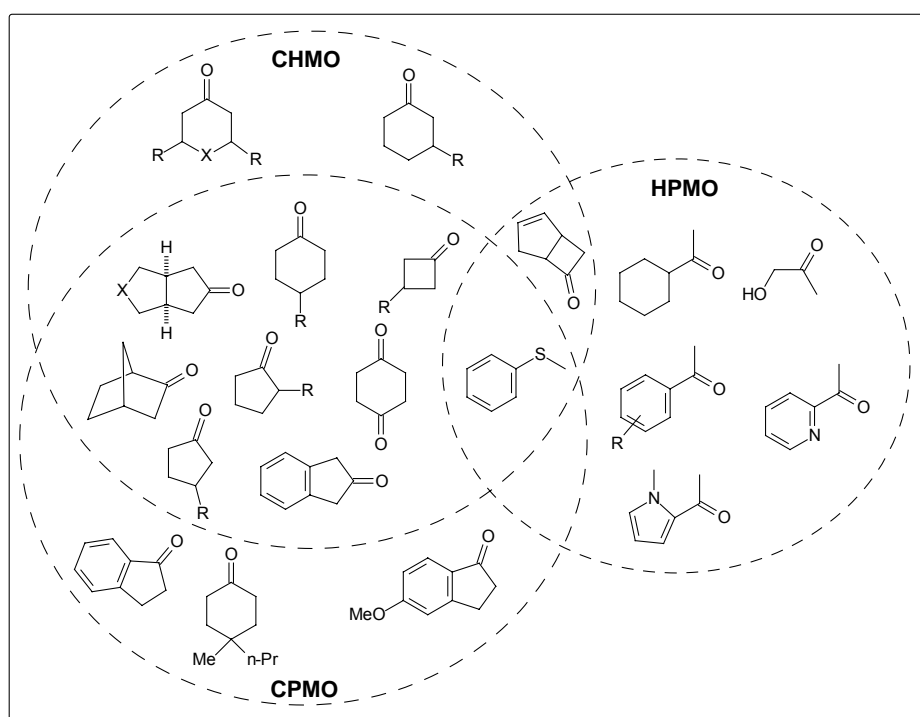
<sup>63</sup> Lundquist, R.; Oliveira, B. M. *J. Biol. Chem.* **1971**, 246, 1107

<sup>64</sup> Kamerbeek, N. M.; Fraaije, M. W.; Janssen, D. B. *Eur. J. Biochem.* **2004**, 271, 2107.

<sup>65</sup> Malito, E.; Alfieri, A.; Fraaije, M. W.; Mattevi, A. *PNAS* **2004**, 101, 13157.

**Figura I.1:** Representação esquemática das conformações do sítio ativo da PAMO durante a reação de Baeyer-Villiger, onde: E = enzima.

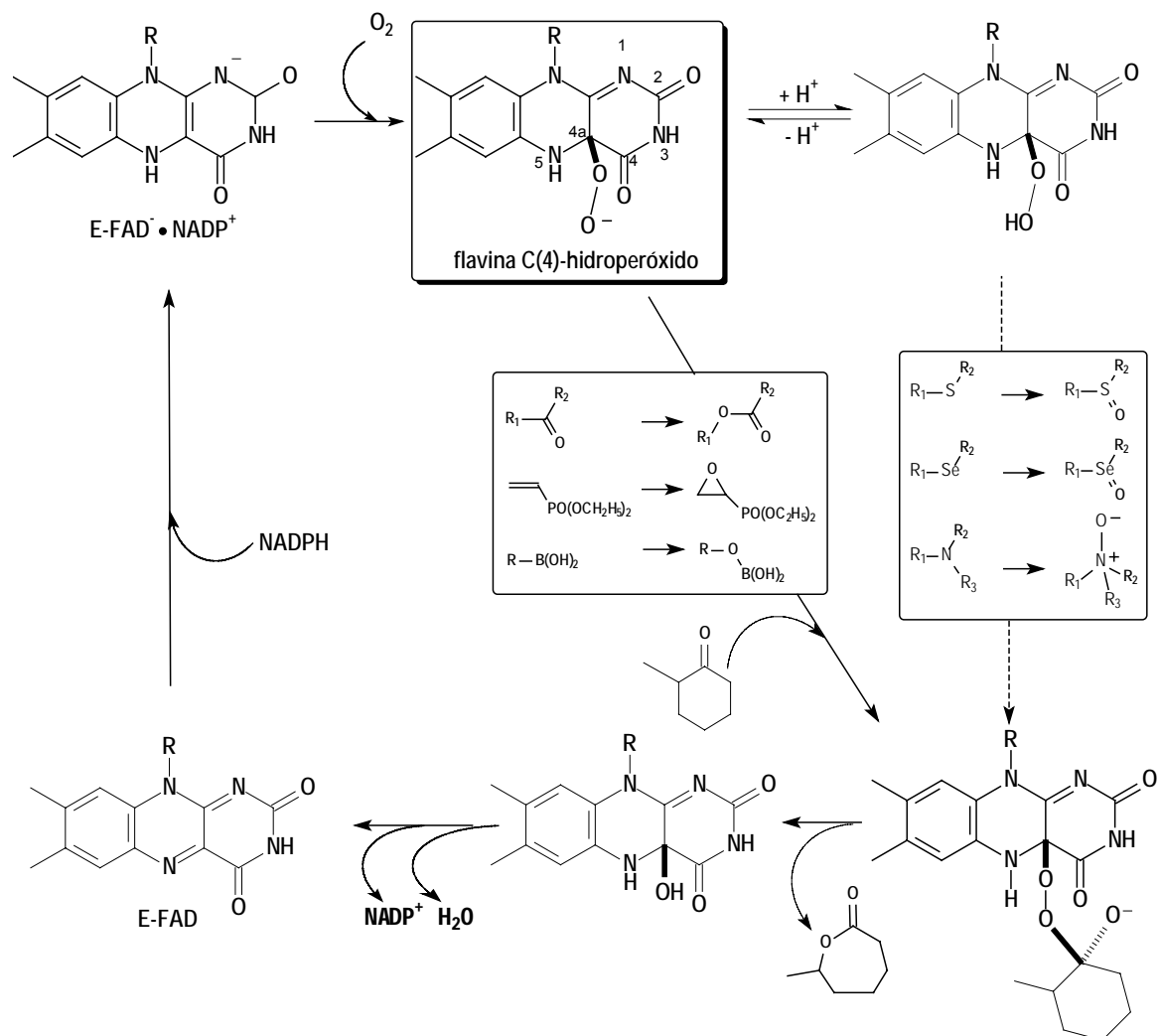
Na mais recente revisão bibliográfica sobre BVMO's, van Berkel et al. (2003)<sup>15d</sup> apresentam as BVMO's que já foram identificadas e com base nesses dados, fizeram um quadro esquemático que correlaciona os substratos estudados com as BVMO's mais comuns: a ciclohexanona, a ciclopentanona e a acetofenona mono-oxigenases (Figura I.2).



**Figura I.2:** Alguns substratos representativos para as enzimas Baeyer-Villiger mono-oxigenases.

O caráter ambivalente da flavina C(4)-hidroperóxido é responsável pela versatilidade das CHMO's, que são capazes de oxidar tanto substratos ricos como aqueles deficientes de elétrons. As CHMO's podem promover a oxigenação nucleofílica de cetonas (oxidação de Baeyer-Villiger), de olefinas e do boro; bem como

podem oxigenar eletrofilicamente vários heteroátomos como o enxofre, o selênio, o nitrogênio e o fósforo (Esquema I.3).<sup>66</sup>



**Esquema I.3:** Mecanismo de reações de oxidação mediadas por mono-oxigenases, onde E = enzima.

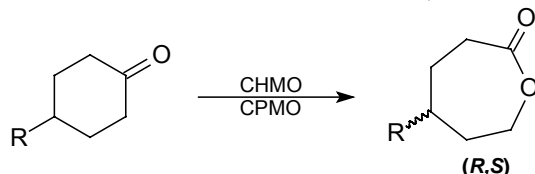
Sabe-se que as diferentes BVMO's apresentam diferenças catalíticas e estruturais. Wang et al. (2003)<sup>67</sup> compararam o potencial da CPMO e da CHMO expressas em *E. coli* frente a diferentes cetonas pró-quirais. A CPMO produziu

<sup>66</sup> Walsh, C. T.; Chen, Y. C. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *27*, 333.

<sup>67</sup> Wang, S.; Kaeyser, M. M.; Iwaki, H.; Lau, P. C. K. *J. Mol. Catal B: Enzymatic* **2003**, *22*, 211.

preferencialmente um dos enantiômeros da lactona correspondente enquanto que a CHMO gerou o seu antípoda (Tabela I.1). Esse trabalho mostrou que duas enzimas podem ser complementares e, quando purificadas, são reagentes muito úteis para a química orgânica sintética.

**Tabela I.1:** Oxidação de ciclohexanonas substituídas, catalisadas por CPMO e CHMO.



Substratos (R)	CHMO ( <i>E. coli</i> )		CPMO ( <i>E. coli</i> )	
	Rendimento (%)	e.e. (%)	Rendimento (%)	e.e. (%)
H	84	97 (S)	72	85 (S)
OMe	84	78 (S)	71	28 (S)
OEt	-	-	90	37 <sup>a</sup>
Oalila	-	-	80	45(S)
OBn	-	-	95	75(S)
OAc	-	-	81	5
COOEt	15	93 <sup>b</sup>	83	64 <sup>b</sup>
I	61	97 (S)	65	82 (R)
Br	63	97 (S)	70	64 (R)
Cl	56	97 (S)	64	34 (R)

<sup>a</sup> não determinado; <sup>b</sup> enantiômeros opostos foram obtidos em duas biotransformações

Foi apresentado um trabalho por Stewart et al. (2004),<sup>68</sup> no qual são utilizadas cinco diferentes CHMO e essas enzimas foram seletivas na conversão de 2- e 4- alquil-cetonas. A oxidação transformou preferencialmente as cetonas nos isômeros (S) das lactonas correspondentes. Segundo os autores, um dos grandes desafios atuais é descobrir BVMO's que sejam (R)-seletivas.

Outro tópico abordado na literatura é a conversão assimétrica de diferentes grupos funcionais, utilizando o sistema enzimático de um microrganismo. No entanto, existem poucos exemplos da geração de mais de um centro quiral a partir de um material de partida não quiral. Algumas reações são conhecidas, como por exemplo a redução de di-cetonas a dióis quirais,<sup>69</sup> a di-oxidação de anéis aromáticos por di-oxigenases<sup>70</sup> e a conversão de cetonas em dióis quirais usando um mesmo microrganismo que promove a redução da cetona e a hidroxilação do resíduo alquídico.<sup>71</sup> Um trabalho sobre esse assunto foi publicado por Collado et al. (2003),<sup>28</sup> no qual os autores examinam as bioconversões de substratos que possuem dois

<sup>68</sup> Kyte, B. G.; Rouvière, P.; Cheng, Q.; Stewart, J. D. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 12.

<sup>69</sup> Conceição, G. J. A.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *14*, 2327.

<sup>70</sup> Holland, H. L.; Brown, F. M.; Barret, F. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *30*, 292.

<sup>71</sup> Bustillo, A. J.; García-Pajón, J. A.; Hernández-Galán, R.; Collado, I. G. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 3775.

grupos funcionais: sulfeto e carbonila. Os dois biocatalisadores utilizados nesse trabalho foram capazes de gerar dois centros quirais nos substratos estudados. Esses resultados se mostraram muito interessantes e deixaram claro que esse campo pouco explorado da biocatálise ainda tem muito a oferecer.

## **I.2 – Objetivos**

Este trabalho de dissertação teve como objetivo explorar o potencial enzimático de fungos isolados no Brasil, avaliando por meio de triagem enzimática a atividade das BVMO's presentes nos sistemas enzimáticos desses microrganismos. Foram avaliadas as atividades das enzimas frente a cetonas cíclicas e aromáticas. Além disso também tivemos como objetivo estudar outra transformação assimétrica promovida por álcool desidrogenases (ADH) presentes nessas células. Essas enzimas catalisam a reação de biorredução e competem com as BVMO's pelo substrato, podendo transformar as cetonas em álcoois quirais. Os álcoois, assim como as lactonas quirais, são materiais de partida de elevada importância sintética.

Por fim, sintetizamos uma classe de moléculas com dois grupos funcionais (sulfeto e cetona, seleneto e cetona) e aplicamos nesses compostos os biocatalisadores selecionados por triagem, avaliando as transformações promovidas por esses microrganismos.

Este capítulo está dividido em três partes para melhor entendimento do trabalho. A separação da primeira e da segunda parte foi feita tendo como base a classe de mono-oxigenase responsável pela transformação do substrato. A terceira parte é relativa a síntese de substratos com dois grupos funcionais e ao estudo de suas biotransformações.

II.1 – Identificação da atividade de Baeyer-Villiger mono-oxigenases (CHMO e CPMO) e de álcool desidrogenases em fungos.....pág. 10;

II.2 – Identificação da atividade de Baeyer-Villiger mono-oxigenase (APMO) e de álcool desidrogenases em fungos.....pág. 28;

II.3 – Síntese e transformações biológicas de moléculas bi-funcionalizadas.....pág. 40;

II.4 – Conclusões.....pág. 68.

## **II.1 - Identificação da atividade de Baeyer-Villiger mono-oxigenases (CHMO e CPMO) e de álcool desidrogenases em fungos**

Para melhor explorar o potencial enzimático dos fungos e visando também elaborar uma biblioteca das transformações promovidas por estes microrganismos, foi estudado nesta etapa do trabalho um único gênero de fungo que apresenta diferentes classes de mono-oxigenases, enzimas responsáveis pela biotransformação de cetonas em ésteres. Estudos preliminares<sup>72</sup> apontaram a presença destas enzimas no gênero *Aspergillus*. Tendo em vista essas evidências, foi feita uma triagem das linhagens de *Aspergillus* coletados em diferentes partes do Brasil, utilizando para isso cetonas cíclicas, que são substratos modelo para este tipo de estudo.<sup>73</sup> A 2- e a 4-metil-ciclohexanona (**1a** e **1b**, Esquema II.1) também podem ser consideradas sondas para a identificação do tipo de oxidase presente no microrganismo. Conforme o levantamento

---

<sup>72</sup> a) Porto, A. L. M. *Isolamento e Seleção de Microrganismos Brasileiros para Reações de Biocatálise e Produção de Metabólitos*. Campinas: Instituto de Química; Universidade Estadual de Campinas, 2002. Tese de doutorado em Química Orgânica. (b) Comasseto, J. V.; Omori, A. T.; Andrade, L. H.; Porto, A. L. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 711. (c) Comasseto, J. V.; Andrade, L. H.; Omori, A. T.; Assis, L. F.; Porto, A. L. M. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2004**, *29*, 55.





Na avaliação do potencial enzimático dos *Aspergillus* foram estudadas nove linhagens desse fungo (Tabela II.1) frente às duas cetonas (1a e 1b) apresentadas no Esquema II.1. O objetivo desta parte do trabalho foi identificar microrganismos que produzem enzimas com elevado potencial catalítico para a obtenção de lactonas e álcoois enantiomericamente enriquecidos.

**Tabela II.1** – Origem das linhagens estudadas.

<b>Linhagens estudadas</b>	<b>Origem</b>	<b>Colecção de Cultura</b>
<i>A. terreus</i> SSP 1498	Connecticut, USA	
<i>A. terreus</i> CCT 5179	Campinas-SP	
<i>A. terreus</i> CCT 4083	Chapadinha –MA	
<i>A. foetidus</i> CCT 2683	-	
<i>A. niger</i> SSP 1078	Paranapiacaba-SP	
<i>A. terreus</i> URM 3571	Recife	
<i>A. terreus</i> URM 3422	Recife	
<i>A. terreus</i> URM 4602	Recife	
<i>A. terreus</i> URM 3371	Recife	

### II.1.1 –Estudo de metodologias de biotransformação

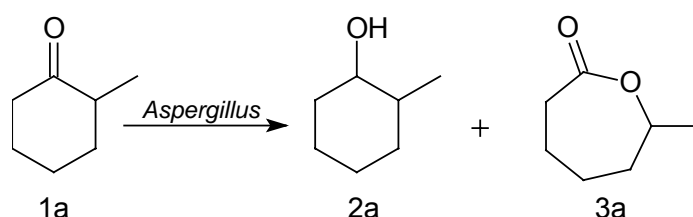
Inicialmente, foi feito um estudo para se comparar o potencial enzimático dos fungos em diferentes condições reacionais. Para isso foram escolhidas aleatoriamente quatro linhagens de *Aspergillus*. Os fatores de comparação foram a conversão do substrato e o excesso enantiomérico dos produtos. Avaliou-se então o potencial enzimático dos fungos em três abordagens usualmente empregadas em reações de biocatálise: células em crescimento (**a**), células ressuspensas (**1 e 3g**; **b e c**) em solução tampão e enzimas excretadas pelos fungos no filtrado (**d**) [meio de cultura de crescimento]. Todos os experimentos foram realizados conforme procedimento **III.3.1** (Parte experimental). Os frascos reacionais foram preparados da seguinte maneira:

- a) Em um Erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL de solução tampão fosfato (pH=7), foi adicionada a biomassa do fungo (**1,0 g**) e o substrato (16,5 mg; 20 µL).
- b) Em um Erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL de solução tampão fosfato (pH=7), foi adicionada a biomassa do fungo (**3,0 g**) e o substrato (16,5 mg; 20 µL).

- c) Em um Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura com **fungos em crescimento** foi adicionado o substrato (16,5 mg; 20  $\mu$ L).
- d) Em um Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do **filtrado** (meio de cultura de crescimento) foi adicionado o substrato (16,5 mg; 20  $\mu$ L).

Nas Tabelas II.2 e II.3 apresentam-se os resultados da avaliação do potencial enzimático dos fungos em diferentes condições reacionais.

**Tabela II.2:** Biotransformação da cetona **1a** levando ao álcool **2a** e à lactona **3a**.

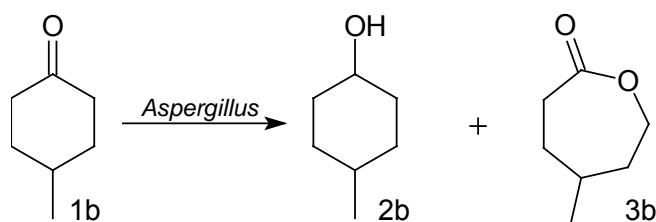


Linha	Microrganismo	T (h)	Cetona 1a		Álcool 2a			Lactona 3a		
			c <sup>a</sup> (%)	e.e. (%)	c <sup>a</sup> (%)	cis:trans	e.e. (%) cis trans	c <sup>a</sup> (%)	e.e. (%)	
1	<b>A. terreus SSP 1498</b> - Células ressuspensas (1g)	24	9	54 (R)	27	26:74	78	80	62	35 (R)
		48	-	-	22	0:100	-	80	78	51 (R)
2	- Células ressuspensas (3g)	24	16	32 (R)	48	0:100	70	82	35	43 (R)
		72	1	-	37	0:100	65	82	62	71 (R)
3	- Células em crescimento	24	49	49 (S)	47	79:21	75	80	3	99 (S)
		48	21	23 (S)	74	64:36	70	80	5	99 (S)
4	- Filtrado	24	99	-	-	-	-	-	-	-
		48	99	-	-	-	-	-	-	-
5	<b>A. terreus CCT 5179</b> - Células ressuspensas (1g)	24	25	58 (S)	72	69:31	78	98	2	63 (R)
		96	-	-	60	39:61	46	98	34	42 (R)
6	- Células ressuspensas (3g)	24	23	62 (S)	74	72:28	72	98	2	-
		96	-	-	61	37:63	27	98	31	44 (R)
7	- Células em crescimento	24	49	84 (S)	50	81:19	77	95	-	-
		48	22	79 (S)	78	76:24	62	95	-	-
8	- Filtrado	24	99	-	-	-	-	-	-	-
		96	44	65 (S)	55	84:16	75	95	-	-
9	<b>A. terreus CCT 4083</b> - Células ressuspensas (1g)	24	29	66 (S)	68	76:24	72	98	3	70 (S)
		48	8	-	81	66:34	70	98	10	33 (S)
10	- Células ressuspensas (3g)	24	24	64 (S)	72	74:26	70	98	3	70 (S)
		48	9	24 (R)	73	68:32	61	98	17	33 (S)
11	- Células em crescimento	24	40	81 (S)	60	83:17	70	98	-	-
		48	23	75 (S)	77	72:28	66	98	-	-
12	- Filtrado	24	99	-	-	-	-	-	-	-
		72	92	13 (S)	8	95:05	66	nd	-	-
13	<b>A. niger SSP 1078</b> - Células ressuspensas (1g)	48	66	-	29	32:68	49	95	4	15 (R)
		96	50	17 (S)	39	08:92	40	83	10	-

14	- Células ressuspensas (3g)	48	65	-	26	23:77	29	91	8	80 (R)
		96	53	36 (S)	32	07:93	59	86	14	9 (R)
15	- Células em crescimento	48	74	-	23	16:84	47	91	2	99 (R)
		96	63	27 (S)	27	08:92	58	85	9	53 (R)
16	- Filtrado	48	98	-	2	-	nd	-	-	-
		96	95	4	5	100:0	98	-	-	-

<sup>a</sup>c: concentração determinada por análise cromatográfica (método 1); e.e.: excesso enantiomérico; nd: não determinado; Configuração absoluta está entre parênteses. <sup>b</sup>e.e. para o álcool **2a**: 29-98% [*trans*-álcool: e.e. em relação ao (+)-(1S,2S); *cis*-álcool não foi isolado devido a baixa conversão].

**Tabela II.3:** Biotransformação da cetona **1b** levando ao álcool **2b** e à lactona **3b**.



Linha	Microrganismo	T (h)	Álcool 2b		Lactona 3b	
			c <sup>a</sup> (%)	<i>cis:trans</i>	c <sup>a</sup> (%)	e.e. (%)
1	<b>A. terreus SSP 1498</b> · Células ressuspensas (1g)	24	19	40:60	81	87 (R)
		-	-	-	-	-
2	· Células ressuspensas (3g)	24	85	65:35	10	87 (R)
		72	95	0:100	-	-
3	· Células em crescimento	24	31	-	-	-
		48	58	35:65	-	-
4	· Filtrado	24	-	-	-	-
		48	-	-	-	-
5	<b>A. terreus CCT 5179</b> · Células ressuspensas (1g)	24	65	52:48	4	73 (R)
		96	70	02:98	28	91 (R)
6	· Células ressuspensas (3g)	24	65	51:49	5	91 (R)
		96	62	04:96	36	91 (R)
7	· Células em crescimento	24	63	73:27	-	-
		96	95	66:34	-	-
8	· Filtrado	24	-	-	-	-
		96	22	51:49	-	-
9	<b>A. terreus CCT 4083</b> · Células ressuspensas (1g)	24	53	-	3	70 (R)
		48	77	57:43	10	90 (R)
10	· Células ressuspensas (3g)	24	52	53:47	7	78 (R)
		48	50	38:62	35	86 (R)
11	· Células em crescimento	24	30	60:40	-	-
12	· Filtrado	24	-	-	-	-
		72	23	64:36	-	-
13	<b>A. niger SSP 1078</b> · Células ressuspensas (1g)	48	16	57:43	7	99 (R)
		96	28	34:66	12	99 (R)
14	· Células ressuspensas (3g)	48	10	43:57	12	99 (R)

		96	20	29:71	21	99 ( <i>R</i> )
15	Células em crescimento	48	9	53:47	-	-
		96	13	37:73	15	99 ( <i>R</i> )
16	Filtrado	48	-	-	-	-
		96	-	-	-	-

<sup>a</sup>c: concentração determinada por análise cromatográfica (método 1); e.e.: excesso enantiomérico; Configuração absoluta está entre parênteses

A análise dos produtos formados nas biotransformações indica que todas as linhagens de *Aspergillus* estudadas possuem enzimas que promovem a redução e a oxidação de Baeyer-Villiger de cetonas cíclicas. Em alguns casos o 2-metil-cicloexanol (**2a**) e a 7-metiloxepan-2-ona (**3a**) foram obtidos com boas seletividades. Por exemplo, quando a biotransformação foi feita com o *A. terreus* SSP 1498 (3g de células) o *trans*-2-metil-cicloexanol **2a** foi obtido com 82% e.e. (Tabela II.2, linha 2). Usando 1g de células, a mesma seletividade foi obtida (Tabela II.2, linha 1). A lactona **3a** foi formada em todos procedimentos avaliados, exceto quando o **filtrado** foi utilizado como fonte enzimática (Tabela II.2, linhas 4, 8, 12, 16, 20).

Em alguns casos a lactona quiral **3a** foi obtida com excesso enantiomérico maior que 99%, mas em baixa conversão. É possível verificar que o enantiômero (*R*) da lactona **3a** foi obtido preferencialmente usando três das quatro linhagens, sendo que apenas o sistema enzimático do *A. terreus* CCT 4083 converteu preferencialmente a cetona **1a** no enantiômero (*S*) da lactona **3a** (Tabela II.2, linhas 9 e 10). Observa-se também que o *A. terreus* SSP 1498 promove um enriquecimento enantiomérico da lactona **3a** com o passar do tempo (Tabela II.2, linhas 1 e 2). Isso pode indicar que um dos enantiômeros da lactona formada sofre hidrólise preferencialmente (veja tópico II.1.2).

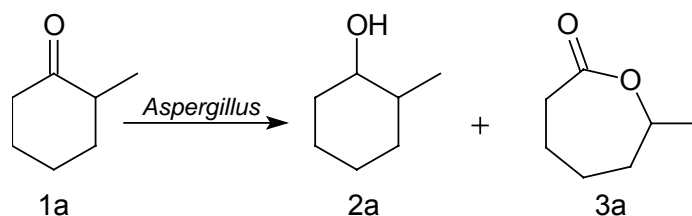
A cetona residual foi obtida com excesso enantiomérico de 81% e 84% usando as células em crescimento do *A. terreus* CCT 5179 e *A. terreus* CCT 4083 (Tabela II.2, linhas 7 e 11, respectivamente). A resolução enzimática consome preferencialmente o enantiômero (*S*) da cetona residual.

Resultados similares foram obtidos quando o substrato foi a 4-metil-cicloexanona (**1b**). A lactona **3b** foi obtida com excesso enantiomérico maior do que 99%. Assim como no caso da lactona **3a**, o enantiômero (*R*) da lactona **3b** também foi formado preferencialmente por todas as linhagens. A maior enantiosseletividade foi obtida quando o *A. niger* SSP 1078 foi utilizado como biocatalisador (Tabela II.3, linhas 13-15).

A redução da cetona levando ao álcool correspondente, promovida por todas as linhagens, seguiu um comportamento semelhante para a cetona **1a** e **1b**. A cetona **1b** foi reduzida ao álcool correspondente **2b** com uma ótima conversão de 95% e com razão *cis:trans* de 0:100 (Tabela II.3, linha 2).

De acordo com os resultados das diferentes metodologias de triagem, pode-se concluir que as Baeyer-Villiger mono-oxigenases e as álcool desidrogenases são enzimas pouco ou não são excretadas no **filtrado** (meio de cultura de crescimento). Portanto o uso do **filtrado** não foi adequado como biocatalisador. Enquanto que a metodologia que utiliza como biocatalisador as células em crescimento, eliminando a etapa de filtração das células, apesar de ser muito prática este procedimento tem como desvantagem a baixa seletividade das reações. Isso pode ocorrer pois ao se manter o meio de cultura nutritivo no meio reacional, a massa celular tende a continuar se desenvolvendo e, para isso pode utilizar indiscriminadamente tanto o extrato de malte quanto o substrato (**1a,b**) e os produtos (**2a,b** e **3a,b**) como fonte de carbono. Alguns experimentos com células em crescimento se apresentaram promissores, mas os melhores resultados para as células ressuspensas demonstraram que este procedimento é o mais adequado para efetuar a triagem dos *Aspergillus*. Como os resultados das biotransformações usando 1 e 3g de células ressuspensas se mostraram semelhantes, o uso de 3g de células ressuspensas foi adotado na análise do potencial catalítico das linhagens de *Aspergillus* remanescentes: *A. terreus* CCT 3571, *A. terreus* CCT 3422, *A. foetidus* CCT 2683, *A. terreus* CCT 4602 e *A. terreus* CCT 3371. Os resultados obtidos na biotransformação das cetonas **1a,b** são apresentados nas Tabelas II.4 e II.5.

**Tabela II.4:** Biotransformação da cetona **1a** levando ao álcool **2a** e à lactona **3a**.

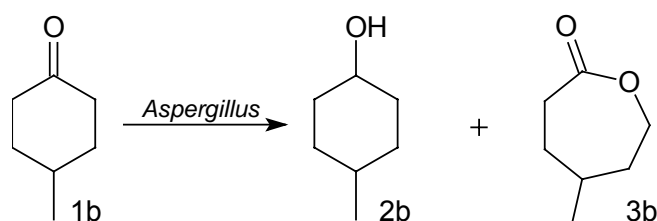


Linha	Microrganismo	T (h)	Cetona 1a		Álcool 2a			Lactona 3a		
			c <sup>a</sup> (%)	e.e. (%)	c <sup>a</sup> (%)	<i>cis:trans</i>	e.e. (%) <i>cis</i> <i>trans</i>		c <sup>a</sup> (%)	e.e. (%)
1	<i>A. terreus</i> URM 3571	24	41	52 (S)	54	76:26	81	88	4	52 (R)
		48	14	20 (S)	77	65:35	79	89	8	-

2	<i>A. terreus</i> URM 3422	24	40	-	60	59:41	72	97	-	-
		48	24	57 (S)	73	48:52	75	95	3	30 (R)
3	<i>A. foetidus</i> CCT 2683	24	96	-	4	-	56	94	-	-
		48	93	-	7	32:68	25	85	-	-
4	<i>A. terreus</i> URM 4602	24	27	49 (S)	70	75:25	47	80	3	50 (R)
		48	13	-	81	68:32	41	79	6	-
5	<i>A. terreus</i> URM 3371	24	6	65 (R)	80	14:86	81	83	11	78 (R)
		48	-	-	80	0:100	72	81	20	76 (R)

<sup>a</sup>c: concentração determinada por análise cromatográfica (método 1); e.e.: excesso enantiomérico; configuração absoluta está entre parênteses. e.e. para o álcool **2a**: 41-97% [*trans*-álcool: e.e. em relação ao (+)-(1S,2S); *cis*-álcool não foi isolado devido a baixa conversão].

**Tabela II.5:** Biotransformação da cetona **1b** levando ao álcool **2b** e à lactona **3b**.



Linha	Microrganismo	T (h)	Álcool 2b		Lactona 3b	
			c <sup>a</sup> (%)	<i>cis:trans</i>	c <sup>a</sup> (%)	e.e. (%)
Células Ressuspensas (3g)						
1	<i>A. terreus</i> URM 3571	24	23	63:37	8	78 (R)
		96	30	54:46	68	91 (R)
2	<i>A. terreus</i> URM 3422	24	49	52:48	-	-
		96	76	69:21	4	53 (R)
3	<i>A. foetidus</i> CCT 2683	24	6	70:30	-	-
		96	10	12:88	-	-
4	<i>A. terreus</i> URM 4602	24	75	86:14	-	-
		96	80	79:21	16	90 (R)
5	<i>A. terreus</i> URM 3371	24	67	31:69	29	93 (R)
		48	55	22:78	43	97 (R)

<sup>a</sup>c: concentração determinada por análise cromatográfica (método 1); e.e.: excesso enantiomérico; configuração absoluta está entre parênteses.

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas II.4 e II.5, a melhor linhagem para promover a reação de Bayer-Villiger foi o *A. terreus* CCT 3371 para ambas cetonas, **1a** e **1b** (Tabelas II.4 e II.5, linhas 5). As lactonas **3a** e **3b** foram obtidas com 78% e 97% de e.e., respectivamente. Um incremento do excesso enantiomérico foi observado com o progresso da reação. A mesma linhagem transformou a cetona **1a** no álcool correspondente **2a** com uma razão *cis:trans* de 0:100 (Tabela II.4, linha 5).

Além da redução e da oxidação de Baeyer-Villiger das cetonas, foi observado um enriquecimento da mistura diastereomérica dos álcoois (**2a** e **2b**) inicialmente

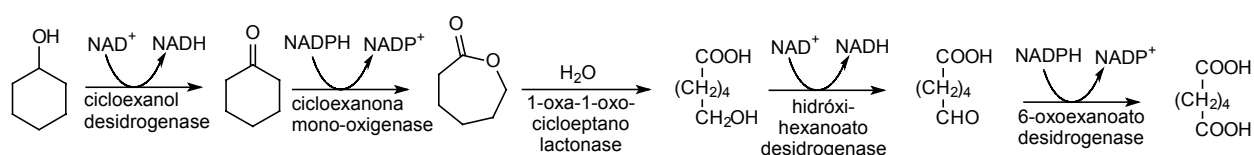
formada. O álcool **2b**, formado inicialmente com uma razão *cis:trans* de 65:35, foi transformado no isômero *trans* exclusivamente pela ação do *A. terreus* SSP 1498 (Tabela II.3, linha 2). O mesmo comportamento pode ser observado com o álcool **2a** formado inicialmente com razão *cis:trans* de 26:74 (Tabela II.2, linha 2). Tendo como base estes resultados, foi feito um estudo detalhado do enriquecimento das misturas *cis:trans* dos álcoois **2a,b** e também da mistura (*R:S*) das lactonas **3a,b** (tópico II.1.2)

### II.1.2 – Transformações dos álcoois (2a,b) e das lactonas (3a,b)

Com o intuito de elucidar o enriquecimento das misturas isoméricas dos produtos formados nas biotransformações, os experimentos foram montados reproduzindo a condição reacional adotada como a mais adequada para nosso sistema biocatalítico (tópico II.1.1).

Inicialmente foi preparada a mistura diastereomérica do álcool **2a** (razão *cis:trans* 38:62) e a mistura *cis-trans* do álcool **2b** (razão 34:66), a partir da redução das cetonas correspondentes com NaBH<sub>4</sub>. Após sua preparação, as mesmas foram submetidas a **3g** de células do *A. terreus* SSP 1498 em meio tamponado. As transformações foram monitoradas por análise cromatográfica de alíquotas retiradas a cada 24 horas (Tabela II.6), utilizando como padrão interno a 1-(4-metoxifenil)etanona, conforme procedimento III.3.2 (Parte experimental).

No caso da mistura diastereomérica do álcool **2a**, ocorreu oxidação preferencial do *cis-2a* à cetona correspondente (Tabela II.6, linha 2). A oxidação é apenas a primeira etapa da degradação do álcool pelo sistema enzimático do microrganismo, no qual uma mono-oxigenase também atua. Uma proposta deste mecanismo de degradação foi apresentada (Esquema II.2) por Iwaki et al. (1999)<sup>34a</sup> e Cheng et al. (2000),<sup>74b</sup> no qual podemos notar a presença da lactona correspondente, que também é detectada no decorrer da reação (Tabela II.6, linha 3).

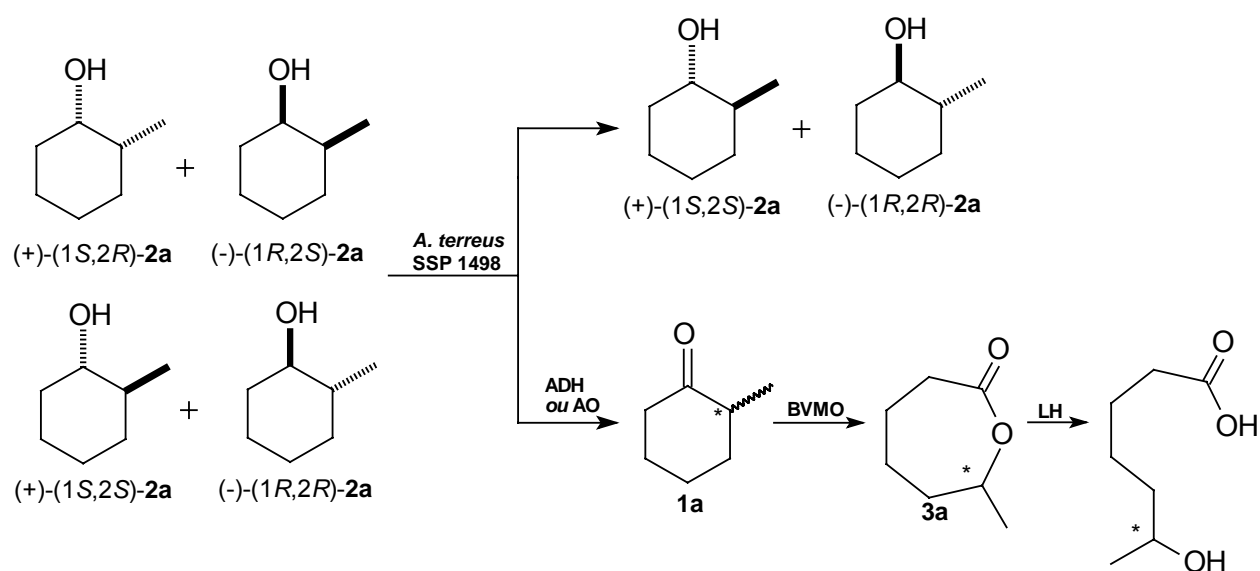


<sup>74</sup> (a) Iwaki, H.; Hasegawa, Y.; Teraoka, M.; Tokuyama, T.; Bergeron, H.; Lau, P. C. K.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 5158.  
 (b) Cheng, Q.; Thomas, S. M.; Kostichka, K.; Valentine, J. R.; Nagarajan, V.; *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 4744.



**Esquema II.2:** Seqüência metabólica do cicloexanol por uma *Acinetobacter* nativa, onde: CHMO = Cicloexanona mono-oxigenase.


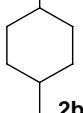
A baixa detecção dos intermediários (cetona e lactona) pode ser explicada pela alta taxa de consumo dos mesmos, visto que as enzimas do microrganismo atuam simultaneamente no meio reacional. Depois de 72 horas de reação, o *trans*-2-metilcicloexanol (**2a**) foi obtido quase que exclusivamente (5:95 razão *cis:trans*, Tabela II.6, linha 4). Uma seqüência de enriquecimento da mistura diastereomérica do álcool **2a** é proposta (Esquema II.3), baseada nas análises cromatográficas das transformações.



**Esquema II.3:** Enriquecimento da mistura diastereomérica do álcool **2a** pelo *A. terreus* SSP 1498. Onde: ADH = Álcool desidrogenase, AO = Álcool oxidase, BVMO = Baeyer-Villiger mono-oxigenase, LH = Lactona hidrolase.

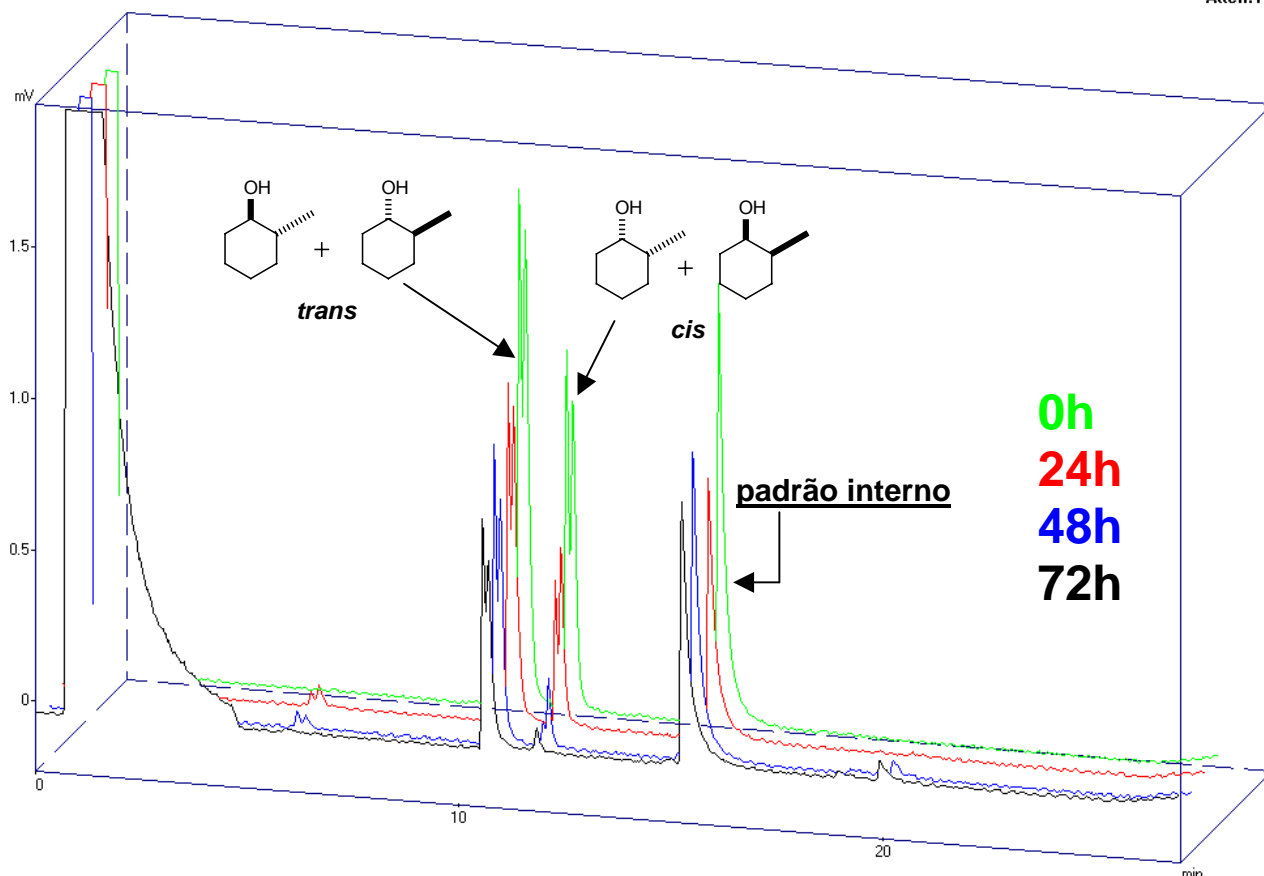
**Tabela II.6:** Biotransformação das cetonas (**2a** e **2b**) utilizando células de *Aspergillus terreus* SSP 1498.

Linha	Álcool	T (h)	Cetona 1 c <sup>a,b</sup> (%)	Álcool 2 c <sup>a</sup> (%)	<i>cis:trans</i> <sup>b</sup>	Lactona 3 c <sup>a,b</sup> (%)
1		0	-	100	38:62	-
2		24	3	86	31:69	-
3		48	3	46	14:86	2
4		72	-	37	5:95	2

5		0	-	100	34:66	-
6		24	6	86	23:73	-
7		48	1	39	4:96	1
8		72	0	39	0:100	-

<sup>a</sup>c: concentração determinada por análise cromatográfica usando padrão interno (método 1); <sup>b</sup> não foi observada enantiosseletividade na transformação.

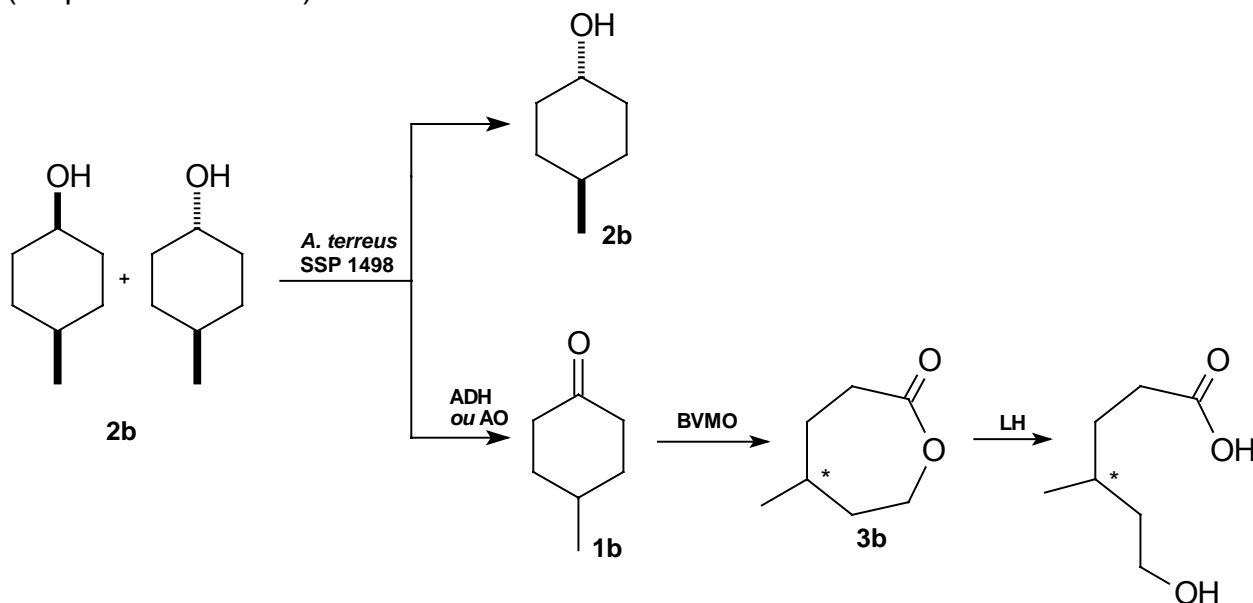
Atten:1



**Figura II.2:** Cromatogramas do enriquecimento da mistura diastereomérica do álcool **2a** (método 1).

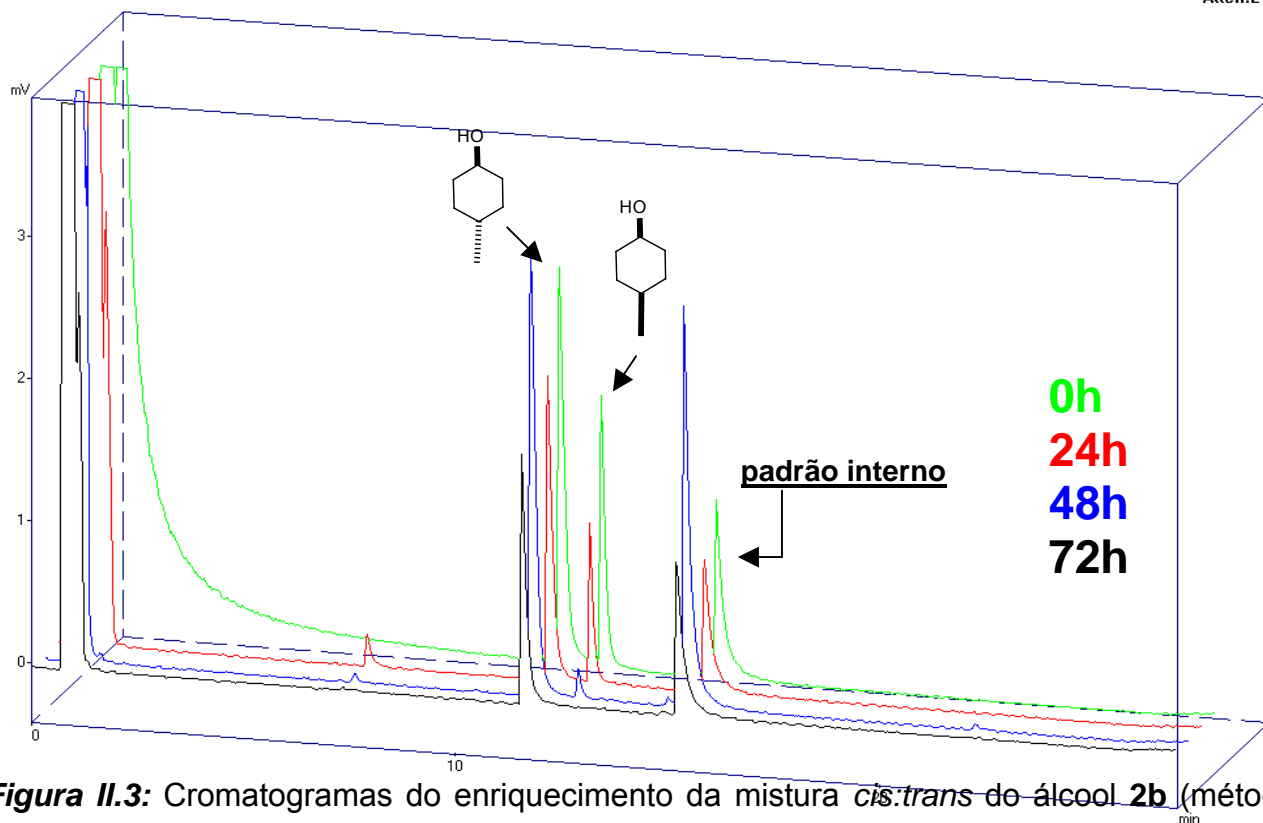
A mistura *cis:trans* do álcool **2b** apresentava inicialmente uma razão de 34:66. Dos dois isômeros, o mais reativo é o *cis*, uma vez que este sofreu degradação preferencial. Após 72 horas de reação, apenas o isômero *trans* do álcool **2b** foi detectado (Tabela II.6, linha 8). A cetona e a lactona correspondentes (**1b** e **3b**) também foram detectados em pequenas quantidades. De acordo com os resultados, assume-se que o *A. terreus* SSP 1498 promove uma oxidação seletiva de um dos isômeros do álcool **2b**, levando à cetona correspondente.

As cetonas **1a** e **1b** são então oxidadas às lactonas correspondentes (**3a** e **3b**) pela Baeyer-Villiger mono-oxigenase e posteriormente sofrem reação de hidrólise (Esquemas II.3 e II.4).



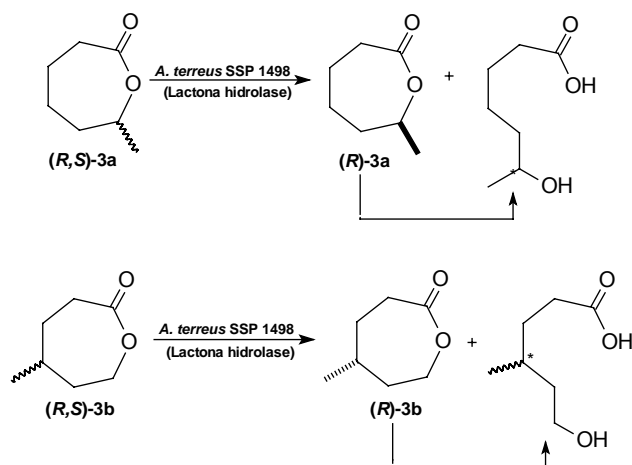
**Esquema II.4:** Enriquecimento da mistura *cis:trans* do álcool **2b** pelo *A. terreus* SSP 1498. Onde: ADH = Álcool desidrogenase, AO = Álcool oxidase, BVMO = Baeyer-Villiger mono-oxigenase, LH = Lactona hidrolase.

Atten:2



**Figura II.3:** Cromatogramas do enriquecimento da mistura *cis:trans* do álcool **2b** (método 1).

A proposta biocatalítica de degradação dos álcoois também é suportada pela biotransformação das lactonas racêmicas **3a** e **3b** (Esquema II.5). Para os estudos de resolução cinética destas lactonas, foi utilizado o mesmo procedimento do enriquecimento das misturas isoméricas dos álcoois **2a** e **2b**. Como pode ser observado na Tabela II.7, a biotransformação de **3a** promove a hidrólise do enantiômero (S) preferencialmente, levando a um aumento do excesso enantiomérico em favor de (R)-**3a**. Após 72 horas de reação, a lactona (R)-**3a** foi detectada com excesso enantiomérico de 66% e rendimento cromatográfico de 20%. Um comportamento similar pode ser observado para a lactona **3b**, que sofreu degradação completa depois de 48 horas de reação. Todos esses resultados suportam a proposta de que os *Aspergillus* possuem uma seqüência metabólica análoga à apresentada no Esquema II.2.

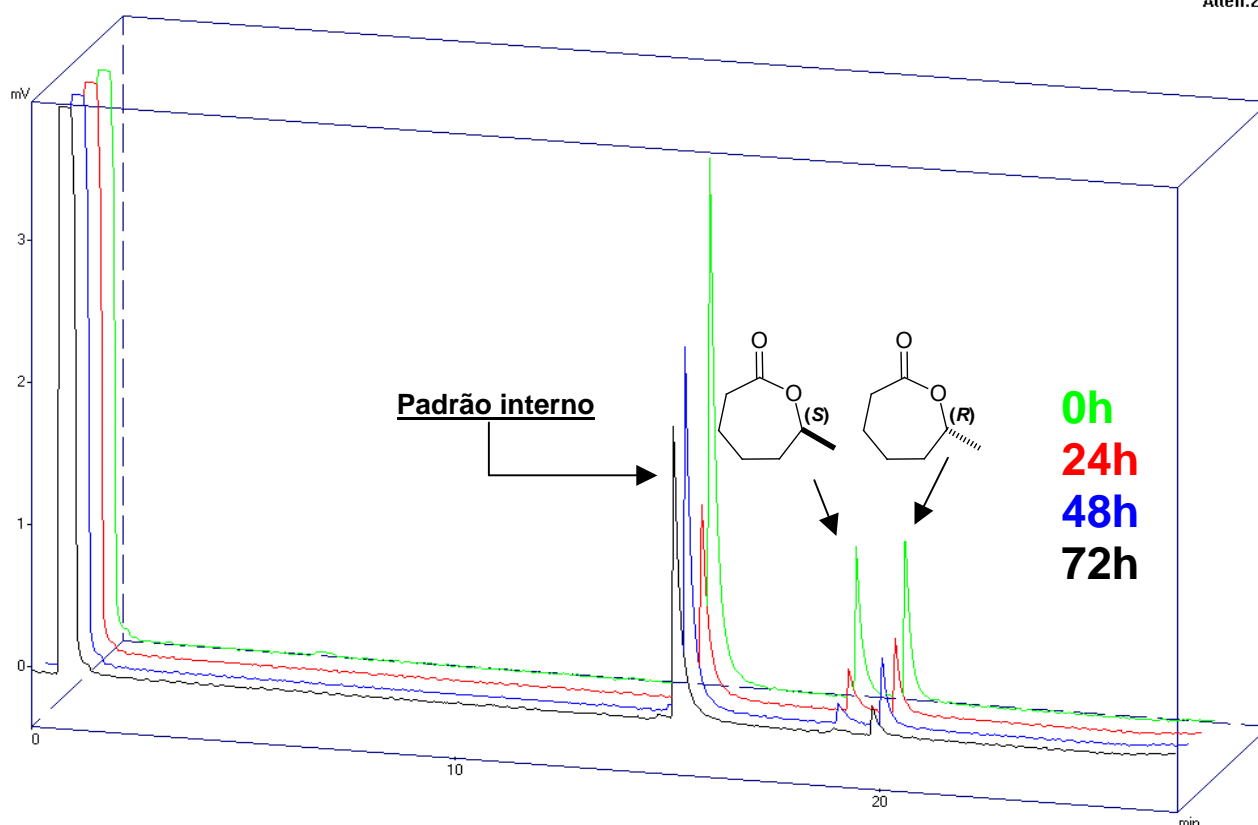


**Esquema II.5:** Hidrólise enzimática das lactonas racêmicas **3a** e **3b**.

**Tabela II.7.** Biotransformação das lactonas (**3a** e **3b**) utilizando células de *A. terreus* SSP 1498.

Linha	Lactona 3	T (h)	c <sup>a</sup> (%)	Lactona 3 e.e. (%)
1	 <b>3a</b>	0	100	-
		24	90	18 (R)
		48	37	50 (R)
		72	20	66 (R)
2	 <b>3b</b>	0	100	-
		24	13	-
		48	-	-
		72	-	-

<sup>a</sup>c: concentração determinada por análise cromatográfica usando padrão interno (método 1); e.e.: excesso enantiomérico; configuração absoluta está entre parênteses



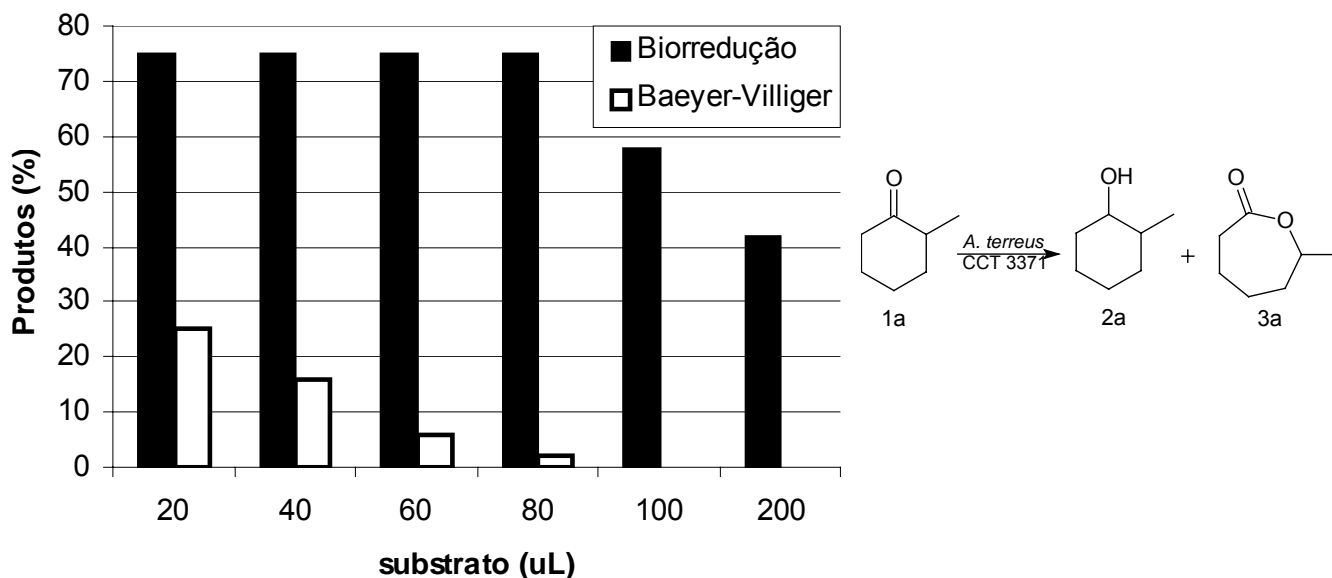
**Figura II.4:** Cromatogramas da resolução cinética da lactona **3a** (método 1).

### II.1.3 - Estudo de tolerância do fungo ao substrato

Finalizada a triagem dos fungos, foi constatado que o *A. terreus* CCT 3371 se apresentou como boa fonte enzimática para promover a reação de Baeyer-Villiger nas cetonas **1a** e **1b**. A fim de verificar a possibilidade de se aumentar a escala das reações biocatalisadas, foi feito um estudo de biotransformações com o *A. terreus* CCT 3371, utilizando diferentes concentrações dos substratos. Os experimentos foram montados utilizando 3g de células do fungo ressuspensas em meio tamponado (procedimento III.3.3, Parte Experimental), alterando apenas o volume dos substratos: (20-200 $\mu$ L). Após 48 horas de reação foi feita a análise cromatográfica das reações.

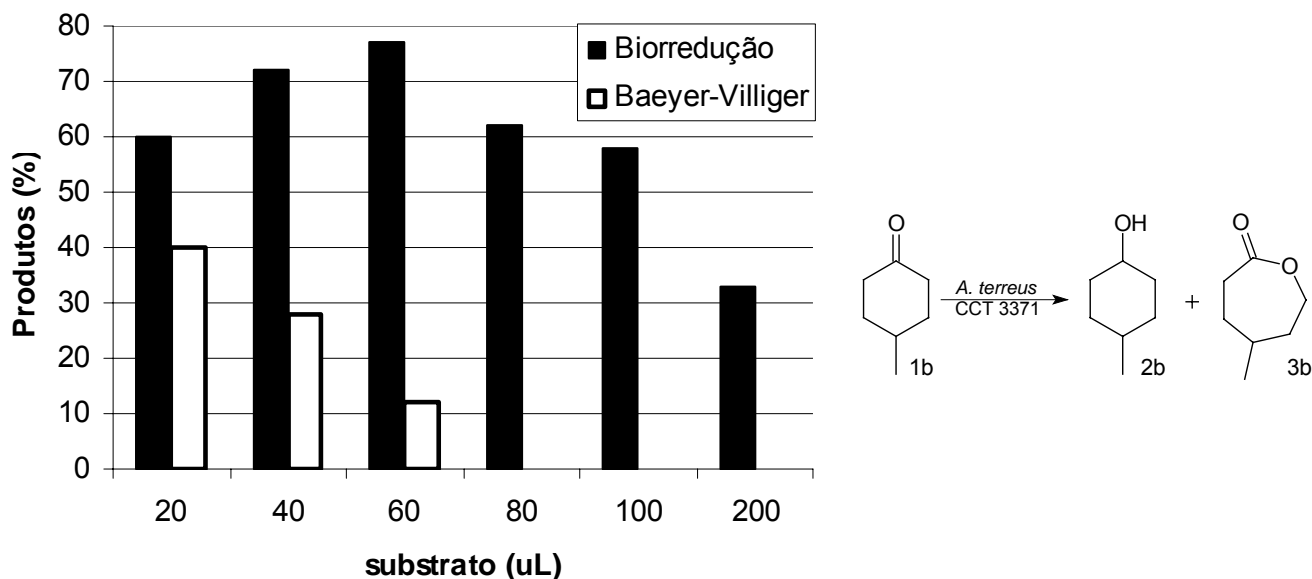
Para a 2-metil-ciclohexanona (**1a**, Figura II.5), a tolerância das Baeyer-Villiger mono-oxigenases foi de 80 $\mu$ L de substrato para 3g de células do fungo ressuspensas em meio tamponado. Entretanto, nessa concentração de substrato, a lactona **3a** é obtida com um rendimento cromatográfico de 2%. Comparando os resultados com 20 e 40 $\mu$ L de cetona, nota-se uma queda considerável na concentração da lactona **3a**: de

25% para 16%. Essa queda é mais acentuada quando comparamos as reações com 40 e 60 $\mu$ L, passando de 16% para 6%. Conclui-se com os resultados que a concentração ótima do substrato **1a** para que o *A. terreus* CCT 3371 promova a reação de Baeyer-Villiger é de **20 $\mu$ L/3g** de células ressuspensas em meio tamponado.



**Figura II.5:** Influência da concentração do substrato na biotransformação da 2-metil-cicloexanona (**1a**). Produto da biorredução = álcool **2a**. Produto da reação de Baeyer-Villiger = lactona **3a**. Tempo reacional = 48 horas.

Para a 4-metil-cicloexanona (**1b**, Figura II.6), a tolerância das Baeyer-Villiger mono-oxigenases foi de 60 $\mu$ L de substrato para **3g** de células do fungo ressuspensas em meio tamponado. Entretanto, nessa concentração de substrato, a lactona **3a** é obtida com um rendimento cromatográfico de 12%. Comparando as reações com 20 e 40 $\mu$ L, nota-se uma queda considerável na concentração da lactona **3b** de 40% para 28%. Como buscamos uma condição na qual a reação de Baeyer-Villiger seja favorecida, a concentração ótima do substrato **1b** deve ser de **20 $\mu$ L/3g** de células ressuspensas em meio tamponado.



**Figura II.6:** Influência da concentração do substrato na biotransformação da 4-metilcicloexanona (**1b**). Produto da biorredução = álcool **2b**. Produto da reação de Baeyer-Villiger = lactona **3b**. Tempo reacional = 48 horas.

Na faixa de 20-60 $\mu$ L de substrato nas condições empregadas para esse estudo, observa-se que a medida que a concentração dos substratos aumenta no meio reacional (**figuras II.5 e II.6**), ocorre uma diminuição sensível na atividade das BVMO's presentes no sistema enzimático do *A. terreus* CCT 3371. As BVMO's perdem quase que completamente a atividade com 80 $\mu$ L de substrato. Entretanto, pode-se observar que a inibição da atividade das álcool desidrogenases não é tão grande na faixa de 20-100 $\mu$ L e começa apenas ser afetada quando passamos de 100 $\mu$ L para 200 $\mu$ L de substrato no meio reacional.

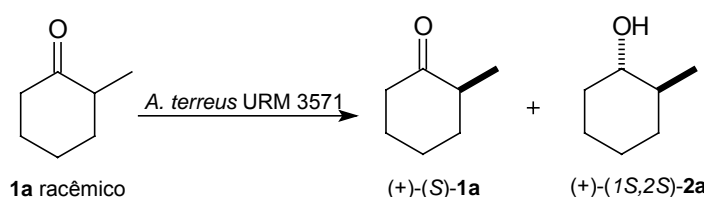
#### II.1.4 - Isolamento dos produtos 1a, 2a, 3a e 3b

Foram efetuados experimentos com uma massa maior de substrato para isolar e a caracterizar os produtos. Foram montados 10 frascos reacionais, reproduzindo o procedimento que utiliza **3g** de células ressuspensas (**tópico III.1.1**), atingindo a massa de 165 mg de substrato (200  $\mu$ L). Após 48 horas de reação, a mistura reacional foi filtrada, extraída e purificada conforme procedimento **III.3.4** (Parte Experimental). A

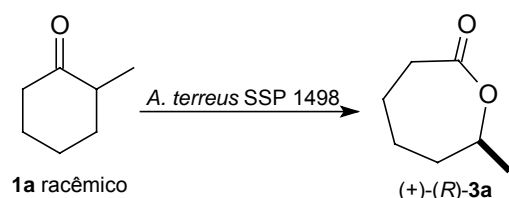
configuração absoluta dos produtos foi atribuída por comparação com as rotações óticas relatadas na literatura.<sup>10b,75, 76</sup>

(+)-(S)-2-metilcicloexanona (**1a**) – substrato residual (*A. terreus* URM 3571);  
[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +9,2 (c=0,07; MeOH), e.e. 30%; Ref. 10b: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = - 4,5 (c= 2,6; MeOH), (R).

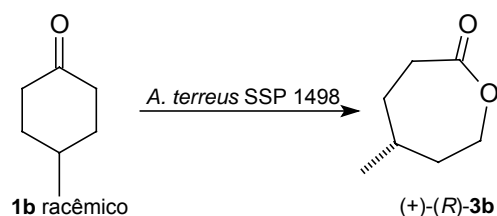
(+)-(1S,2S)-2-metilcicloexanol (**2a**): Rendimento isolado: 1,2% (*A. terreus* URM 3571)  
[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +8,5 (c=0,7; CH<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>), e.e. 88%; Ref. 34: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +2,0 (c= 1,0; CH<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>), (1S,2S).



(+)-(R)-7-metiloxacicloexa-2-ona (**3a**): Rendimento isolado 30,3% (*A. terreus* SSP 1498)  
[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +16,2 (c=1,5; CH<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>), e.e. 51%; Ref. 10b: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -17,5 (c= 1,9; CH<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>), (S).



(+)-(R)-5-metiloxacicloexa-2-ona (**3b**): Rendimento isolado 28,0% (*A. terreus* SSP 1498). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +36,6 (c= 4,4; CH<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>); Ref. 35: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = - 44,9 (c= 1,4; CH<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>), (S).



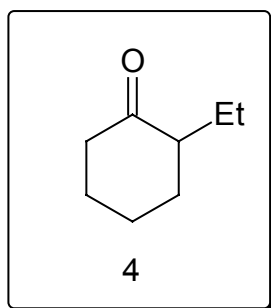
<sup>75</sup> a) Miyazawa, M.; Okamura, S.; Yamaguchi, M.; Kameoka, H. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **2000**, 75, 143. (b) Miyazawa, M.; Okamura, S.; Kameoka, H. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **1996**, 65, 171.

<sup>76</sup> (a) Stewart, J. D.; Reed, K. W.; Kayser, M. M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1996**, 8, 755.



## II.1.5 – Aplicação das biotransformações na 2-etil-cicloexanona

Após a avaliação da atividade enzimática em diferentes linhagens de *Aspergillus*, foram selecionadas duas linhagens de *A. terreus* a fim de verificar a eficiência das Baeyer-Villiger mono-oxigenases frente a outro substrato. O objetivo desse estudo foi comparar o comportamento das transformações da 2-metil-cicloexanona (**1a**) com a 2-etil-cicloexanona (**4**), apresentada no Esquema II.5.



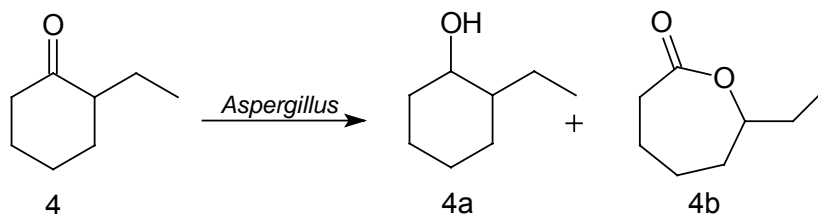
**Esquema II.5:** Estrutura da 2-etil-cicloexanona (**4**).

Conforme relatado na literatura,<sup>27,35,77</sup> quando tratamos da classe das 2-alkil-cicloexanonas, os sítios ativos das Baeyer-Villiger mono-oxigenases conseguem diferenciar de forma mais eficiente as faces pró-quirais das cetonas cíclicas quando estas apresentam um grupo volumoso posicionado  $\alpha$  a carbonila. Isso significa que as lactonas correspondentes (produtos da reação de Baeyer-Villiger) terão um excesso enantiomérico maior quanto maior for o volume do grupo alquila.

Para esse estudo, as condições reacionais foram empregadas de acordo com o procedimento que utiliza **3g** de células ressuspensas (**tópico II.1.1**) e 20 $\mu$ L de substrato. Foram retiradas alíquotas com 24, 48 e 72 horas de reação e estas foram analisadas por CG, comparando os tempos de retenção dos produtos com os tempos de retenção dos padrões sintetizados. Os resultados estão apresentados na Tabelas II.8.

<sup>77</sup> (a) Stewart, J. D.; Reed, K. W.; Zhu, J.; Chen, G.; Kayser, M. M. *J. Org Chem.* **1996**, 61,7652. (b) Stewart, J. D.; Reed, K. W.; Martinez, C. A.; Zhu, J.; Chen, G.; Kayser, M. M. *J. Am. Chem Soc.* **1998**, 15, 3541.

**Tabela II.8:** Biotransformação da cetona **4** levando ao álcool **4a** e à lactona **4b**.



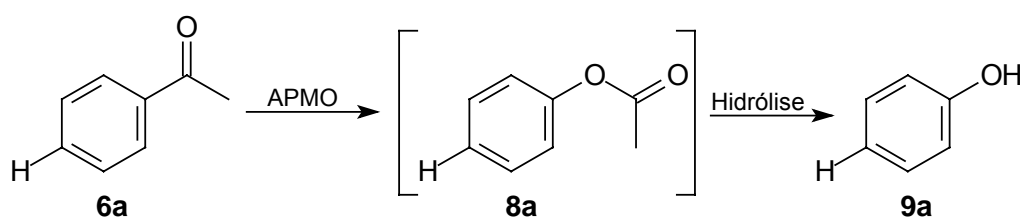
Linha	Microrganismo Células Ressuspensas (3g)	T (h)	Cetona <b>4</b>		Álcool <b>4a</b>		Lactona <b>4b</b>	
			c <sup>a</sup> (%)	e.e. (%)	c <sup>a</sup> (%)	cis:trans (%) <sup>b</sup>	c <sup>a</sup> (%)	e.e. (%)
1	<b>A. terreus SSP 1498</b>	24	56	32	40	> 99	3	-
2		48	15	73	81	> 99	2	-
3		72	5	-	90	> 99	2	-
4	<b>A. terreus CCT 4083</b>	24	12	67	87	> 99	1	-
5		48	0	-	100	> 99	0	-
6		72	0	-	100	> 99	0	-

<sup>a</sup>c: concentração determinada por análise cromatográfica (método 1); e.e.: excesso enantiomérico. <sup>b</sup> determinada somente a relação

De acordo com os resultados apresentados na Tabela II.8, as Baeyer-Villiger mono-oxigenases presentes nas linhagens utilizadas não foram eficientes na oxidação da 2-etil-ciclohexanona (**4**). Utilizando o *A. terreus* SSP 1498, foi detectada uma concentração muito baixa da lactona correspondente **4b** (Tabela II.8, linha 1). No entanto, quando a 2-metil-ciclohexanona (**1a**) foi submetida a essa mesma linhagem, a concentração da lactona correspondente **3a** foi significativamente maior (62%; Tabela II.2, linha 1). Observa-se que a cetona **4** é transformada quase que exclusivamente no álcool correspondente **4a** (Tabela II.8, linhas 3 e 5), indicando que nesse caso a atividade enzimática das álcool desidrogenases são maiores que a das Baeyer-Villiger mono-oxigenases. Nota-se também que houve seletividade na biorredução, visto que apenas um dos pares de isômeros foi formado (*cis* ou *trans*). Apesar de disponíveis três diferentes colunas quirais no nosso laboratório, a separação dos isômeros não foi satisfatória. Por esse motivo não foi determinada a estereosseletividade da biorredução da 2-etil-ciclohexanona (**4**).

## II.2 - Identificação da acetofenona mono-oxigenase (APMO) e de álcool desidrogenases em fungos

Em estudos preliminares desenvolvidos em nosso laboratório foram apresentados sistemas enzimáticos (vegetais, fungos e bactérias) capazes de transformar derivados de 1-fenil-etanonas em seus correspondentes álcoois quirais.<sup>78</sup> Em alguns casos, foi observada uma competição entre a redução e a oxidação (reação de Baeyer-Villiger) das cetonas aromáticas, quando essas transformações utilizaram células de fungos como fonte enzimática. A acetofenona mono-oxigenase (APMO) é a enzima que promove a reação de Baeyer-Villiger na 1-fenil-etanona,<sup>15d</sup> na qual inicialmente ocorre a oxidação da cetona e depois o éster pode sofrer hidrólise, gerando o fenol correspondente (Esquema II.7).



Esquema II.7: Oxidação da 1-fenil-etanona (6a)

Recentemente alguns artigos<sup>23,79</sup> apresentaram estudos de mono-oxigenases capazes de oxidar cetonas aromáticas, incluindo aplicações sintéticas das reações de Baeyer-Villiger que utilizam metodologias biocatalíticas.

Com base nas observações apresentadas acima, decidimos explorar a eficiência enzimática de alguns fungos em reações de Baeyer-Villiger e biorredução. Neste estudo foi feita uma triagem com dez microrganismos (Tabela II.10) em

<sup>78</sup> (a) Comasseto, J. V.; Omori, A. T.; Porto, A. L. M.; Andrade, L. H. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 473. (b) Comasseto, J. V.; Omori, A. T.; Porto, A. L. M.; Andrade, L. H. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 711. (c) Comasseto, J. V.; Andrade, L. H.; Omori, A. T.; Assis, L. F.; Porto, A. L. M. *J. Mol. Catal B: Enzymatic* **2004**, *29*, 55. (d) Andrade, L. H.; Omori, A. T.; Porto, A. L. M.; Comasseto, J. V. *J. Mol. Catal B: Enzymatic* **2004**, *29*, 47.

<sup>79</sup> (a) Tanner, A.; Hopper, D. *J. Bacteriol.* **2000**, *128*, 6565. (b) Kamerbeek, N. M.; Moonen, M. J.; van der Vem, H. J. G.; van Berkel, M. W. J.; Fraaije, H. M. W.; Janssen, D. B. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 2547. (c) Moonen, M. J. H.; Rietjens, I. M. C. M.; van Berkel, W. J. H. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **2001**, *26*, 35. (d) Kamerbeek, N. M.; Olsthoorn, A. J. J.; Fraaije, M. W.; Janssen, D. B. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 419. (e) Fraaije, M. W.; Kamerbeek, N. M.; Heidekamp, A. J.; Fortin, R.; Janssen, D. B. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 3354.

diferentes meios de cultura (Tabela II.11). Esses meios de cultura foram selecionados de acordo com a viabilidade celular dos fungos. A 1-fenil-etanona (**6a**) foi empregada como substrato modelo para detectar a atividade da APMO e de álcool desidrogenases.<sup>15d, 80</sup>

Tabela II.10: Origem das linhagens estudadas.

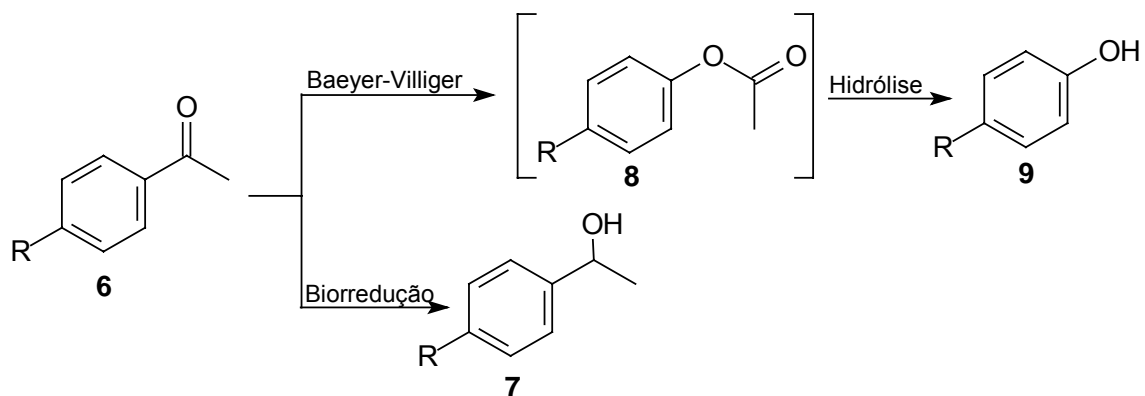
Nome	Origem	Coleção de Cultura
<i>Epicoccum nigrum</i> SSP 1948	Luís Antônio - SP	
<i>Penicillium decumbens</i> SSP 1944	Itirapina - SP	
<i>Curvularia lunata</i> SSP 117	Paranapiacaba - SP	
<i>Geotrichum candidum</i> SSP 1170	Paranapiacaba - SP	
<i>Emericella nidulans</i> CCT 3119	Campinas - SP	
<i>Pestalotiopsis</i> sp. SSP 1946	Itirapina - SP	
<i>Rhizopus oryzae</i> CCT 4964	Chapadinha - MA	
<i>Aspergillus foetidus</i> CCT 2683	-	
<i>Aspergillus niger</i> CCT 2760	Peruíbe - SP	
<i>Aspergillus terreus</i> SSP 1498	Solo (Connecticut, USA)	

Tabela II.11: Composição dos meios de cultura.

Composição	
A	Extrato de batatas 4 g L <sup>-1</sup> (Oxoid); Glicose 20 g L <sup>-1</sup> .
B	Dextrose 20 g L <sup>-1</sup> (Oxoid); Peptona 10 g L <sup>-1</sup> (Oxoid).
C	Extrato de levedura 4 g L <sup>-1</sup> (Oxoid); Amido 15 g L <sup>-1</sup> ; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 g L <sup>-1</sup> ; MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0.5 g L <sup>-1</sup> .
D	Glicose 20 g L <sup>-1</sup> ; Extrato de levedura 20 g L <sup>-1</sup> (Oxoid); Peptona 5 g L <sup>-1</sup> (Oxoid); KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 g L <sup>-1</sup> ; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 g L <sup>-1</sup> ; NaNO <sub>3</sub> 2 g L <sup>-1</sup> ; KCl 0,5 g L <sup>-1</sup> ; MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,5 g L <sup>-1</sup> ; FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,02 g L <sup>-1</sup> .

Utilizando os produtos formados como parâmetro de detecção enzimática, foi possível identificar nesses microrganismos a presença de álcool desidrogenases, responsáveis pela produção do álcool correspondente **7**. O fenol **9** serve como indicação da presença da APMO atuante no meio reacional. A ação de hidrolases pode ser constatada pelo consumo do éster **8**, levando a formação do fenol **9**, conforme apresentado no Esquema II.8. Artigos como o de Tanner et al. (2000)<sup>38a</sup> suportam essa proposta.

<sup>80</sup> (a) Nakamura, K.; Yamanaka, R.; Matsuda, T.; Harada, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2659.

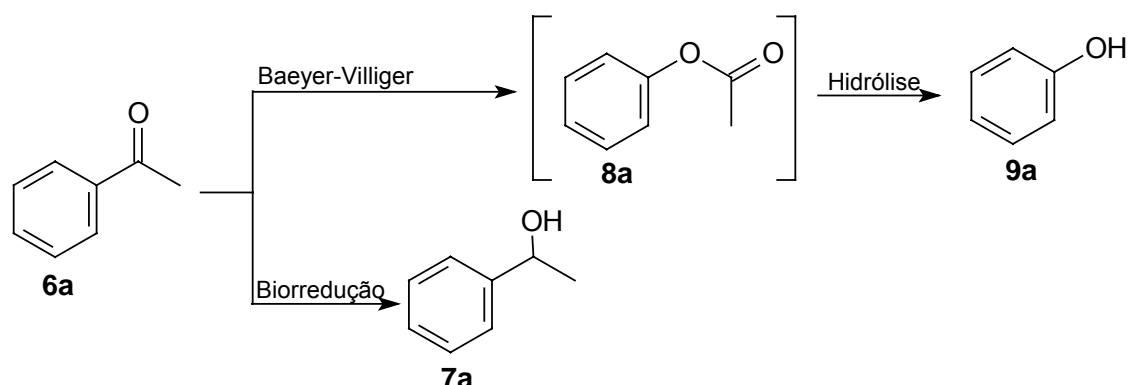


**Esquema II.8:** Biotransformações da 1-fenil-etanona e seus derivados *para* substituídos; onde R= H, Cl, Me, OMe.

## II.2.1 - Estudo dos meios de cultura

Para avaliar os sistemas enzimáticos dos fungos como potenciais biocatalisadores, foi estudada a biotransformação da 1-fenil-etanona (**6a**). As atividades da APMO e das álcool desidrogenases foram comparadas nos quatro meios de cultura selecionados. A análise da atividade enzimática foi realizada por cromatografia gasosa após 96 horas de reação (Tabelas II.12 e II.13). Todos os experimentos foram preparados conforme procedimento III.3.5 (Parte experimental).

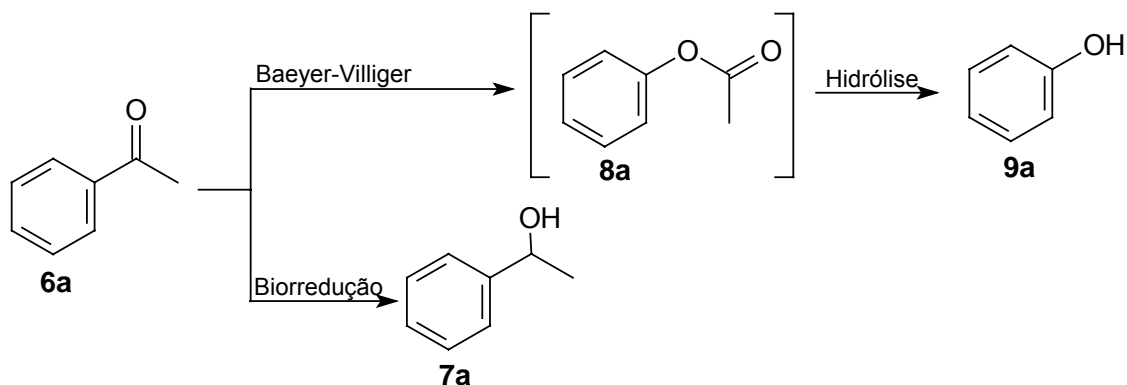
**Tabela II.12:** Efeito do meio de cultura<sup>a</sup> na biotransformação da 1-fenil-etanona **6a**: Biorredução vs. Baeyer-Villiger.



Linha	Microrganismo	Meio de Cultura A <sup>a</sup>			
		Biorredução			Baeyer-Villiger
		1-fenil-etanol ( <b>7a</b> )			fenol ( <b>9a</b> )
		c (%)	e.e. (%)	config.	c (%)
1	<i>Epicoccum nigrum</i> SSP 1948	99	92	(S)	-
2	<i>Penicillium decumbens</i> SSP 1944	30	-	-	-
3	<i>Curvularia lunata</i> SSP 117	94	83	(S)	-
4 <sup>b</sup>	<i>Geotrichum candidum</i> SSP 1170	-	-	-	-
5	<i>Pestalotiopsis</i> sp. SSP 1946	36	37	(S)	-
6	<i>Aspergillus terreus</i> SSP 1498	7	50	(S)	~3
7	<i>Aspergillus niger</i> CCT 2760	16	44	(R)	~1
8	<i>Aspergillus foetidus</i> CCT 2683	45	72	(R)	~2
9 <sup>b</sup>	<i>Emericella nidulans</i> CCT 3119	-	-	-	-
10	<i>Rhizopus oryzae</i> CCT 4964	34	73	(S)	-
Meio de Cultura B <sup>a</sup>					
11	<i>Epicoccum nigrum</i> SSP 1948	99	98	(S)	-
12	<i>Penicillium decumbens</i> SSP 1944	12	17	(S)	-
13	<i>Curvularia lunata</i> SSP 117	48	51	(S)	-
14 <sup>b</sup>	<i>Geotrichum candidum</i> SSP 1170	-	-	-	-
15	<i>Pestalotiopsis</i> sp. SSP 1946	47	68	(R)	40
16	<i>Aspergillus terreus</i> SSP 1498	53	51	(S)	~2
17	<i>Aspergillus niger</i> CCT 2760	9	76	(R)	8
18	<i>Aspergillus foetidus</i> CCT 2683	47	89	(R)	~5
19	<i>Emericella nidulans</i> CCT 3119	17	58	(R)	31
20	<i>Rhizopus oryzae</i> CCT 4964	69	77	(S)	-

<sup>a</sup> Meios de cultura: A = BDA, Glicose; B = Sabouraud-Dextrose; Tempo de Reação: 96 horas; c: concentração determinada por análise cromatográfica (método 3); e.e.: excesso enantiomérico; Config.: configuração absoluta. O composto **8a** não foi detectado em nenhuma biotransformação. <sup>b</sup> A 1-fenil-etanona e os produtos esperados não foram detectados.

**Tabela II.13:** Efeito do meio de cultura<sup>a</sup> na biotransformação da 1-fenil-etanona **6a**: Biorredução vs. Baeyer-Villiger.

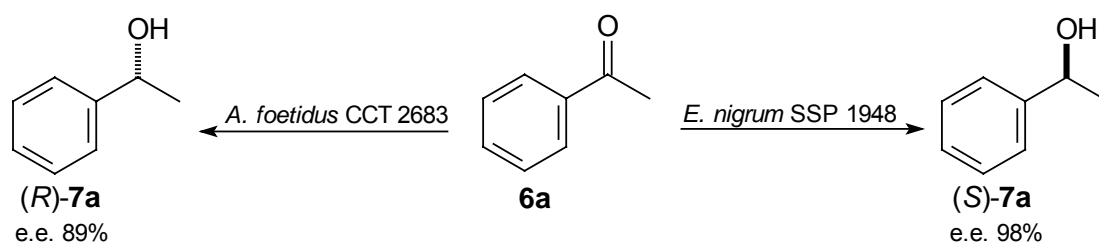


Linha	Microrganismo	Meio de Cultura C <sup>a</sup>			
		Biorredução		Baeyer-Villiger	
		1-fenil-etanol ( <b>7a</b> )		fenol ( <b>9a</b> )	
		c (%)	e.e. (%)	config.	c (%)
1	<i>Epicoccum nigrum</i> SSP 1948	99	98	(S)	-
2	<i>Penicillium decumbens</i> SSP 1944	31	51	(R)	-
3	<i>Curvularia lunata</i> SSP 117	53	~6	(R)	-
4 <sup>b</sup>	<i>Geotrichum candidum</i> SSP 1170	-	-	-	-
5	<i>Pestalotiopsis</i> sp. SSP 1946	79	28	(R)	-
6 <sup>b</sup>	<i>Aspergillus terreus</i> SSP 1498	-	-	-	-
7	<i>Aspergillus niger</i> CCT 2760	~4	82	(R)	9
8	<i>Aspergillus foetidus</i> CCT 2683	37	60	(R)	8
9	<i>Emericella nidulans</i> CCT 3119	12	99	(R)	88
10	<i>Rhizopus oryzae</i> CCT 4964	62	88	(S)	-
Meio de Cultura D <sup>a</sup>					
11	<i>Epicoccum nigrum</i> SSP 1948	13	80	(S)	~2
12	<i>Penicillium decumbens</i> SSP 1944	11	26	(R)	-
13	<i>Curvularia lunata</i> SSP 117	46	64	(R)	49
14	<i>Geotrichum candidum</i> SSP 1170	~5	28	(S)	~2
15	<i>Pestalotiopsis</i> sp. SSP 1946	62	14	(R)	~3
16 <sup>b</sup>	<i>Aspergillus terreus</i> SSP 1498	-	-	-	-
17	<i>Aspergillus niger</i> CCT 2760	~5	66	(R)	11
18	<i>Aspergillus foetidus</i> CCT 2683	24	53	(R)	13
19 <sup>b</sup>	<i>Emericella nidulans</i> CCT 3119	-	-	-	-
20	<i>Rhizopus oryzae</i> CCT 4964	72	71	(S)	-

<sup>a</sup> Meios de cultura: C = Glicose – Extrato de malte – Peptona – sais minerais; D = Extrato de levedura, peptona, glicose e sais minerais. Tempo de Reação: 96 horas; c: concentração determinada por análise cromatográfica (método 3); e.e.: excesso enantiomérico; Config.: configuração absoluta. O composto **8a** não foi detectado em nenhuma biotransformação.<sup>b</sup> A 1-fenil-etanona e os produtos esperados não foram detectados.

De acordo com os dados apresentados, o microrganismo que apresentou a maior enantiosseletividade na reação de biorredução foi o *Epicoccum nigrum* SSP 1948, que converteu a 1-fenil-etanona **6a** no (S)-1-fenil-etanol **7a** com alta conversão (99%) e ótimo excesso enantiomérico (98%), (Tabela II.12, linha 11). Em todos os meios de cultura de crescimento, o *E. nigrum* SSP 1948 promoveu a redução da cetona **6a**, levando ao álcool (S)-**7a**. Quando utilizados os meios de cultura (A) e (D), a redução de **6a** apresentou uma menor enantiosseletividade (Tabela II.12, linha 1; Tabela II.13, linha 11). O *E. nigrum* SSP 1948 não apresentou atividade da acetofenona mono-oxigenase, exceto quando o meio de cultura (D) foi empregado (Tabela II.13, linha 11). Neste caso o fenol **9a** foi obtido em baixa conversão (2%), indicando uma atividade modesta da enzima responsável pela reação de Baeyer-Villiger nesse tipo de substrato. Assim como o *E. nigrum* SSP 1948, outros microrganismos promoveram a redução da cetona **6a** com boa enantiosseletividade. Diversos fungos apresentaram enantiopreferência para a formação do álcool (R)-**7a**. A melhor enantiosseletividade para a preparação do álcool (R)-**7a** foi observada com o emprego do *Aspergillus foetidus* CCT 2683 (Tabela II.12, linha 18).

Conforme discutido, foi possível obter biocataliticamente os dois enantiômeros do 1-fenil-etanol **7a** utilizando dois microrganismos: com o *E. nigrum* SSP 1948 pode-se obter o (S)-1-fenil-etanol e com o *A. foetidus* CCT 2683 pode-se preparar o (R)-1-fenil-etanol (Esquema II.9).



**Esquema II.9:** Microrganismos que preparam os dois enantiômeros do 1-fenil-etanol (**7a**).

Um dado interessante pode ser observado na transformação promovida pelo *Pestalotiopsis* sp. SSP 1946. Utilizando diferentes meios de cultura, a enantiopreferência da biorredução da cetona **6a** foi modificada. Usando o meio de cultura (A) para o crescimento do *Pestalotiopsis* sp. SSP 1946, pode-se preparar o

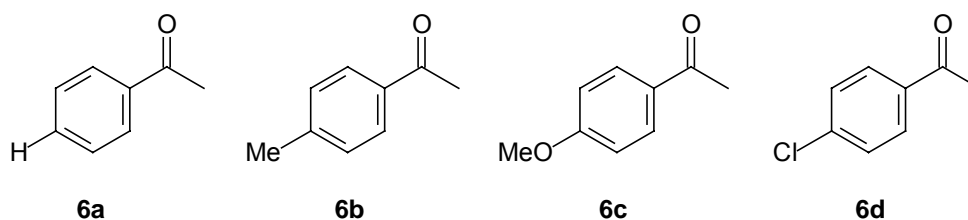


álcool (*S*)-**7a** com um e.e. de 36% (Tabela II.12, linha 5). Quando este fungo foi crescido no meio de cultura (**B**) obteve-se o álcool (*R*)-**7a** com um e.e. de 68%. Verificou-se também que a APMO apresenta uma atividade considerável apenas quando o fungo foi crescido no meio de cultura (**B**), pois se detectou o fenol **9a** (40% de conversão; Tabela II.12, linha 15).

Em relação a oxidação de Bayer-Villiger, o microrganismo *Emericella nidulans* CCT 3119 apresentou a maior atividade da APMO. Quando o crescimento do microrganismo foi realizado no meio de cultura (**C**), o sistema enzimático produzido promoveu a conversão da cetona **6a** preferencialmente no fenol **9a** (88% de conversão) com uma pequena quantidade do álcool **7a** (12% de conversão; Tabela II.13, linha 9). O uso do meio de cultura (**A**) e (**D**) no crescimento do *E. nidulans* CCT 3119 levou a completa degradação da cetona **6a** (Tabela II.12, linha 9 e Tabela II.13, linha 19). Assim como o *E. nidulans* CCT 3119, o *A. terreus* SSP 1498 apresentou o mesmo comportamento de degradação quando os meios de cultura (**C**) e (**D**) foram utilizados para o seu crescimento (Tabela II.13, linhas 6 e 16).

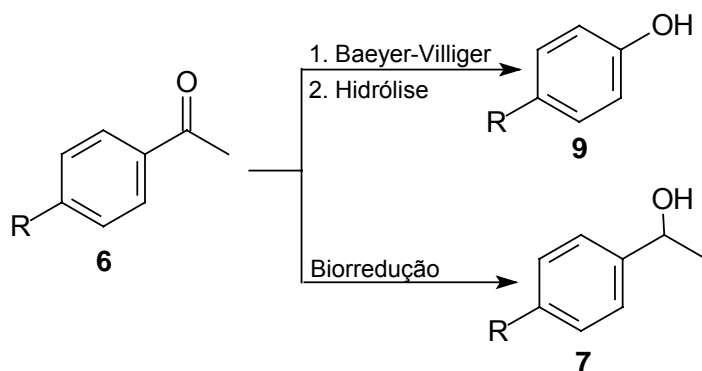
## II.2.2 - Biotransformações das 1-feniletanonas *para* substituídas (**6a-d**)

Com base nos resultados descritos para a cetona **6a**, o *Epicoccum nigrum* SSP 1948 (meio de cultura B) foi selecionado para o estudo de biorredução das 1-feniletanonas substituídas na posição *para* (**6a-d**) (Tabela II.14) e o *Emericella nidulans* CCT 3119 (meio de cultura **C**) para o estudo da oxidação desses substratos (Tabela II.15). Para esses estudos foi utilizada a 1-fenil-etanona (**6a**) e seus derivados (**6b-d**), apresentados no Esquema II.10.



**Esquema II.10:** Substratos utilizados no estudo.

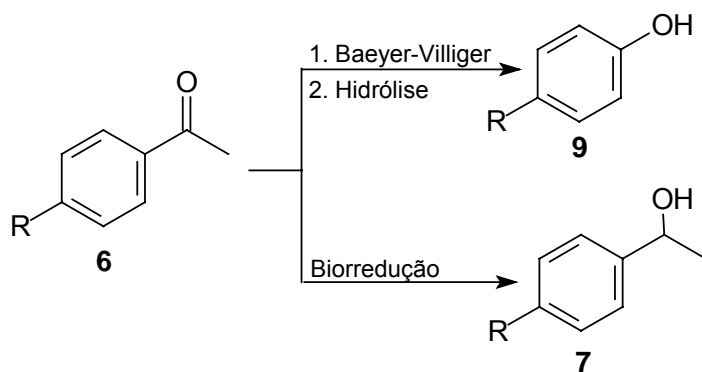
**Tabela II.14:** Biotransformação de 1-fenil-etanonas *para* substituídas, utilizando o *E. nigrun* SSP 1948<sup>a</sup>



Linha	Cetonas	Meio de Cultura B <sup>a</sup>		
		Biorredução		Baeyer-Villiger
		Produto (7)		Produto (9)
		c (%)	e.e (%)	c (%)
1		98	98 (S)	-
2		97	92 (S)	-
3		63	91 (S)	-
4		97	60 (S)	-

<sup>a</sup> Meio de Cultura: B = Sabouraud-Dextrose; Tempo de reação: 96 horas; c: concentração determinada por análise cromatográfica (método 3); e.e.: excesso enantiomérico; configuração absoluta está entre parênteses; Os compostos **8a-d** não foram detectados em nenhuma biotransformação.

**Tabela II.15:** Biotransformação de 1-feniletanonas *p*-substituídas, utilizando o *E. nidulans* CCT 3119<sup>a</sup>

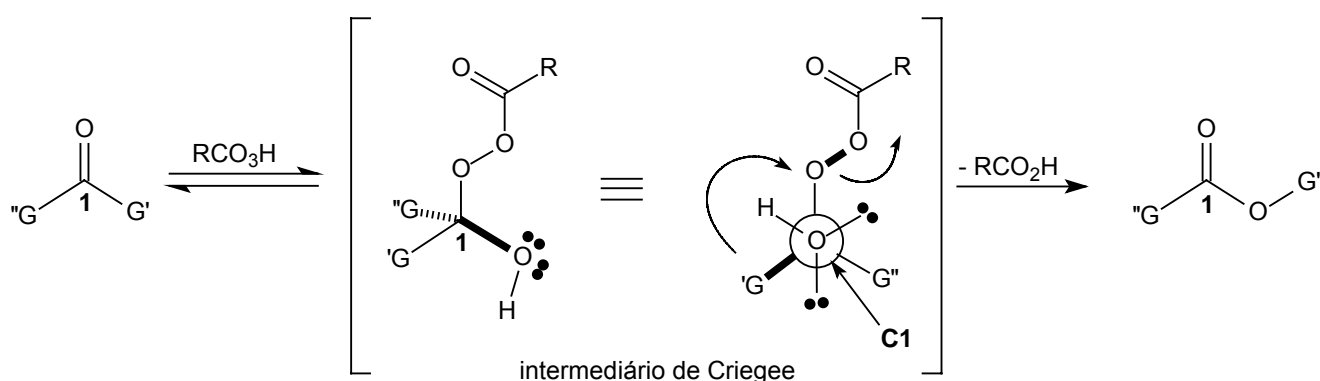


Linha	Cetonas	Meio de Cultura C <sup>a</sup>		
		Biorredução		Baeyer-Villiger
		Produto (7)		Produto (9)
		c (%)	e.e (%)	c (%)
1		16	99 (R)	70
2		25	98 (R)	75
3		-	-	97
4		90	95(R)	4

<sup>a</sup> Meio de Cultura C = Glicose – Extrato de malte – Peptona – sais minerais; Tempo de reação: 96 horas; c: concentração determinada por análise cromatográfica (método 3); e.e.: excesso enantiomérico; configuração absoluta está entre parênteses; os compostos **8a-d** não foram detectados em nenhuma biotransformação.

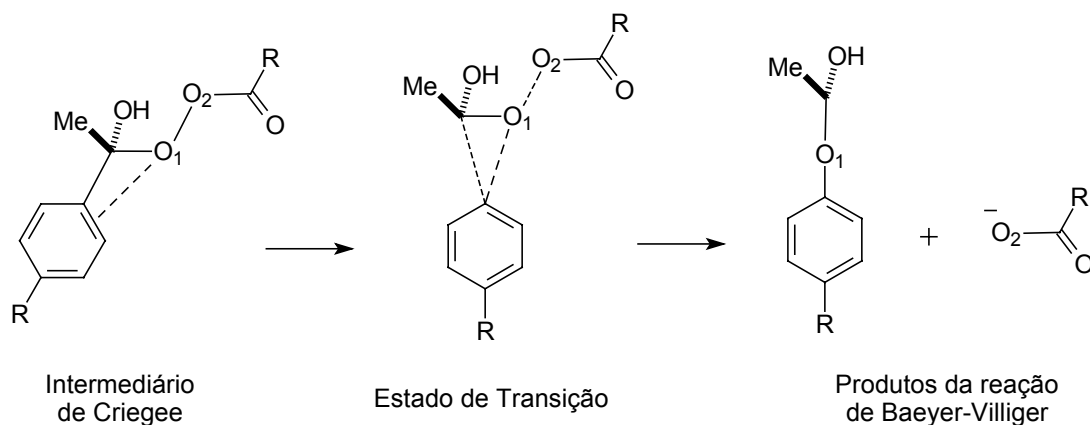
Como pode ser observado na Tabela II.14, os produtos relativos a oxidação de Baeyer-Villiger + reação de hidrólise (**9a-d**) não foram obtidos quando as cetonas (**6a-d**) foram submetidas a reação catalisada por células de *E. nigrum* SSP 1948. Todas as cetonas estudadas foram reduzidas ao álcool (*S*)-**7** com ótimos valores de conversão e estereosseletividade. A cetona **6a** foi a que melhor apresentou enantiosseletividade na sua redução (Tabela II.14, linha 1). Dentre as cetonas estudadas, a redução da 1-(4-clorofenil)etanona (**6d**) ocorreu com boa conversão, mas com a menor seletividade (e.e. 60%; Tabela II.14, linha 4).

Analisando os resultados das transformações promovidas pelo *E. nidulans* CCT 3119, observa-se que a 1-(4-metoxifenil)etanona (**6c**) é o substrato que sofreu a maior taxa de conversão em favor da reação de Baeyer-Villiger (Tabela II.15, linha 3). Os resultados experimentais apresentados na Tabela II.15 mostram que a oxidação de Baeyer-Villiger promovida por *Emericella nidulans* CCT 3119 segue a mesma amplitude migratória quando esta oxidação é promovida por reagentes convencionais (por exemplo, *m*-PCBA): H > fenil > alquil 3° > alquil 2° > alquil 1° > metil.<sup>81</sup> Isto indica que os efeitos estereoeletrônicos da reação de Baeyer-Villiger são válidos para ambos os casos. De acordo com a teoria dos orbitais moleculares,<sup>5e</sup> quanto maior a densidade eletrônica da ligação G'-C1 no intermediário de Criegee, maior será sua a preferência migratória (Esquema II.11).



**Esquema II.11:** Intermediário de Criegee de uma reação de Baeyer-Villiger. Onde:  $G_m$  = grupo migrante; quando a cetona é a 1-fenil-etanona:  $G'$  = fenila e  $G''$  = metila.

No caso das 1-fenil-etanonas (**6**), o grupo fenila é aquele que migra preferencialmente, devido a doação eletrônica dos elétrons  $\pi$  do sistema aromático para o orbital  $\sigma^*$  da ligação  $O_1-O_2$  (Esquema II.12). Essa doação eletrônica aproxima a energia dos orbitais de fronteira envolvidos nessa reação.<sup>82</sup> No caso das fenil-etanonas, só o grupo arila tem essa propriedade eletrônica e dessa forma a sua migração é preferencial frente ao grupo metila.



**Esquema II.12:** Doação eletrônica do sistema  $\pi$  aromático para o orbital  $\sigma^*$  ( $O_1-O_2$ ) no intermediário de Criegee, seu estado de transição e os produtos da reação de Baeyer-Villiger.

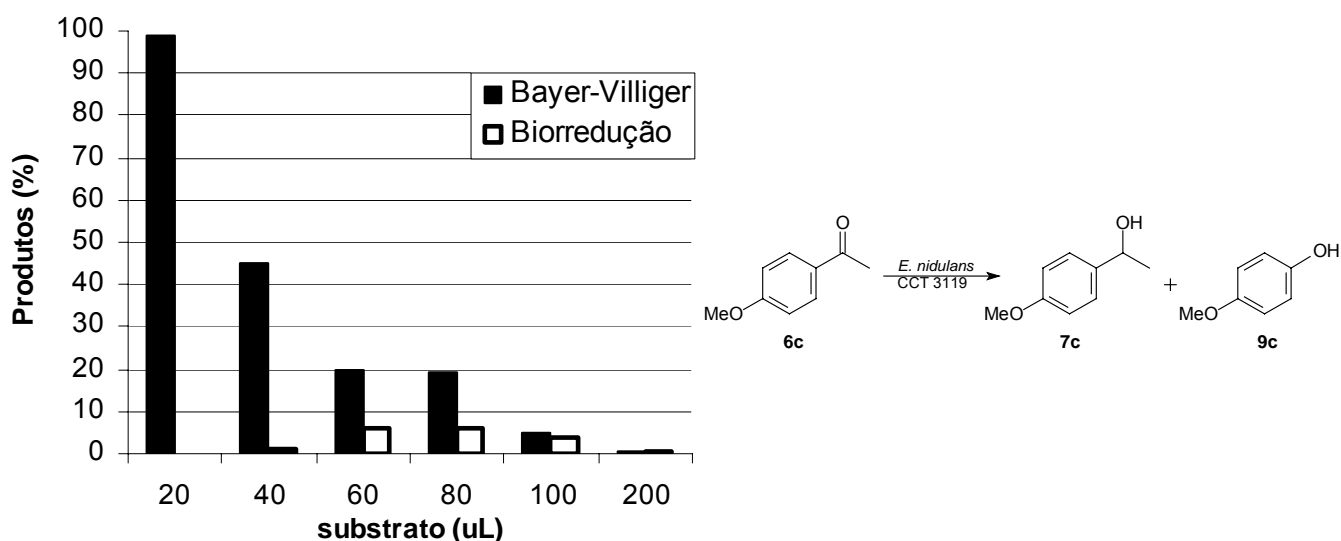
Quando comparamos a amplitude migratória de grupos fenila *para* substituídos (dos substratos **6a-d**), devemos considerar o efeito eletrônico do substituinte no anel aromático. A alta atividade da APMO na oxidação da cetona **6c** (Tabela II.15, linha 3) é atribuída à doação de densidade eletrônica do grupo metoxila para o sistema  $\pi$  aromático, diminuindo muito a energia do orbital  $\sigma^*$  ( $O_1-O_2$ ) e conseqüentemente favorecendo a migração do grupo MeO-Ph. A baixa atividade dessa enzima na oxidação da cetona **6d** (Tabela II.15, linha 4) se deve a elevada eletronegatividade do grupo cloreto que retira densidade eletrônica do sistema  $\pi$  aromático e desse modo dificulta a migração do grupo Cl-Ph.

Utilizando o *E. nidulans* CCT 3119, também foi observada a redução de todas as cetonas exceto quando foi empregada a cetona **6c**, que sofreu preferencialmente reação de Baeyer-Villiger (Tabela II.15, linha 3). Em todas as reduções foram formados preferencialmente os álcoois com configuração (*R*)-**7** (Tabela II.15).

<sup>81</sup> Solomons, T. W. G.; Fryhle, C. B. *Química Orgânica*. Sétima Edição. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2002. Cap 16, Vol. 2: Aldeídos e Cetonas I. Adição Nucleofílica ao Grupo Carbonila, pg 33. ISBN 85-216-1283-4

<sup>82</sup> Hannachi, H.; Anoune, N.; Arnaud, C.; Lantéri, P.; Longerey, R.; Chermette, H. *J. Mol. Structure (Theochem)* **1998**, *434*, 183.

Como o *E. nidulans* CCT 3119 apresentou-se como boa fonte enzimática para a oxidação de Baeyer-Villiger da cetona **6c**, assim como no caso das cetonas cíclicas (tópico II.1.3), foi feito um estudo desta biotransformação com diferentes concentrações deste substrato (Figura II.7). Os frascos reacionais foram preparados reproduzindo a melhor condição reacional para promover a reação de Baeyer-Villiger no substrato **6c**, na qual são utilizados 100mL de células em crescimento (*E. nidulans* CCT 3119), crescidas por 96 horas no meio de cultura C, conforme procedimento III.3.5 (Parte Experimental).



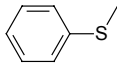
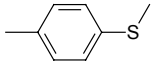
**Figura II.7:** Influência da concentração do substrato na biotransformação da 1-(4-metoxifenil)etanona (**6c**) pelo *E. nidulans* CCT 3119. Produto da biorredução = álcool **7a**. Produto da reação de Baeyer-Villiger = fenol derivado **9c**. Tempo de reação = 96 horas.

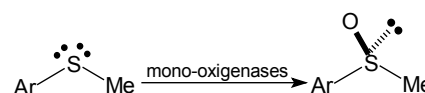
Foi observada uma tolerância de 100mg para 100 mL de células em crescimento. A partir de 60mg, ocorre uma competição entre a biorredução e a reação de Baeyer-Villiger. O (*R*)-1(4-metoxifenil)etanol (**7c**) pode ser obtido quando a concentração da cetona **6c** está na faixa de 60-100mg. Esta competição enzimática pode estar ocorrendo devido a uma inibição enzimática da APMO pela cetona **6c**, substrato que aparenta ser mais tóxico para esta mono-oxigenase do que para a álcool desidrogenase. Os resultados apresentados indicam que a concentração ótima da cetona **6c** para que o microrganismo promova a reação de Baeyer-Villiger deve estar entre **20-40mg/100mL** de células em crescimento do *Emericella nidulans* CCT 3119.

## II.3 - Síntese e transformações biológicas de moléculas bi-funcionalizadas

Em diversas rotas sintéticas nos deparamos com blocos de construção que contêm grupos funcionais que devem ser preservados. Usualmente são utilizadas etapas de proteção desses grupos para depois promover a transformação em outra parte da molécula. Neste processo perde-se tempo e muitas vezes rendimento global. Na busca de etapas que evitem gastos desnecessários, as enzimas apresentam-se como uma alternativa interessante. Além da estereosseletividade, estes catalisadores podem apresentar um ótimo potencial quimiosseletivo. Por ser pouco explorado em relação ao aspecto estereosseletivo, o estudo sistemático de microrganismos que apresentem enzimas quimiosseletivas tende a crescer rapidamente nos próximos anos.

Conforme o levantamento feito por van Berkel et al. (2003),<sup>15d</sup> as enzimas CHMO, CPMO e HAPMO além de oxidar cetonas (**tópico II.1**) podem também oxidar sulfetos, levando a sulfóxidos (Figura II.8). Esse trabalho mostra que essas enzimas não diferenciam o grupo carbonila do grupo sulfeto, oxidando ambos indistintamente.

Substrato	HAPMO	CHMO	CPMO
	>99% (S)	99% (R)	100% (S)
	>99% (S)	37% (S)	84% (S)



**Figura II.8:** Oxidação de sulfetos arílicos por diferentes mono-oxigenases. Onde: HAPMO = 4-hidróxiacetofenona mono-oxigenase, CHMO = ciclohexanona mono-oxigenase e CPMO = ciclopentanona mono-oxigenase.

### II.3.1 – Triagem dos microrganismos

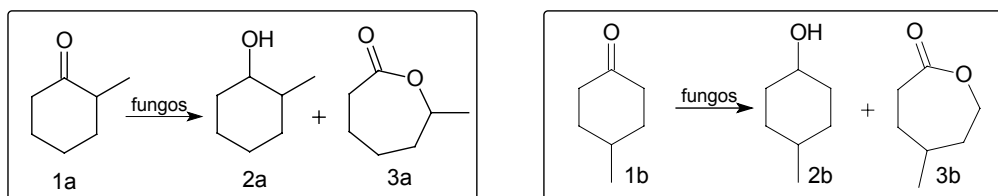
Em um trabalho desenvolvido em nosso laboratório,<sup>83</sup> foram estudados Basidiomicetos capazes de oxidar sulfetos. Diferentemente das mono-oxigenases

<sup>83</sup> Ricci, L. C.; Andrade, L. H.; Porto, A. L. M.; Comasseto, J. V.; Capelari, M.; Cass, Q. B. *Enzyme and Microbial Technol.* **2004**. No prelo.

presentes nos *Aspergillus* (**tópico II.1**), as oxidases presentes nos metabolismos dos Basidiomicetos (lacases e peroxidases)<sup>84</sup> não promovem a reação de Baeyer-Villiger. Para determinar qual enzima promove as oxidações enzimáticas em reações catalisadas por *Basidiomicetos*, com base no trabalho desenvolvido previamente, foram selecionados os quatro fungos que apresentaram melhores resultados na oxidação de sulfetos: *T. versicolor* CCB 202, *T. rigida* CCB 285, *I. lacteus* CCB 196 e *P. sanguineos* CCB 501. Escolhidos os biocatalisadores, foram selecionadas as cetonas cíclicas **1a** e **1b** como substrato modelo para determinar a presença de CHMO e CPMO (**tópico II.1**).

Conforme procedimento utilizado por Ricci et al. (2003),<sup>42</sup> as transformações promovidas pelos Basidiomicetos foram feitas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 40 mL de solução tampão fosfato (pH=7), **3g** de biomassa do fungo e 20 µL do substrato (procedimento **III.3.6**, Parte experimental). As reações foram acompanhadas durante 168 horas e os resultados das análises cromatográficas das alíquotas são apresentados na Tabela II.16.

**Tabela II.16:** Biotransformação das cetonas **1a** e **1b** promovida por Basidiomicetos.



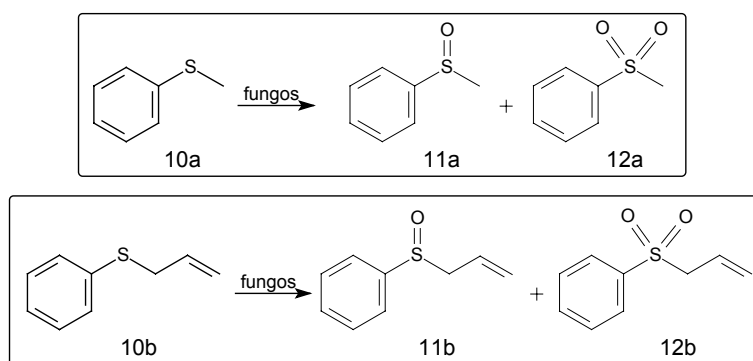
Linha	Microrganismo	1a		1b	
		Álcool 2a c. (%)	Lactona 3a c. (%)	Álcool 2b c. (%)	Lactona 3b c. (%)
1	<i>T. versicolor</i> CCB 202	41 <sup>b</sup>	-	79 <sup>d</sup>	-
2	<i>T. rigida</i> CCB 285	64 <sup>c</sup>	-	- <sup>d</sup>	-
3	<i>I. lacteus</i> CCB 196	57 <sup>d</sup>	-	85 <sup>d</sup>	-
4	<i>P. sanguineos</i> CCB 501	34 <sup>a</sup>	-	75 <sup>a</sup>	-

c: conversão determinada por análise cromatográfica; Tempo de reação: a=24h, b=72h, c=120h, d=168h

Para fins comparativos, foram mantidas as mesmas condições utilizadas para as transformações das cetonas **1a** e **1b**, trocando apenas as cetonas pelos os sulfetos **10a** e **10b**. Os resultados estão apresentados na Tabela II.17.



**Tabela II.17:** Biotransformação dos sulfetos **10a** e **10b** promovida por Basidiomicetos.

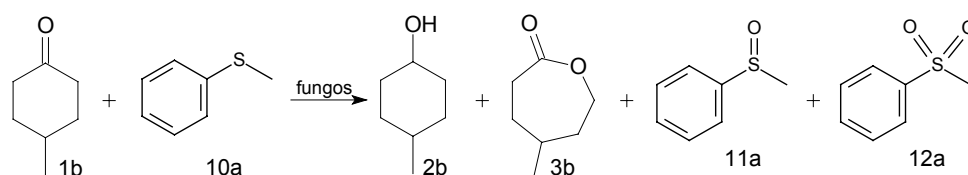


Linha	Microrganismo	10a		10b	
		Sulfóxido 11a c. (%)	Sulfona 12a c. (%)	Sulfóxido 11b c. (%)	Sulfona 12b c. (%)
1	<i>T. versicolor</i> CCB 202	75 <sup>b</sup>	5	92 <sup>a</sup>	3
2	<i>T. rigida</i> CCB 285	93 <sup>d</sup>	7	97 <sup>d</sup>	-
3	<i>I. lacteus</i> CCB 196	91 <sup>b</sup>	9	93 <sup>b</sup>	4
4	<i>P. sanguineus</i> CCB 501	81 <sup>c</sup>	16	94 <sup>c</sup>	5

c: conversão determinada por análise cromatográfica; Tempo de reação: a=24h, b=72h, c=120h, d=168h

Como pode ser observado na Tabela II.16, nas condições experimentais empregadas, nenhum dos quatro Basidiomicetos foi capaz de promover a reação de Baeyer-Villiger, indicando que estes fungos não possuem as mono-oxigenases requeridas para este tipo de reação. Por outro lado, foram extremamente eficientes na oxidação de sulfetos (Tabela II.17). A análise desses dados permite concluir que as enzimas presentes nos metabolismos destes fungos apresentam, em moléculas isoladas, seletividade para a oxidação de sulfetos. Estes resultados podem apresentar um falso positivo, pois a intenção é avaliar a oxidação seletiva dos grupos funcionais presentes em uma única molécula. Então, antes de sintetizar modelos para o estudo de moléculas bi-funcionalizadas, foi feita uma análise da interferência na biotransformação um grupo funcional na presença de outro (grupos sulfeto e carbonila de cetonas cíclicas). Para isso, em um mesmo frasco reacional (procedimento III.3.6, Parte experimental), foi aplicada uma mistura dos substratos **1b** e **10a** (1:1) frente aos microrganismos apresentados na Tabela II.18.

**Tabela II.18:** Biotransformação dos substratos **1b** e **10a**.



Linha	Microrganismo	T (h)	Álcool <b>2b</b> c. <sup>a</sup> (%)	Lactona <b>3b</b> c. <sup>a</sup> (%)	Sulfóxido <b>11a</b> c. <sup>a</sup> (%)	Sulfona <b>12a</b> c. <sup>a</sup> (%)
1		24	82	-	74	7
2	<i>T. versicolor</i> CCB 202	96	77	-	90	10
3		144	78	-	81	16
4		24	68	-	60	3
5	<i>P. sanguineos</i> CCB 501	96	56	-	45	11
6		144	44	-	21	27
7		24	71	-	32	61
8	<i>T. frygossium</i> CCB 203	96	69	-	42	58
9		144	70	-	38	62
10		24	36	64	16	84
11	<i>A. terreus</i> CCT 3571	96	24	76	9	91
12		144	24	76	10	90
13		24	100	-	14	86
14	<i>A. terreus</i> CCT 3320	96	100	-	12	88
15		144	100	-	8	92

<sup>a</sup>c: conversão determinada por análise cromatográfica

Quando comparados os dados experimentais das Tabelas II.16, II.17 e II.18, pode-se observar que a mistura dos substratos promoveu uma alteração considerável nas transformações promovidas pelos Basidiomicetos. Por exemplo, quando a biotransformação da cetona **1b** foi promovida pelo *T. versicolor* CCB 202, obteve-se o álcool correspondente **2b** com conversão de 41% (72 horas de reação; Tabela II.16, linha 1). Usando o mesmo biocatalisador e misturando os substratos **1b** e **10a**, o álcool **2b** foi obtido com rendimento cromatográfico de 77% (96 horas de reação; Tabela II.18, linha 2). Um comportamento interessante pode ser observado quando o fungo *P. sanguineos* CCB 501 foi utilizado como fonte enzimática. Quando misturados os substratos (24 horas de reação), houve um incremento na produção do álcool **2b** de 100% frente à transformação da cetona **1b** isolada (Tabela II.16, linha 4 e Tabela 18 linha 4).

A oxidação do sulfeto **10a** pelo *T. versicolor* CCB 202 seguiu um comportamento semelhante para ambos experimentos (Tabela II.17, linhas 1 e Tabela II.18, linha 2). Quando utilizado o fungo *P. sanguineos* CCB 501, a oxidação do sulfeto **10a** foi afetada de forma significante quando a cetona **1b** está presente no meio

reacional. Pode ser observado na Tabela II.17 (linha 4) que a oxidação do sulfeto **10a** foi lenta, atingindo um nível satisfatório de oxidação (**11a**, conversão de 81%) em 120 horas. Com 96 horas de reação (Tabela II.18, linha 5), o mesmo sulfeto agora sofrendo a influência da cetona **1b** foi convertido ao sulfóxido correspondente **11a** com rendimento cromatográfico de 45%. Ao invés de ocorrer um incremento no rendimento com o passar do tempo, há uma queda considerável de rendimento, pois o sulfóxido foi oxidado a sulfona (Tabela II.18, linhas 5 e 6).

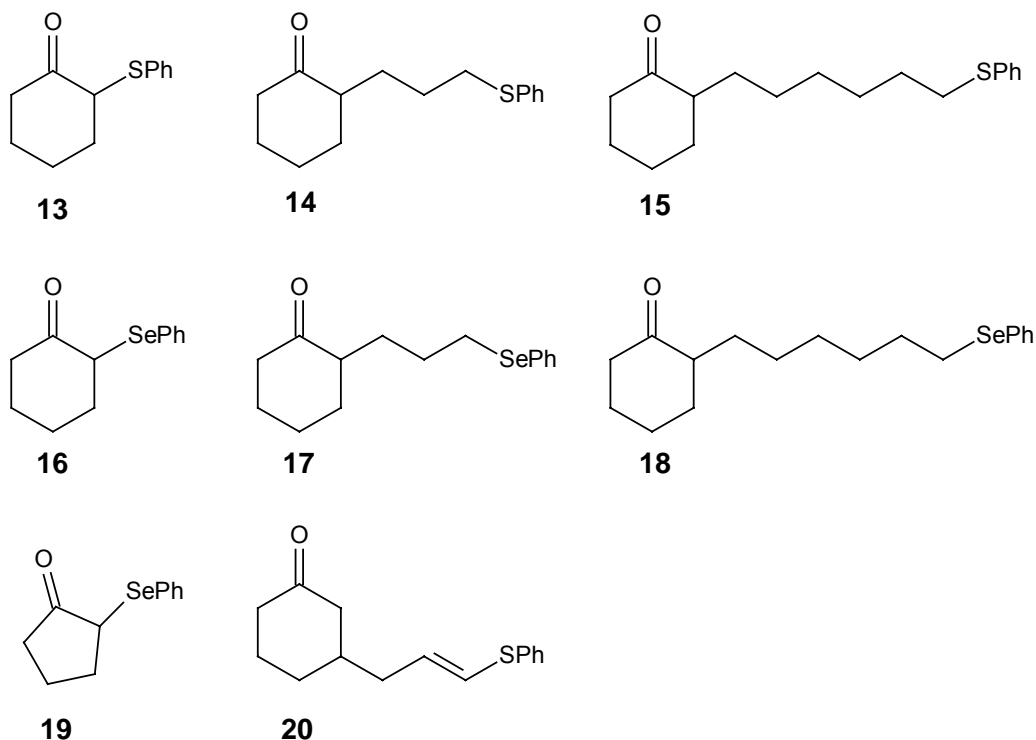
Foram utilizadas duas linhagens de *Aspergillus* para avaliar a influência de um grupo funcional na transformação de outro. Conforme já havia sido dito, as mono-oxigenases presentes nas linhagens dos *Aspergillus* estudadas são capazes de promover reações de Baeyer-Villiger assim como oxidação de sulfetos (Tabela II.18, linhas 10-15). Quando o *A. terreus* CCB 3571 foi utilizado, a oxidação do grupo carbonila foi muito eficiente frente à redução competitiva (Tabela II.18, linhas 10-12). É interessante notar que a atividade da oxidase foi tão alta que a sulfona **11a** foi o produto majoritário da oxidação do sulfeto **10a**. No caso do *A. terreus* CCT 3320 a reação de Baeyer-Villiger não ocorre, apesar da oxidação do sulfeto ser extremamente efetiva, pois se obtém prioritariamente a sulfona **12a** (Tabela II.18, linhas 13-15). O fungo *A. terreus* CCT 3320 promoveu exclusivamente a oxidação do sulfeto **10a** (Tabela II.18, linhas 13-15). Apesar de ser um produto esperado, a lactona **3b** não foi detectada.

A análise dos dados deixou claro que mudando alguma variável reacional, o comportamento do sistema enzimático pode sofrer alterações. Sendo assim, conclui-se que nas condições experimentais empregadas, os Basidiomicetos não apresentaram atividade das enzimas mono-oxigenases (CHMO e CPMO). Essa afirmação é feita porque não foi detectado o produto da reação de Baeyer-Villiger.

### **II.3.2 – Síntese das moléculas bi-funcionalizadas**

Idealmente uma molécula modelo de um estudo biocatalítico deve ser disponível comercialmente ou então deve ter uma rota sintética acessível. Nos estudos preliminares de avaliação do potencial enzimático dos fungos foram utilizados substratos modelos que eram disponíveis comercialmente. O grande desafio deste trabalho não foi somente a busca por enzimas com potencial quimiosseletivo para a

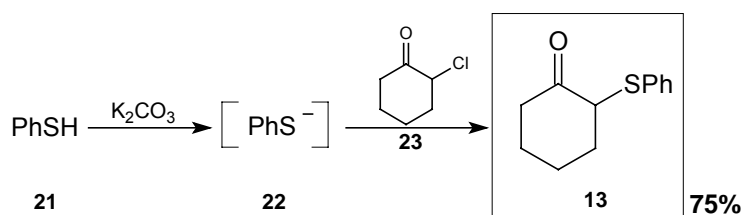
oxidação de sulfetos, mas também a síntese de uma classe de moléculas que contenham em seu esqueleto básico o grupo carbonila e o grupo sulfeto. As diferenças estruturais contidas nas moléculas permitem uma análise mais detalhada do comportamento biocatalítico de cada fungo. Inserindo-se na linha de pesquisa de nosso laboratório, também foram preparados selenetos análogos aos sulfetos, visando reunir dados que poderão ser úteis para futuras aplicações sintéticas. As moléculas preparadas para este estudo são apresentadas na Figura II.9.



**Figura II.9:** Substratos selecionados para síntese e biotransformação.

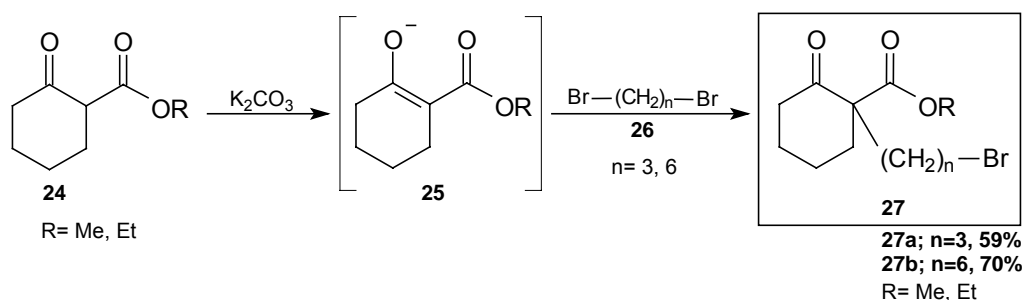
Para explorar a influência das diferenças estruturais dos substratos nas transformações, uma série de moléculas bi-funcionalizadas (Figura II.9) foi sintetizada mantendo uma lógica para fins comparativos. Os grupos sulfeto e seleneto distanciam-se do grupo carbonila nas séries **13-15** e **16-18**. O substrato **16** possui uma cetona cíclica de seis carbonos no seu esqueleto, enquanto que a cetona cíclica do substrato **19** tem cinco carbonos. Aparentemente fora da série, o substrato **20** foi sintetizado para outro fim e aproveitado neste estudo por apresentar características interessantes. Esse substrato é o único que tem substituição na posição  $\beta$  ao grupo carbonila e uma insaturação. Todos os substratos foram preparados conforme procedimentos descritos na literatura, cada qual detalhado no capítulo **Parte Experimental**.

O substrato (**13**) foi preparado a partir da reação da 2-cloro-cicloexanona (**23**) com o ânion tiofenolato (**22**), conforme procedimento III.1.27 (Parte experimental).



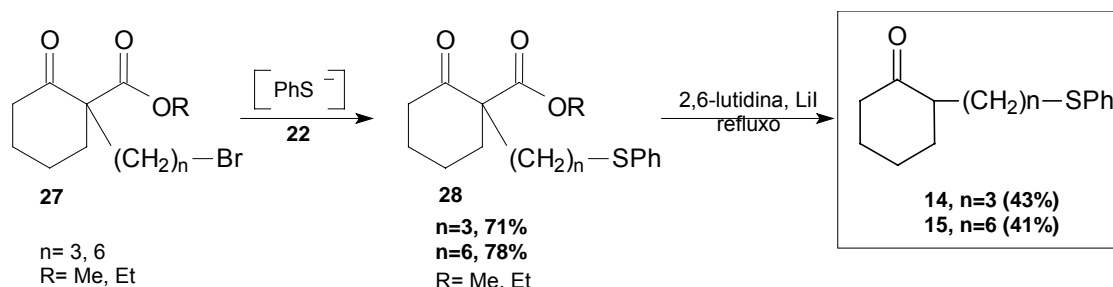
**Esquema II.12:** Síntese da 2-(feniltio)cicloexanona (**13**).

Os substratos **14**, **15**, **17** e **18** foram preparados partindo do ceto-éster (**24**), que sofreu abstração do hidrogênio  $\alpha$  a carbonila. O seu enolato estabilizado (**25**) reagiu com o di-bromo adequado (**26**), levando aos intermediários **27a** e **27b**, conforme os procedimentos III.1.23 e III.1.24 (Parte experimental).



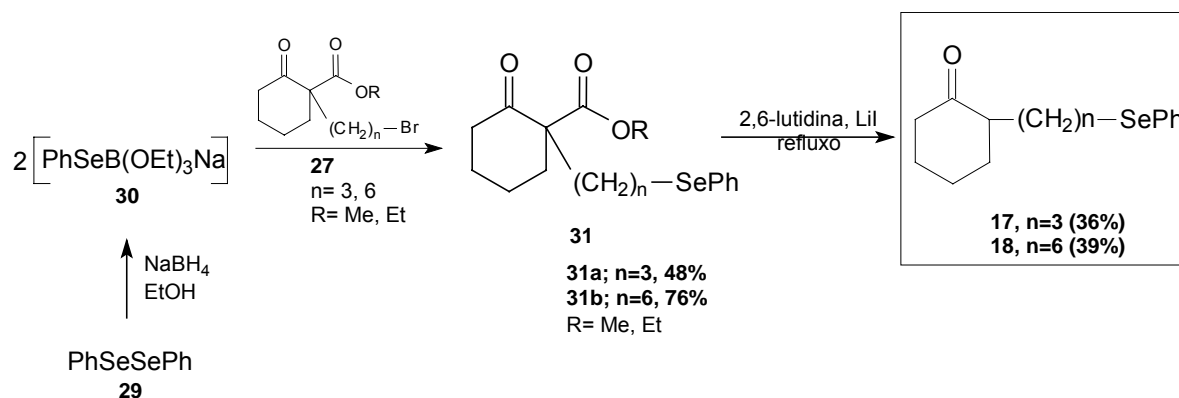
**Esquema II.13:** Síntese dos brometos (**27**).

Os substratos (**14** e **15**) foram preparados a partir da reação dos brometos (**27a** e **27b**) com o ânion tiofenolato (**22**). Os compostos **28a** e **28b** foram purificados e descarboxilados, levando aos substratos **14** e **15**; conforme os procedimentos III.1.26 e III.1.27 (Parte experimental).



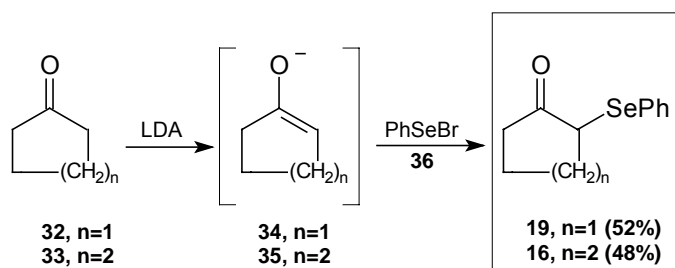
**Esquema II.14:** Síntese da 2-[3-(feniltio)propil]cicloexanona (**14**) e da 2-[6-(feniltio)hexil]cicloexanona (**15**).

A síntese dos selenetos seguiu um procedimento semelhante ao descrito acima. Inicialmente foi preparado o selenolato de fenila (**30**) a partir da reação do PhSeSePh (**29**) com NaBH<sub>4</sub>. Assim como o tiofenolato, o ânion selenolato reagiu com os brometos (**27a** e **27b**). Os produtos foram purificados descarboxilados, levando aos substratos **17** e **18**; conforme os procedimentos III.1.28 e III.1.29 (Parte experimental).



**Esquema II.15:** Síntese da 2-[3-(fenilselena)propil]cicloexanona (**17**) e da 2-[6-(fenilselena)hexil]cicloexanona (**18**).

Os selenetos **19** e **16** foram preparados a partir dos enolatos de lítio da ciclopentanona (**32**) e da cicloexanona (**33**), respectivamente. Os enolatos (**34** e **35**) reagiram com o brometo de fenilselenila (**36**), preparado em outro frasco reacional; conforme os procedimentos III.1.30 e III.1.31 (Parte experimental).

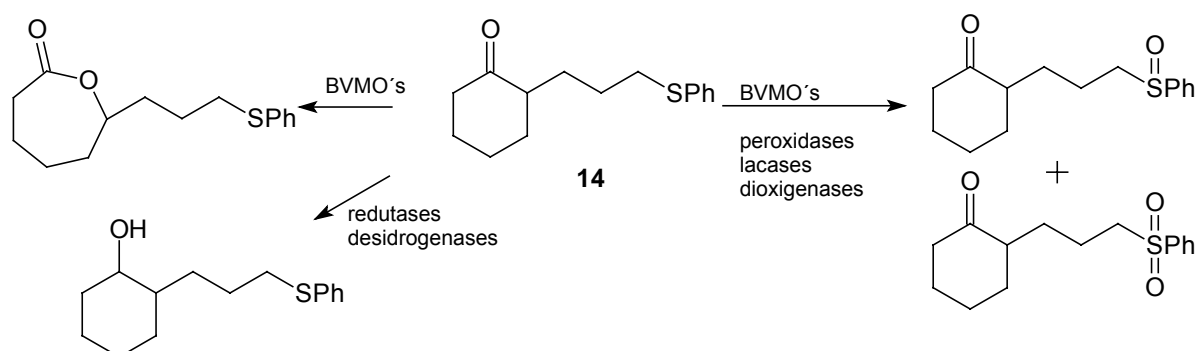


**Esquema II.16:** Síntese da 2-(fenilselena)ciclopentanona (**19**) e da 2-(fenilselena)cicloexanona (**16**).

### II.3.3 - Transformações biológicas das moléculas bi-funcionalizadas

Buscando a união da síntese orgânica e do conhecimento biocatalítico adquirido ao longo dos estudos desenvolvidos, a aplicação dos microrganismos selecionados em moléculas preparadas especialmente para este fim pode ser considerada a etapa que fecha o elo entre os estudos desenvolvidos nesse trabalho.

No Esquema II.17 são apresentadas, a título de exemplo, as possíveis transformações do substrato **14**, quando aplicados os fungos utilizados neste trabalho.



**Esquema II.17:** Possíveis transformações do substrato **14**.

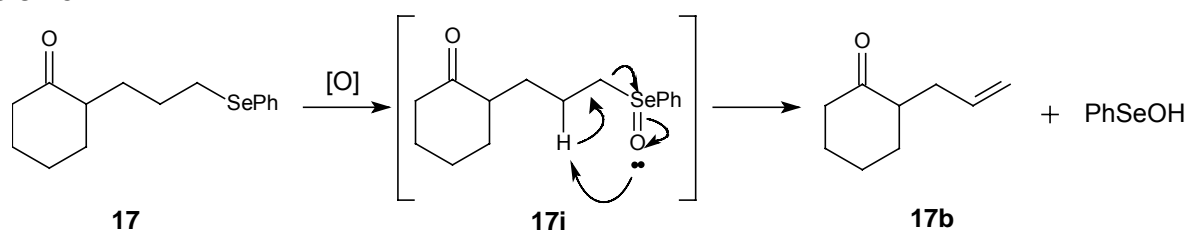
Conforme resultados apresentados no **tópico II.3.1** (Tabela II.16), utilizando os *Basidiomicetos*, é possível que ocorram duas transformações no substrato **14**: Esses microrganismos podem oxidar o grupo sulfeto e reduzir a carbonila. Sendo assim, para cada substrato que contém o grupo sulfeto, existe a possibilidade da obtenção de seis diferentes produtos. No caso dos selenetos, o número de produtos é reduzido para quatro, já que o átomo de selênio nos substratos **14** e **15** pode sofrer uma eliminação oxidativa (tópico **II.3.3.1**).

O objetivo principal desse estudo foi verificar se as enzimas presentes no metabolismo dos *Basidiomicetos* eram quimiosseletivas para a oxidação de sulfetos, para isso foram selecionados os fungos *Trichaptum byssogenum* CCB 203 e *Pycnoporus sanguineus* CCB 501. Visto que o acompanhamento das transformações seria muito complexo, buscamos um método analítico rápido e eficiente para avaliar as transformações. Somando a necessidade de otimizar a velocidade das análises, minimizar tempo e os custos relativos a preparação de todos os possíveis produtos e por estar disponível em nosso laboratório, a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) foi considerada a técnica mais adequada para este fim.

O mesmo procedimento experimental utilizado no **tópico II.3.1** foi adotado para efetuar as reações usando fungos. Foram retiradas alíquotas de 48, 96, 144 horas e estas analisadas por CG-EM, utilizando o método 5 (procedimento **III.1.1**, Parte Experimental). Para facilitar a discussão dos resultados, estes serão divididos em blocos. Nos blocos estarão contidos os substratos que apresentam semelhanças estruturais. Os fungos serão tratados apenas pelas siglas CCB 203 e CCB 501 e para cada alíquota é identificado o método de análise cromatográfica que foi utilizado. Os detalhes de cada método são apresentados no tópico **III.1.1** (Parte experimental).

### II.3.3.1 – Selenetos 17 e 18

De todas as reações de compostos de selênio, a eliminação oxidativa é uma das mais conhecidas. Nesta reação o átomo de selênio é oxidado a selenóxido e devido à instabilidade dessa espécie, ocorre uma eliminação *syn*. Tomando como exemplo a oxidação do seleneto **17** (Esquema II.18), o selenóxido **17i** não foi isolado. No entanto, o alceno **17b** serviu como indício de que ocorreu a oxidação do átomo de selênio.



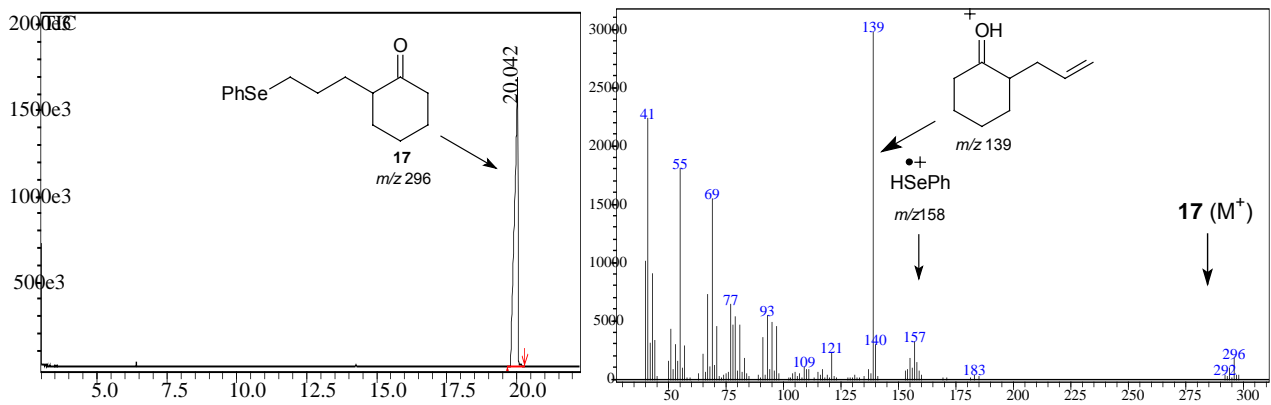
**Esquema II.18:** Eliminação oxidativa do seleneto no substrato **17**.

Os resultados obtidos nas transformações destes dois substratos mostraram que além de oxidar sulfetos, os fungos CCB 203 e CCB 501 possuem enzimas capazes de oxidar selenetos.

#### Transformação da 2-[3-(fenilselênio)propil]cicloexanona (**17**).

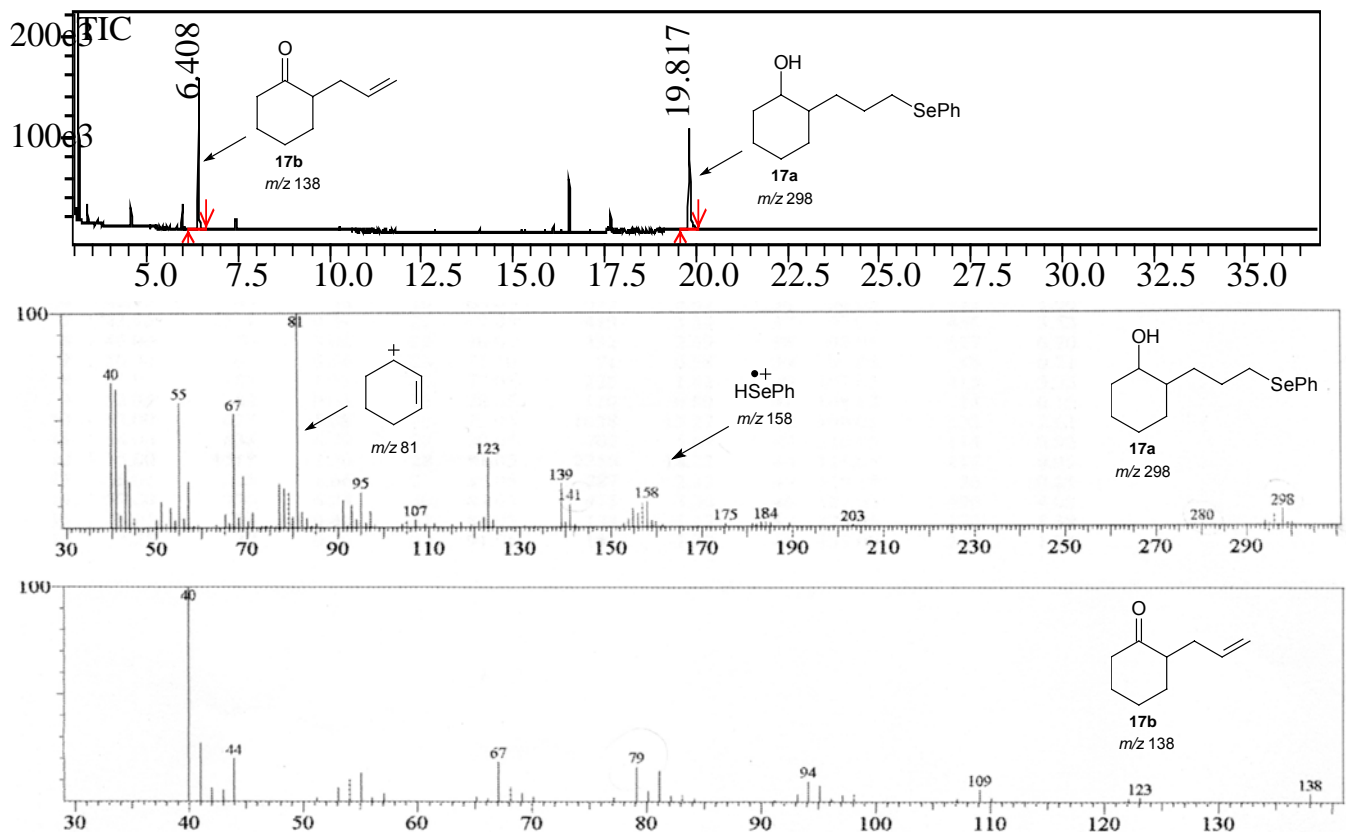
Para comprovar a pureza do substrato **17** e determinar sua fragmentação por espectrometria de massa, foi feita uma análise de CG-EM (Figura II.10).





**Figura II.10:** Cromatograma e espectro de massa do substrato **17** (método 5).

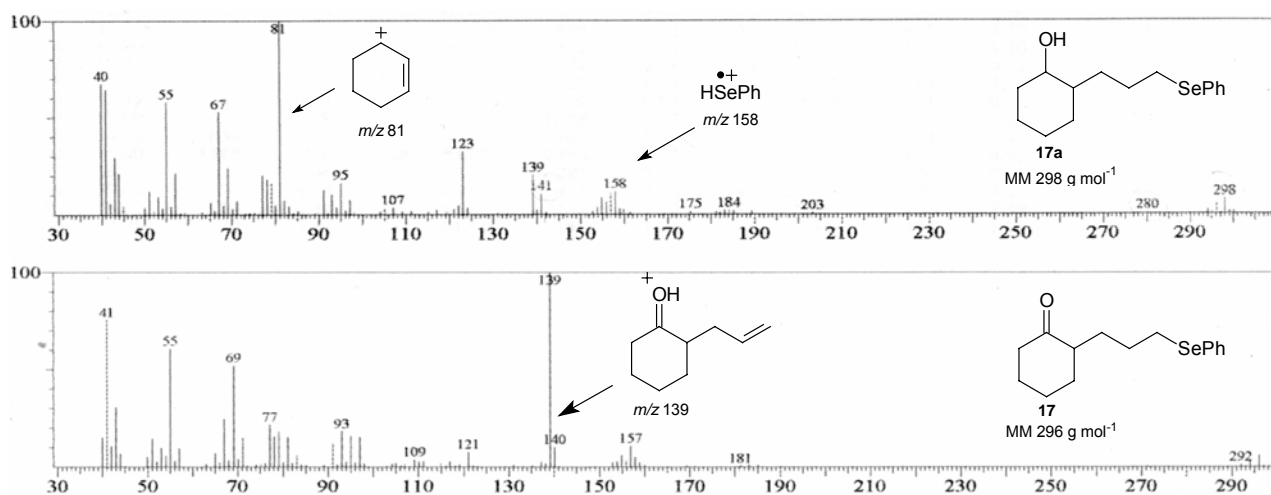
Os fungos CCB 203 e CCB 501 consumiram rapidamente o substrato **17**, pois na alíquota referente à 48 horas de reação, nenhum traço do material de partida foi detectado. Nessas alíquotas (dos dois fungos), foi detectada a presença do álcool **17a** ( $t_R=19,8$ ) e do produto relativo a oxidação do seleneto **17b** ( $t_R=6,40$ ), conforme Figura II.11. Para ambos os fungos, a partir da alíquota de 96 horas de reação o produto **17b** não foi detectado.



**Figura II.11:** Cromatograma e espectro de massa da reação (48 horas), utilizando o fungo CCB 501 (método 5).

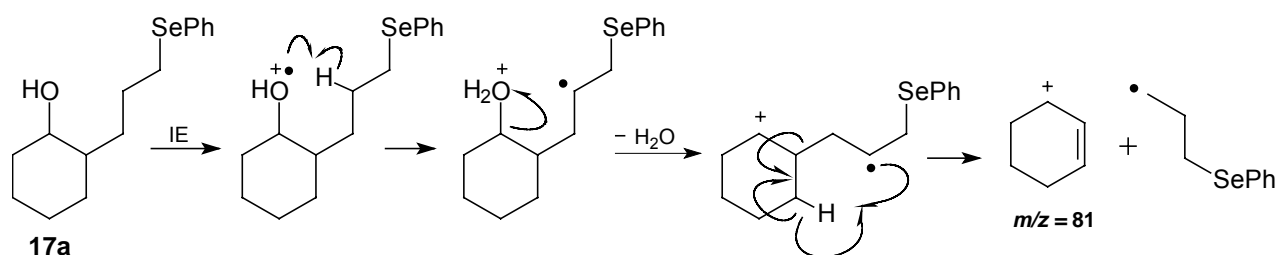
No caso do CCB 501, os dois produtos apresentam-se com uma proporção 55:45 (**17a:17b**), indicando uma forte competição das enzimas pelo substrato. Quando utilizado o CCB 203 a proporção foi de 84:16 (**17a:17b**), mostrando que a atividade da enzima que promove a oxidação do selênio é muito mais lenta que a atividade das álcool desidrogenases presentes no sistema enzimático desse fungo.

A primeira vista, não foi fácil determinar que ocorreu a transformação do substrato **17** no produto **17a**. Os tempos de retenção do produto **17a** e do substrato **17** são praticamente os mesmos ( $t_R = 19,8$  e  $20,0$ ). A pequena estabilidade dos íons moleculares ( $M^+$ ) também não permite que se possa confirmar a redução da carbonila. No entanto, quando comparados os espectros de massa do produto **17a** e do substrato **17**, nota-se um íon de  $m/z = 81$  no espectro de **17a** que não existe no espectro do substrato **17** (Figura II.12).



**Figura II.12:** Espectros de massa do substrato **17** e do álcool derivado **17a**.

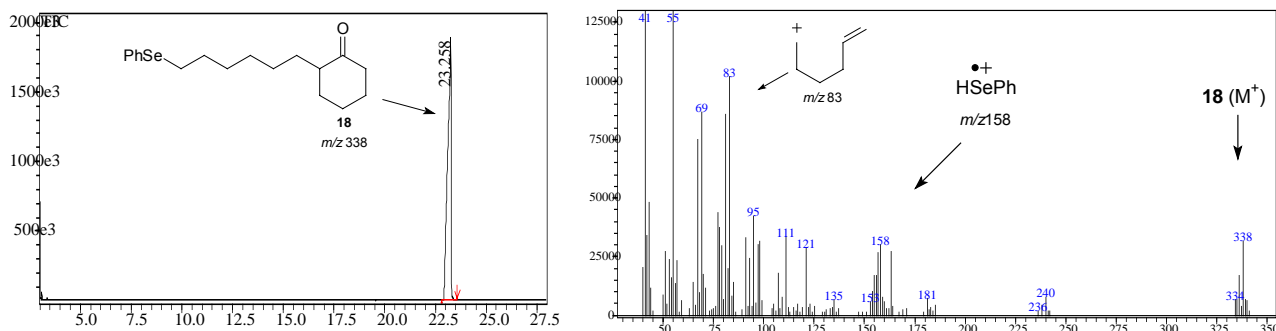
O íon base do espectro de massa do álcool **17a** é o de  $m/z = 81$ , indicando que a fragmentação que gera este íon é altamente favorecida. Fazendo a clivagem do produto **17a** (Esquema II.19), verifica-se que o íon de  $m/z = 81$  é oriundo da fragmentação iniciada pelo sítio radicalar hidroxila. Sendo assim, este íon deve ser proveniente do álcool **17a**.



**Esquema II.19:** Fragmentação do produto **17a**, levando a formação do íon de  $m/z = 81$ .

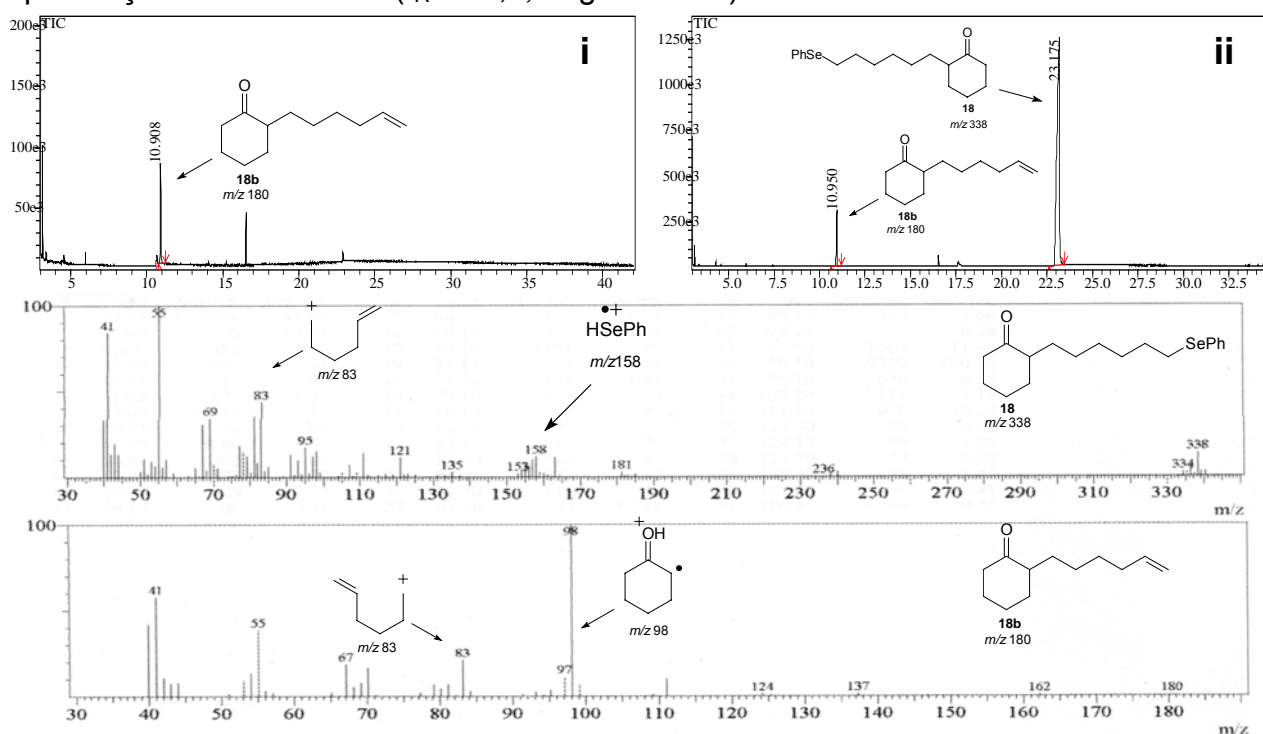
## Transformação da 2-[6-(fenilseleno)hexil]ciclohexanona (**18**).

Para comprovar a pureza do substrato **18** e determinar sua fragmentação por espectrometria de massa, foi feita uma análise de CG-EM (Figura II.13).



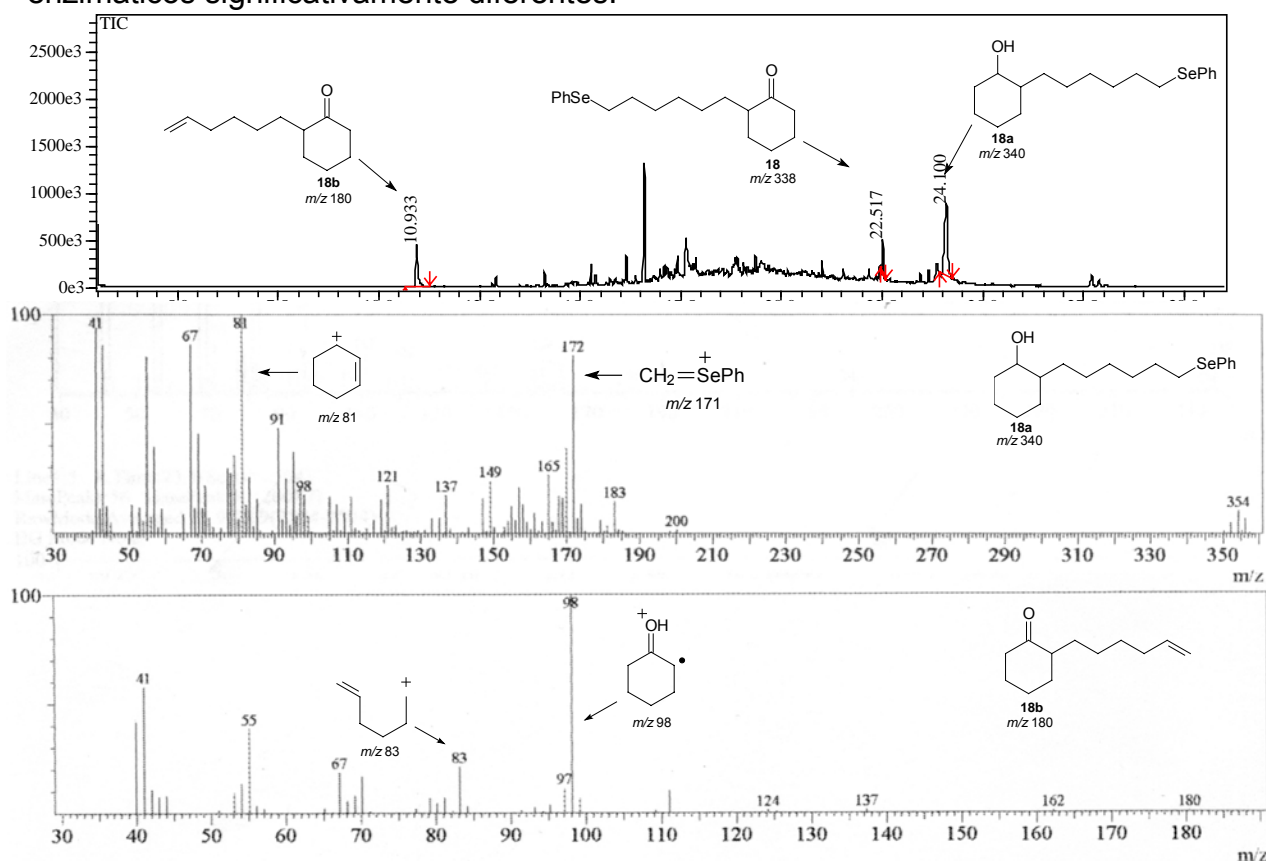
**Figura II.13:** Cromatograma e espectro de massa do substrato **18** (método 5).

Apesar de semelhantes, os substratos **17** e **18** apresentaram comportamentos diferentes quando submetidos aos fungos CCB 203 e CCB 501. O cromatograma da alíquota de 48 horas de reação do substrato **18** com o fungo CCB 203 (Figura II.14i) contém apenas um sinal referente à transformação do substrato **18**. Nenhum traço do substrato **18** foi detectado. Isso indica que a enzima que promove a oxidação do seleneto foi extremamente eficiente na transformação do substrato **18**. Quando foi utilizado o fungo CCB 501, na alíquota de 48 horas de reação, ainda foi detectada a presença do substrato **18** ( $t_R = 23,1$ ; Figura II.14ii).



**Figura II.14:** Cromatogramas e espectros de massa das reações (48 horas), utilizando os fungos CCB 203 (i) e CCB 501 (ii) – método 5.

Passadas 144 horas de reação com o fungo CCB 501, observa-se que uma parte do substrato foi oxidada (alceno **18b**;  $t_R=10,9$ ). Nessa alíquota foi detectado o produto que apresenta o íon com  $m/z = 81$  (álcool **18a**,  $t_R = 24,1$ ). Uma pequena quantidade do substrato **18** ainda permaneceu intacto no meio reacional (Figura II.15). Esse resultado demonstra que os fungos CCB 203 e CCB 501 possuem sistemas enzimáticos significativamente diferentes.



**Figura II.15:** Cromatograma e espectro de massa da reação (144 horas), utilizando o fungo CCB 501 (método 5).

Como pode ser observado nos cromatogramas (Figuras II.14 e II.15), as álcool desidrogenases presentes nos sistemas enzimáticos dos fungos CCB 203 e 501 não foram eficazes na redução da carbonila do substrato **18**, visto que o sinal do álcool **18a** somente foi detectado na alíquota de 144 horas de reação. Vale ressaltar que essas enzimas reduziram a carbonila do substrato **17** logo nas primeiras 48 horas de reação.

Levando em consideração o aspecto qualitativo do método analítico utilizado, foi possível avaliar a velocidade de consumo do substrato e verificar quais enzimas estão agindo no tempo reacional determinado pela coleta da alíquota, utilizando para isso os espectros de massas das alíquotas. As análises não foram utilizadas para fins quantitativos.

Em relação aos fungos utilizados como fontes enzimáticas, pode-se observar que os 3 grupos metileno que diferenciam os substratos **17** e **18** foram suficientes para que as transformações ocorressem de forma diversa. Quando empregado o fungo CCB 203, este promoveu em 48 horas a completa oxidação do grupo seleneto do substrato **18**. No mesmo tempo de reação, todo o substrato **17** sofreu transformações competitivas, levando a uma mistura do produto de oxidação do grupo seleneto (45%) com o produto de redução da carbonila (55%). Quando empregado o fungo CCB 501, o consumo do substrato **18** não foi completo: o sinal referente ao substrato **18** foi detectado em todas as alíquotas (48, 96 e 144 horas de reação). Contrariamente, quando o substrato **17** foi submetido ao fungo CCB 501, passadas 48 horas de reação, nenhum traço do material de partida foi detectado no meio reacional.

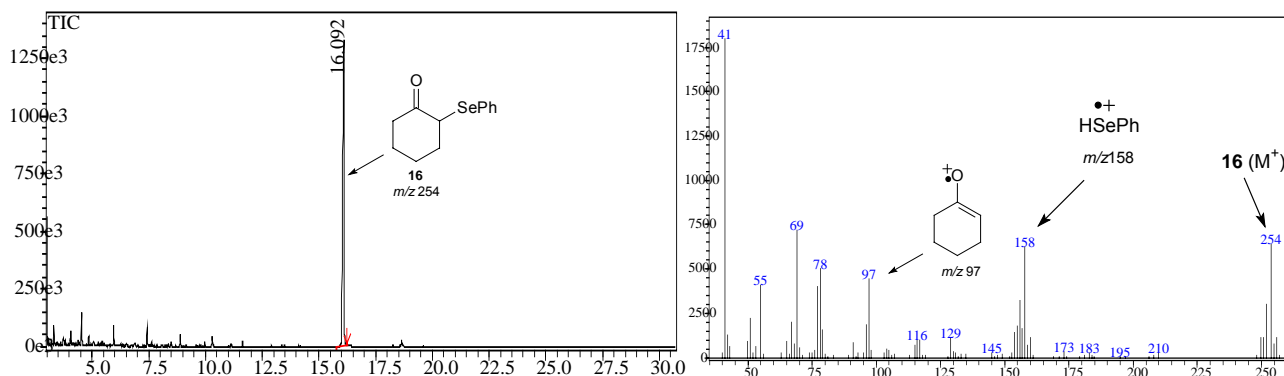
Apesar das semelhanças estruturais dos substratos **17** e **18**, conclui-se que as enzimas presentes nos metabolismos dos fungos foram altamente específicas frente às diferenças estruturais das moléculas.

### II.3.3.2 – Selenetos **16** e **19**

Os resultados apontam que o grupo seleneto, estando ligado ao carbono  $\alpha$  ao grupo carbonila, não sofre oxidação quando submetido aos fungos CCB 203 e o CCB 501.

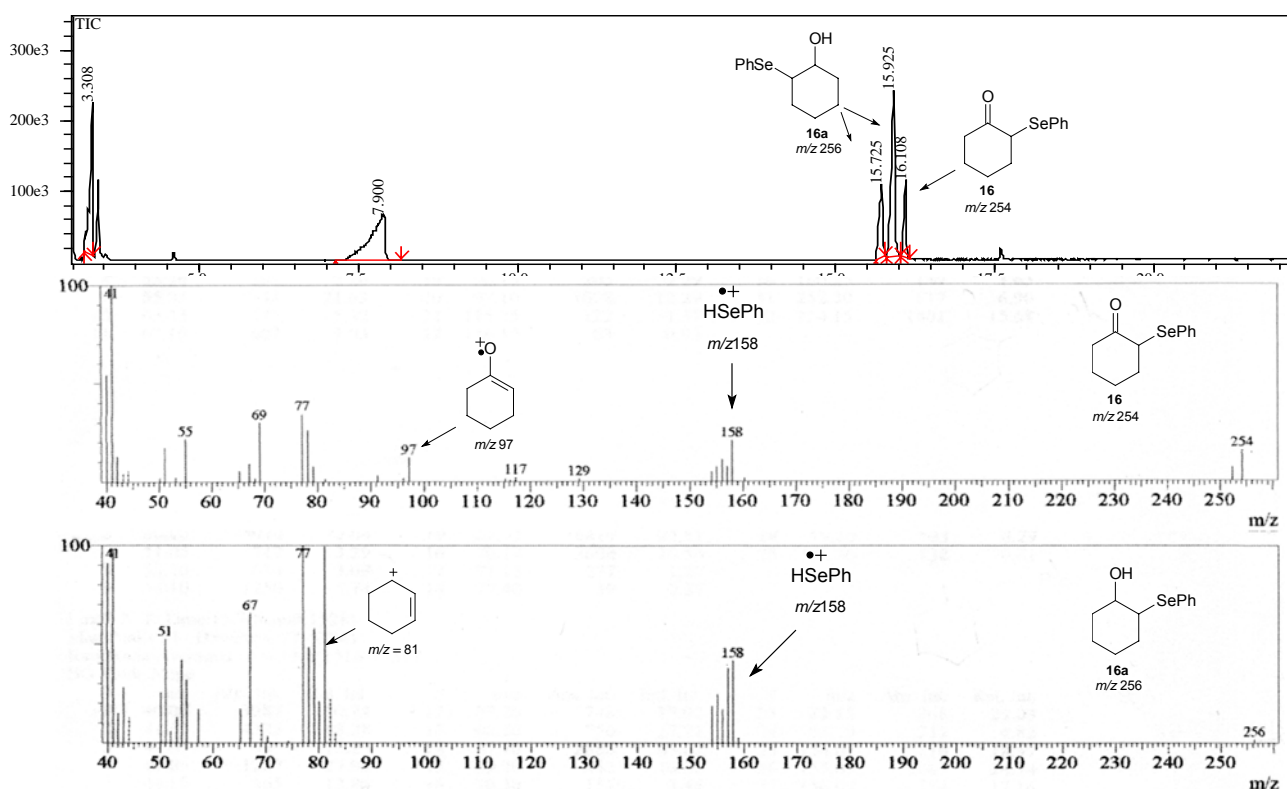
#### Transformação da 2-(fenilseleno)ciclohexanona (**16**).

Para comprovar a pureza do substrato **16** e determinar sua fragmentação por espectrometria de massa, foi feita uma análise de CG-EM (Figura II.16).



**Figura II.16:** Cromatograma e espectro de massa do substrato **16** (método 5).

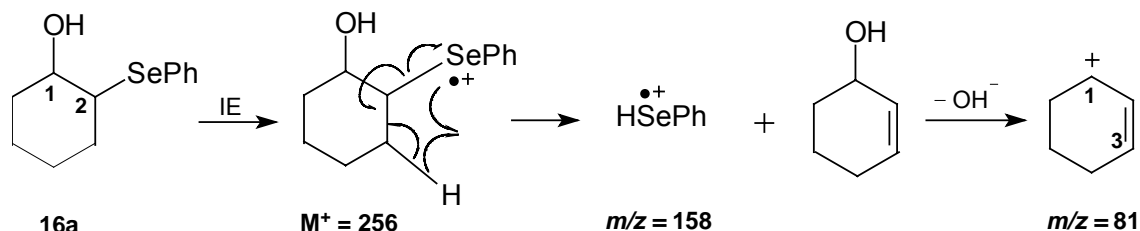
Quando o fungo CCB 501 foi utilizado como fonte enzimática para promover a transformação do substrato **16**, após 48 horas de reação, observou-se apenas a redução do grupo carbonila, levando ao álcool **16a** ( $t_R = 15,7$  e  $15,9$ ), com rendimento cromatográfico de 82%, em relação aos 18% do substrato **16** que não foi consumido (Figura II.17). De acordo com a biblioteca de espectros de massa (CLASS-500/Wiley), os picos com  $t_R = 3,3$  e com  $t_R = 7,6$  são respectivamente, a ciclohexanona e o ácido octanóico. Passadas 96 horas de reação, praticamente todo o substrato foi consumido.



**Figura II.17:** Cromatograma e espectros de massa da reação (48 horas), utilizando o fungo CCB 501 (método 5).

Um comportamento semelhante foi observado quando a biotransformação foi promovida pelo fungo CCB 203. Com 48 horas de reação, praticamente todo o substrato foi transformado no produto **16a**. A diferença marcante entre os dois fungos foi que depois de 144 horas o fungo CCB 203 promoveu a degradação de uma parte do produto **16a**, liberando no meio reacional PhSeSePh. Enquanto que a reação com o fungo CCB 501, nas mesmas 144 horas, não foi detectada a presença do PhSeSePh.

Com base no íon molecular detectado ( $M^+ = 256$ ) e na fragmentação do produto **16a** (Esquema II.20), é proposto que os picos com  $t_R = 15,7$  e  $15,9$  sejam da mistura diastereomérica do álcool **16a** (Esquema II.22).

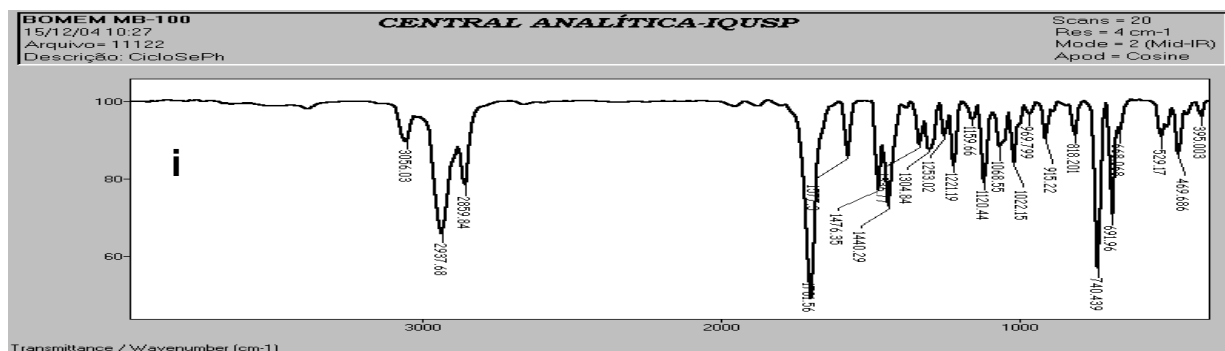


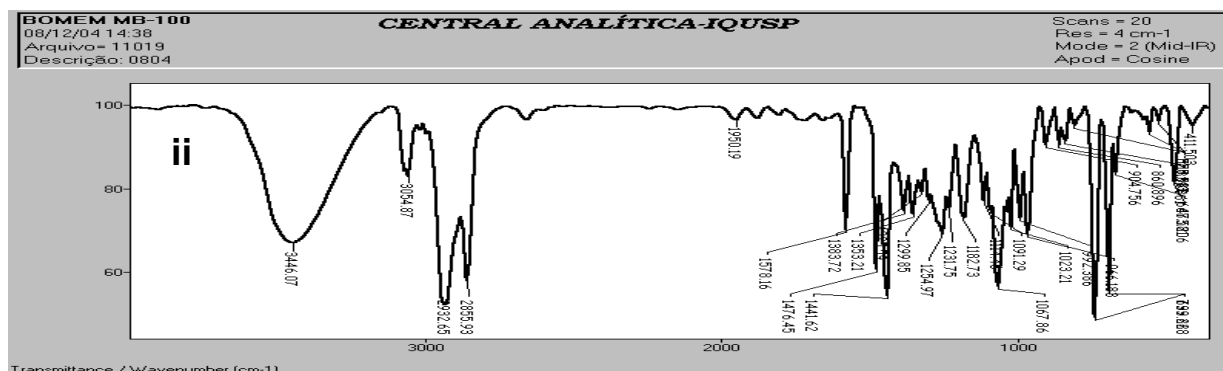
**Esquema II.20:** Fragmentação do produto **16a**.

O íon base do espectro de massa do produto **16a** é o de  $m/z = 81$  (Figura II.16), indicando que esta fragmentação é altamente favorecida. Essa constatação condiz com a elevada estabilidade do cátion alílico, dada pela deslocalização da carga positiva nos carbonos C1 e C3.

A confirmação da estrutura do produto **16a** foi possível com seu isolamento e com a análise dos dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e IV. Para isso, foram preparados 10 frascos reacionais utilizando o fungo CCB 501 como fonte enzimática (procedimento III.3.7, Parte experimental). O produto **16a** foi isolado com 45% de rendimento (dados da caracterização do produto: tópico III.2.1; Parte experimental).

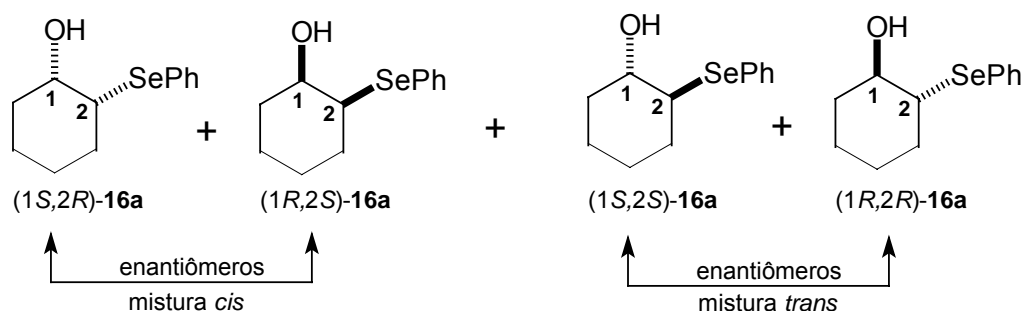
No espectro de absorção na região do infravermelho (IV) do substrato **16** (Figura II.18i), observa-se a absorção característica de estiramento da ligação C=O de cetona,  $\nu = 1701\text{ cm}^{-1}$ , que não está presente no IV do produto **16a** (Figura II.18ii). Nesse espectro do produto **16a** é bem visível a banda larga característica da ligação OH em  $\nu = 3441\text{ cm}^{-1}$ , indicando que ocorreu a redução do grupo carbonila.





**Figura II.18:** Espectros na região do IV do substrato **16 (i)** e do álcool **16a (ii)**.

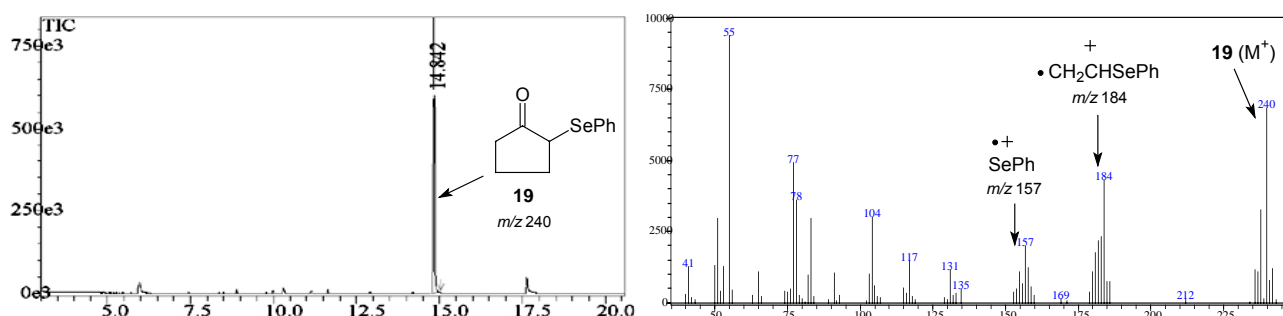
Corroborando na elucidação estrutural da molécula, o sinal em 207 ppm ( $C_0$ ) que caracteriza a carbonila de uma cetona no espectro de RMN  $^{13}C$  do álcool **16** (anexo 49) desaparece no espectro do produto **16a** (anexo 55). Os dados espectroscópicos do produto da reação biocatalisada (**16a**) confirmam sua estrutura.



**Esquema II.21:** Mistura dos pares de enantiômeros do álcool **16a**.

### Transformação da 2-(fenilseleno)ciclopentanona (**19**).

Para comprovar a pureza do substrato **19** e determinar sua fragmentação por espectrometria de massa, foi feita uma análise de CG-EM (Figura II.19).

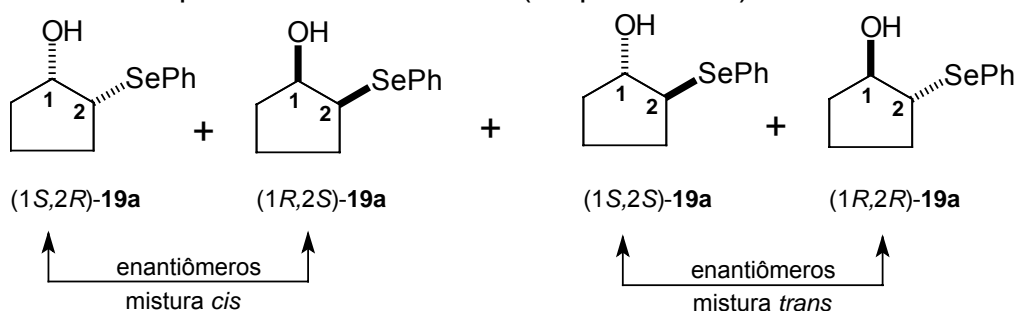


**Figura II.19:** Cromatograma e espectro de massa do substrato **19** (método 5).

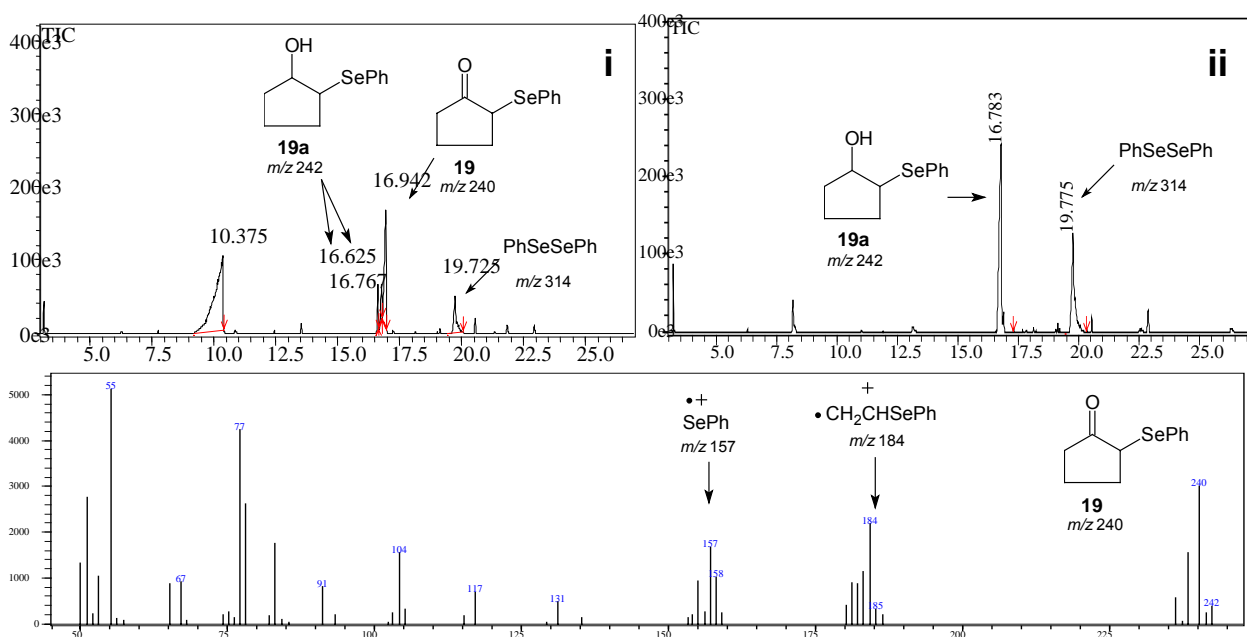


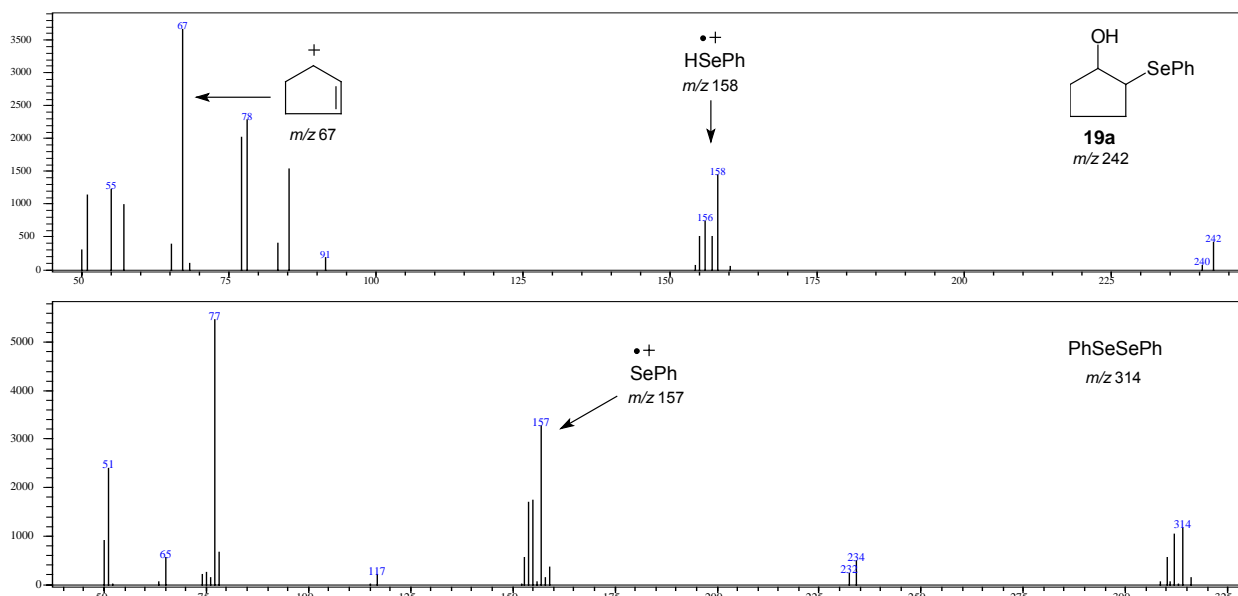
Após 48 horas de reação com o fungo CCB 501, pode-se observar que o substrato **19** sofreu algum tipo de transformação, mas a identificação dos produtos foi dificultada porque diversos produtos com tempos de retenção muito próximos se sobrepuseram. A solução foi utilizar um outro método cromatográfico (**método 4**, procedimento **III.1.1**, Parte Experimental) com uma rampa de aquecimento mais lenta, sendo possível então determinar a presença do álcool **19a** ( $t_R = 16,6$  e  $16,7$ ; Figura II.20i). Uma quantidade considerável do substrato **19** não foi transformado. Nota-se também que o fungo CCB 501 degrada as moléculas que possuem  $-\text{SePh}$  (o substrato **19** e o produto **19a**), pois no cromatograma dessa alíquota também se pode verificar a presença de uma quantidade considerável de  $\text{PhSeSePh}$  ( $t_R = 19,7$ ). Também se destaca o ácido octanóico ( $t_R = 10,3$ ).

Quando utilizado o fungo CCB 203, observa-se que todo o substrato é consumido, levando à apenas ao produto **19a**, de forma seletiva, pois no cromatograma (Figura II.20ii) aparece apenas o sinal com  $t_R = 16,7$  que é referente a um par de enantiômeros possíveis do álcool **19a** (Esquema II.22).



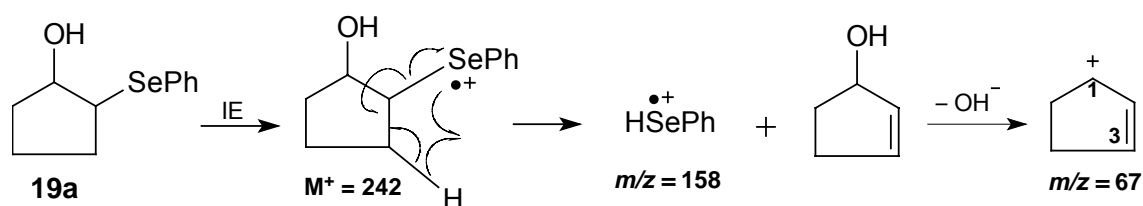
**Esquema II.22:** Mistura dos pares de enantiômeros do álcool **19a**.





**Figura II.20:** Cromatograma e espectros de massa da reação (48 horas), utilizando o fungo CCB 501(i) e o CCB 203 (ii) – método 4.

Com base no íon molecular detectado ( $M^+ = 242$ ) e na fragmentação do produto **19a** (Esquema II.23), é proposto que o picos com  $t_R = 16,6$  e  $16,7$  sejam da mistura isomérica do álcool **19a**.



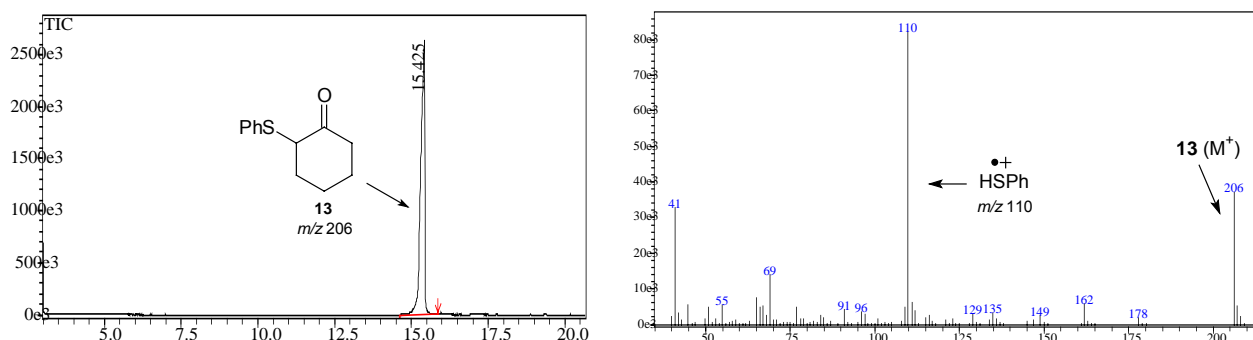
**Esquema II.23:** Fragmentação do produto **19a**.

O íon base do espectro de massa do produto **19a** é o de  $m/z = 67$  (Figura II.20), indicando que esta fragmentação é altamente favorecida. Essa constatação condiz com a elevada estabilidade do cátion alílico, dada pela deslocalização da carga positiva nos carbonos C1 e C3.

Para confirmar a estrutura do produto foram preparados 10 frascos reacionais utilizando o fungo CCB 203 como fonte enzimática (procedimento III.3.7, Parte experimental). O produto **19a** foi isolado com um rendimento baixo e essa molécula foi caracterizada por RMN  $^1\text{H}$ .

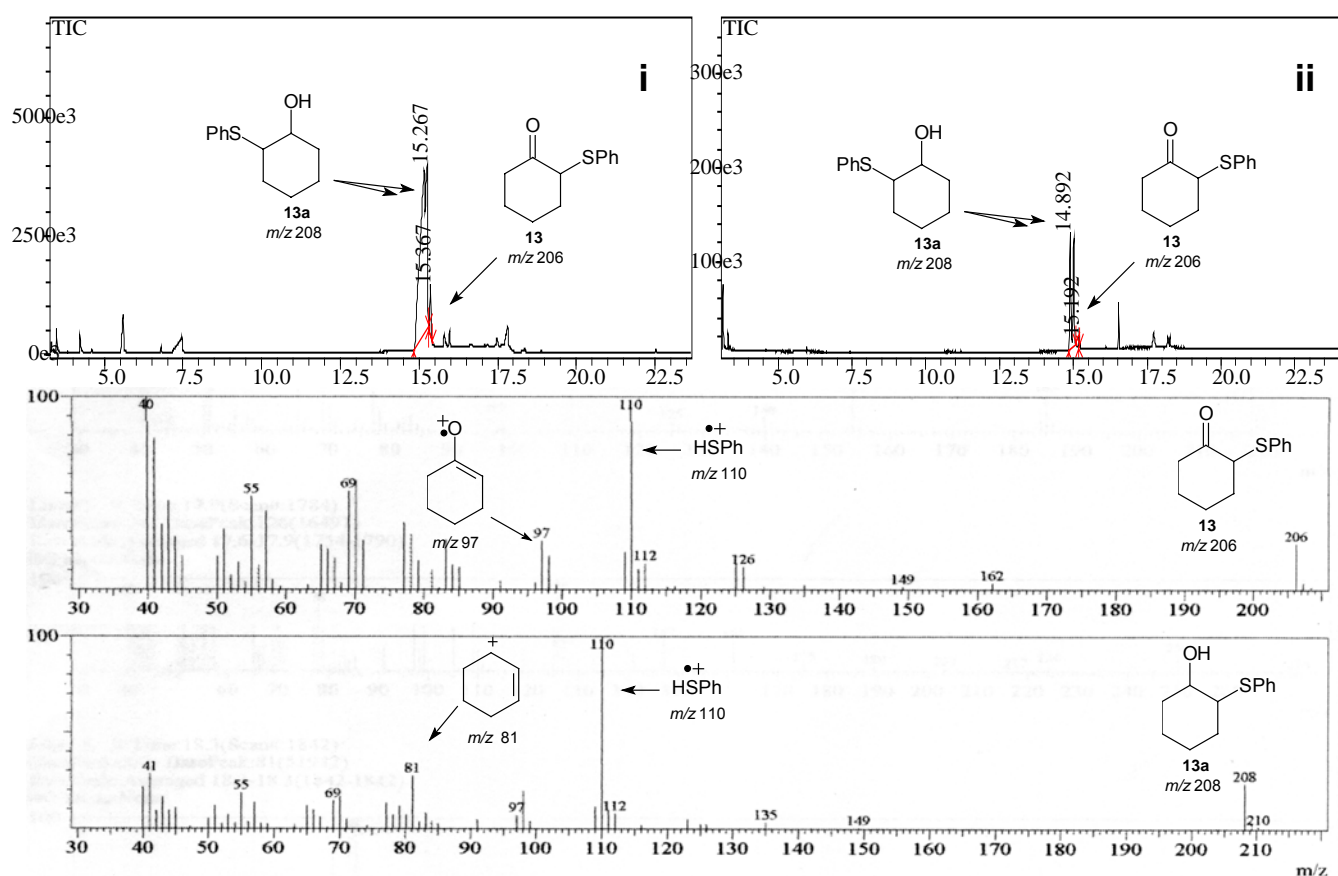
### II.3.3.3 - Transformação da 2-(tiofenil)ciclohexanona (13)

Para comprovar a pureza do substrato **13** e verificar sua fragmentação por espectrometria de massa, foi feita uma análise de CG-EM (Figura II.21).



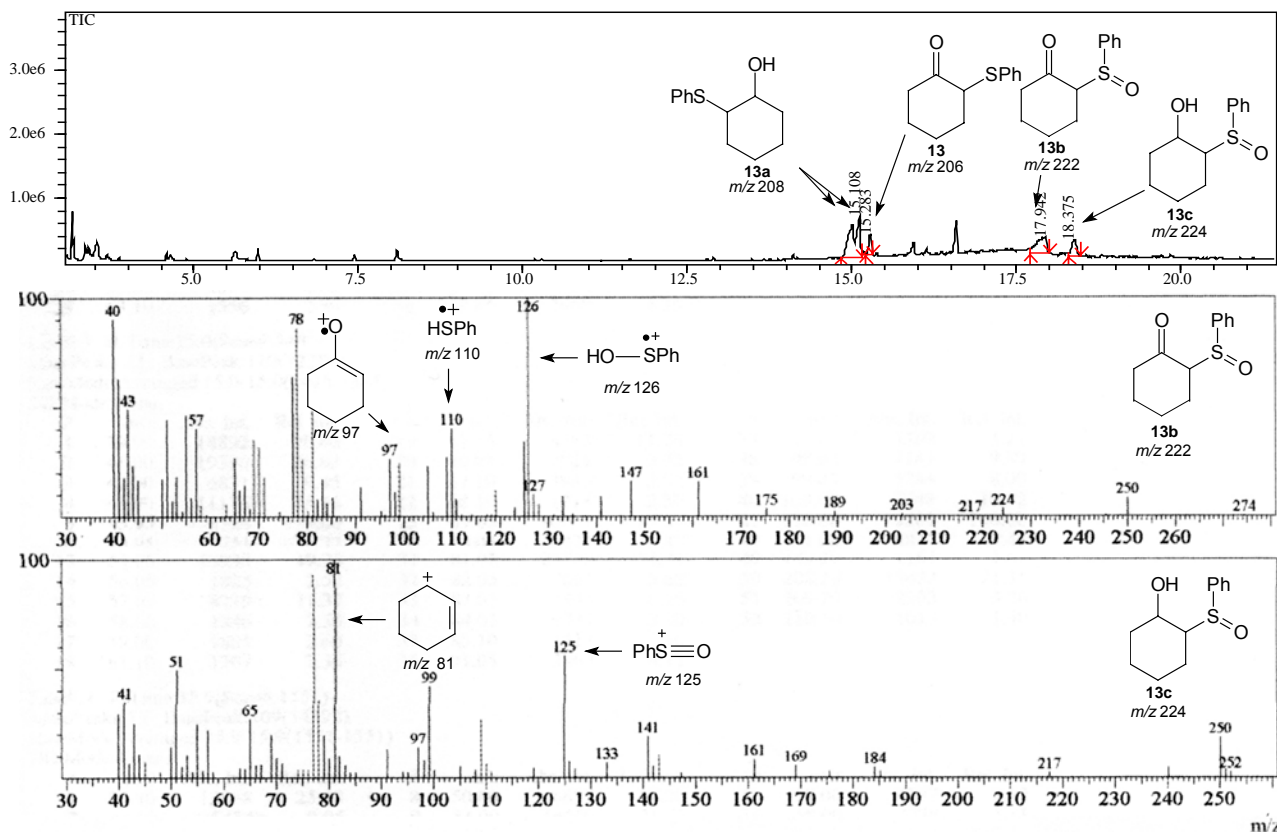
**Figura II.21:** Cromatograma e espectro de massa do substrato **13** (método 5).

Após 48 horas de reação, utilizando o fungo CCB 501 como fonte enzimática (Figura II.22i), observou-se que praticamente todo o substrato foi transformado no álcool **13a** (94% de rendimento cromatográfico,  $t_R = 15,2$ ). Um comportamento semelhante é observado quando se utiliza o fungo CCB 203 (Figura II.22ii).



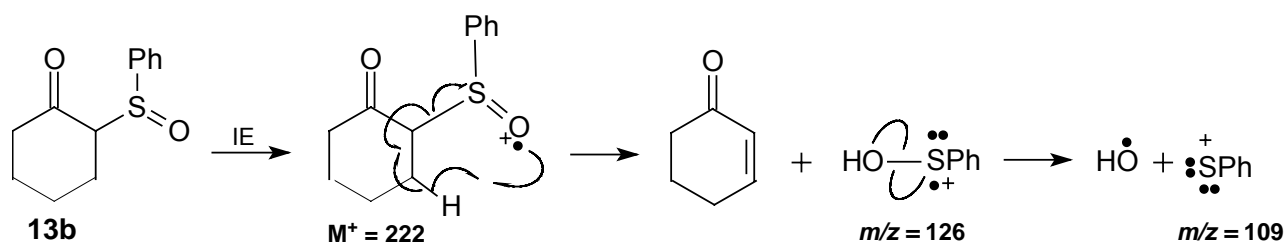
**Figura II.22:** Cromatograma e espectros de massa da reação (48 horas), utilizando os fungos CCB 501(i) e CCB 203 (ii) – método 5.

Na alíquota de 96 horas de reação, utilizando o fungo CCB 501, verificou-se uma redução da área do pico do produto **13a** ( $t_R = 15,2$ ) e um aumento da área do pico referente ao substrato **13** ( $t_R = 15,4$ ), de acordo com a Figura II.23. Conforme relatado anteriormente, com 48 horas de reação, o fungo CCB 501 havia transformado praticamente todo o substrato **13** no produto **13a**. Os picos de  $t_R = 17,9$  e  $t_R = 18,3$  foram destacados e suas estruturas são discutidas logo abaixo.



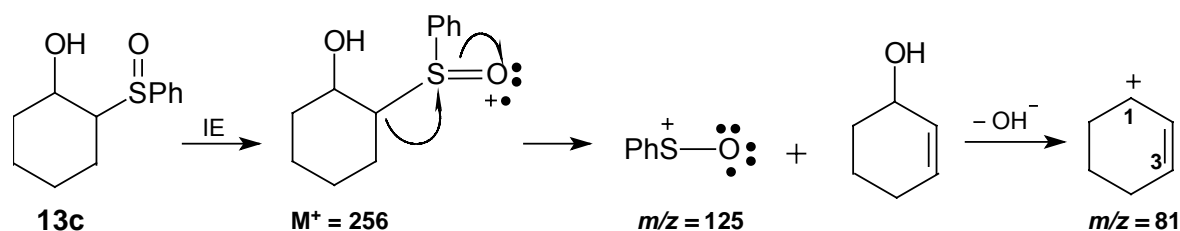
**Figura II.23:** Cromatograma e espectros de massa da reação (96 horas), utilizando o fungo CCB 501 (método 5).

É proposto que o pico com  $t_R = 17,9$  seja a 2-(fenilsulfinil)cicloexanona (**13b**). O íon de maior intensidade desse espectro tem  $m/z = 126$ , indicando que essa fragmentação é favorecida energeticamente. O mecanismo de fragmentação proposto no Esquema II.24 sustenta a afirmação de que ocorreu a oxidação do grupo sulfeto. A pequena estabilidade do íon molecular do produto **13b** ( $M^+ = 222$ ) não permite que se possa confirmar a redução da carbonila. Em contrapartida, não foi detectado no espectro de massa de **13b** o íon de  $m/z = 81$ , característico da fragmentação de um derivado do cicloexanol (tópico II.3.3.2, Esquema II.20). Isso sustenta a proposta de que essa molécula não possui nenhum grupo hidroxila.



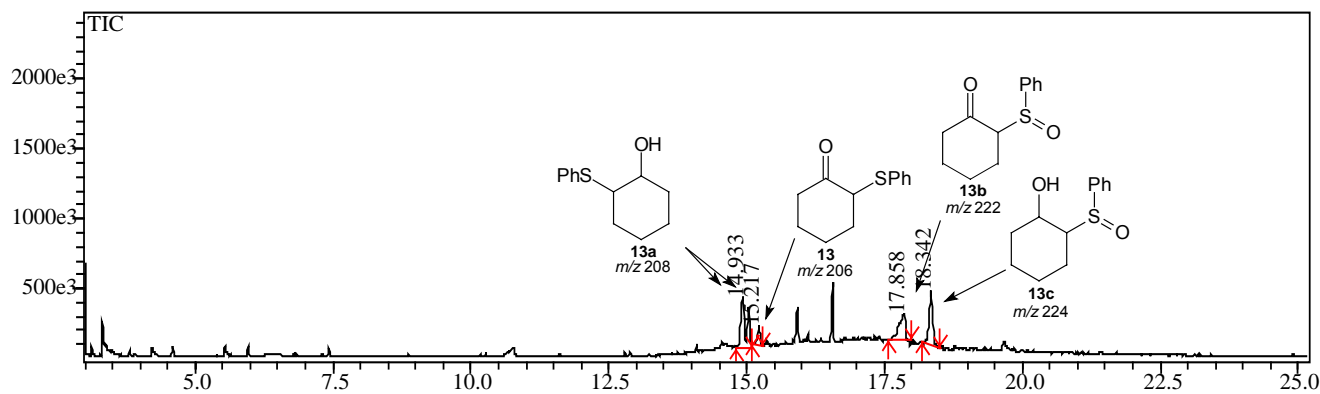
**Esquema II.24:** Fragmentação do produto 13b.

É proposto que o pico com  $t_R = 18,3$  seja o 2-(fenilsulfinil)cicloexanol (**13c**), usando como base o espectro de massa e a fragmentação dessa molécula (Esquema II.25). No espectro de massa de **13c** pode-se observar que o íon de maior intensidade tem  $m/z = 81$ , indicando que essa fragmentação é favorecida energeticamente. Conforme discutido previamente, esse íon é um cátion vinílico estabilizado por ressonância.



**Esquema II.25:** Fragmentação do produto 13c.

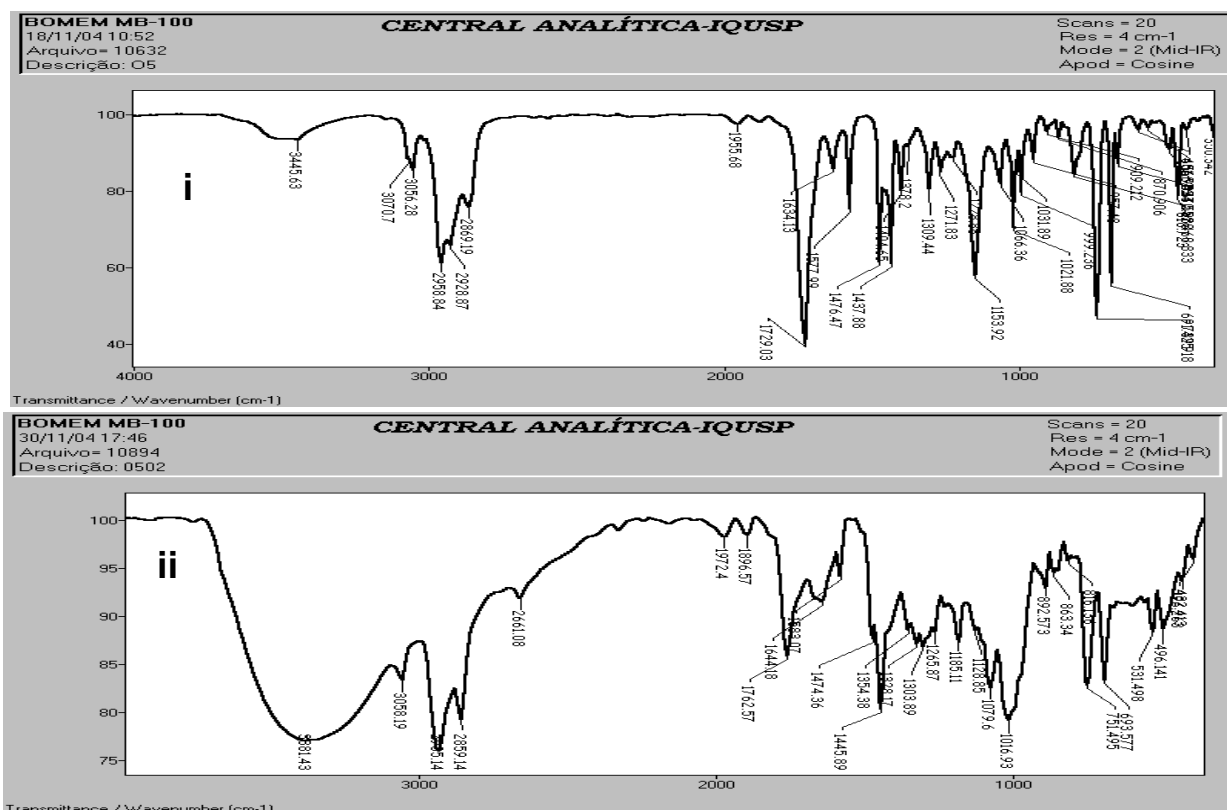
O mesmo comportamento é observado na transformação promovida pelo fungo CCB 203, após 96 horas de reação (Figura II.25).



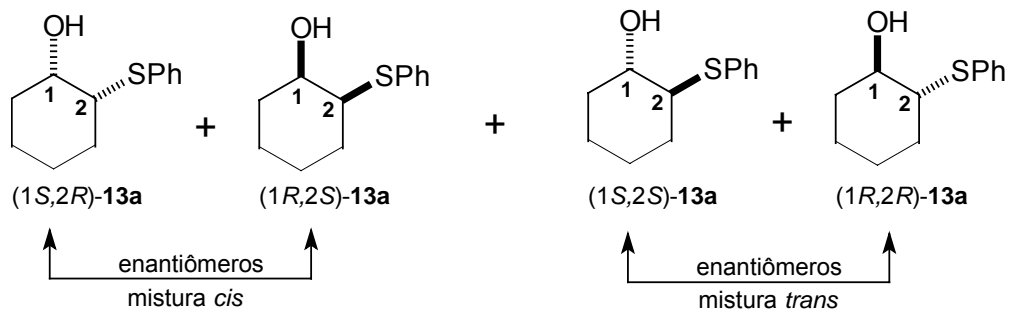
**Figura II.25:** Cromatograma e espectros de massa da reação (96 horas), utilizando o fungo CCB 203 (método 5).

A confirmação da estrutura do produto **13a** foi possível com o seu isolamento e com a análise dos dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e IV. Para isso foram preparados dez frascos reacionais (procedimento **III.3.7**, Parte experimental). Foi priorizado o isolamento do produto **13a**, por isso a reação foi realizada utilizando o fungo CCB 501 como fonte enzimática (48 horas de reação). O produto **13a** foi isolado com 75% de rendimento (dados da caracterização do produto: tópico **III.2.2**; Parte experimental).

No espectro de absorção na região do infravermelho (IV) do substrato **13** (Figura II.26i), observa-se a absorção característica de estiramento da ligação C=O de cetona,  $\nu = 1708\text{ cm}^{-1}$ , que não está presente no IV do produto **13a** (Figura II.26ii). Nesse espectro do produto **13a** é bem visível a banda larga característica da ligação OH em  $\nu = 3381\text{ cm}^{-1}$ , indicando que ocorreu a redução do grupo carbonila.



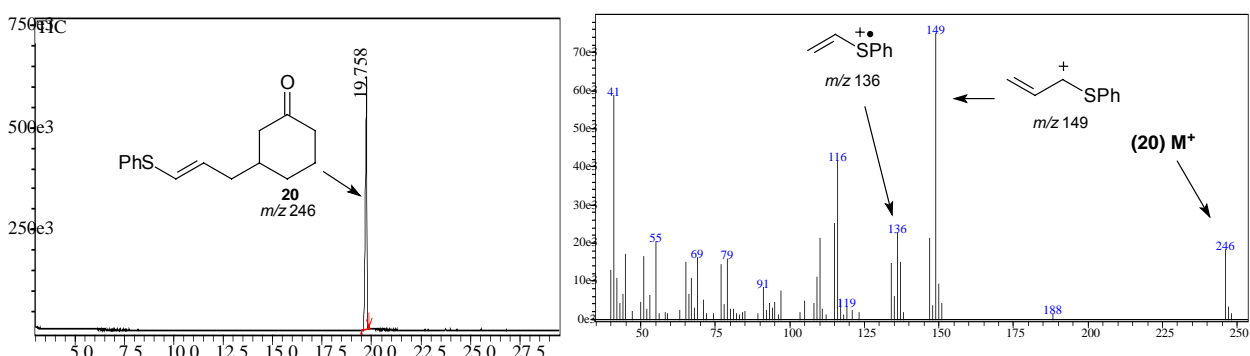
Corroborando na elucidação estrutural da molécula, o sinal em 207 ppm ( $\text{C}_\text{O}$ ) que caracteriza a carbonila de uma cetona no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do álcool **13** (anexo 35) desaparece no espectro do produto **13a** (anexo 59). Os dados espectroscópicos da mistura isomérica do produto da reação biocatalisada (**13a**) confirmam sua estrutura.



**Esquema II.26:** Mistura dos pares de enantiômeros do álcool **13a**.

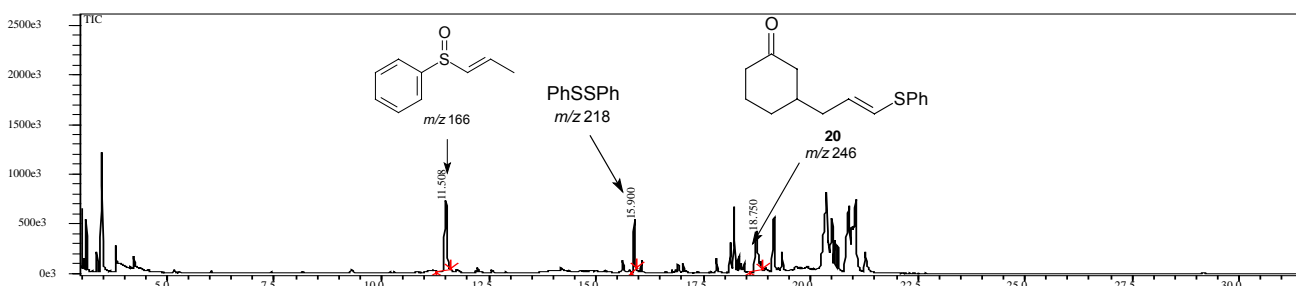
### II.3.3.4 - Transformação da 3-[(2*E*)-3-(feniltio)prop-2-enil]ciclohexanona (**20**).

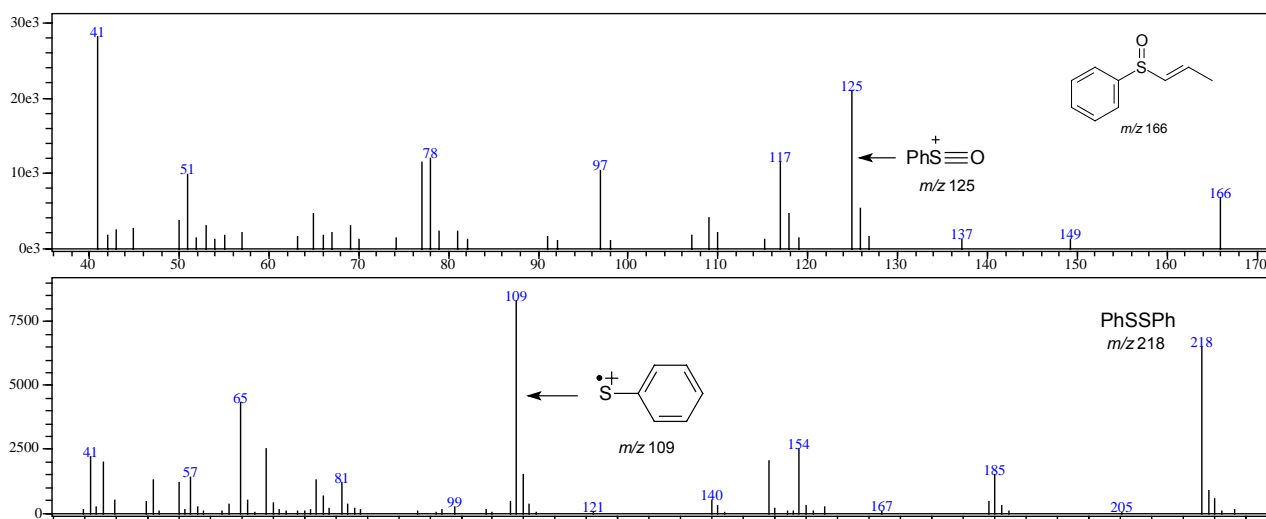
Para comprovar a pureza do substrato **20** e determinar sua fragmentação por espectrometria de massa, foi feita uma análise de CG-EM (Figura II.27).



**Figura II.27:** Cromatograma e espectro de massa do substrato **20** (método 5).

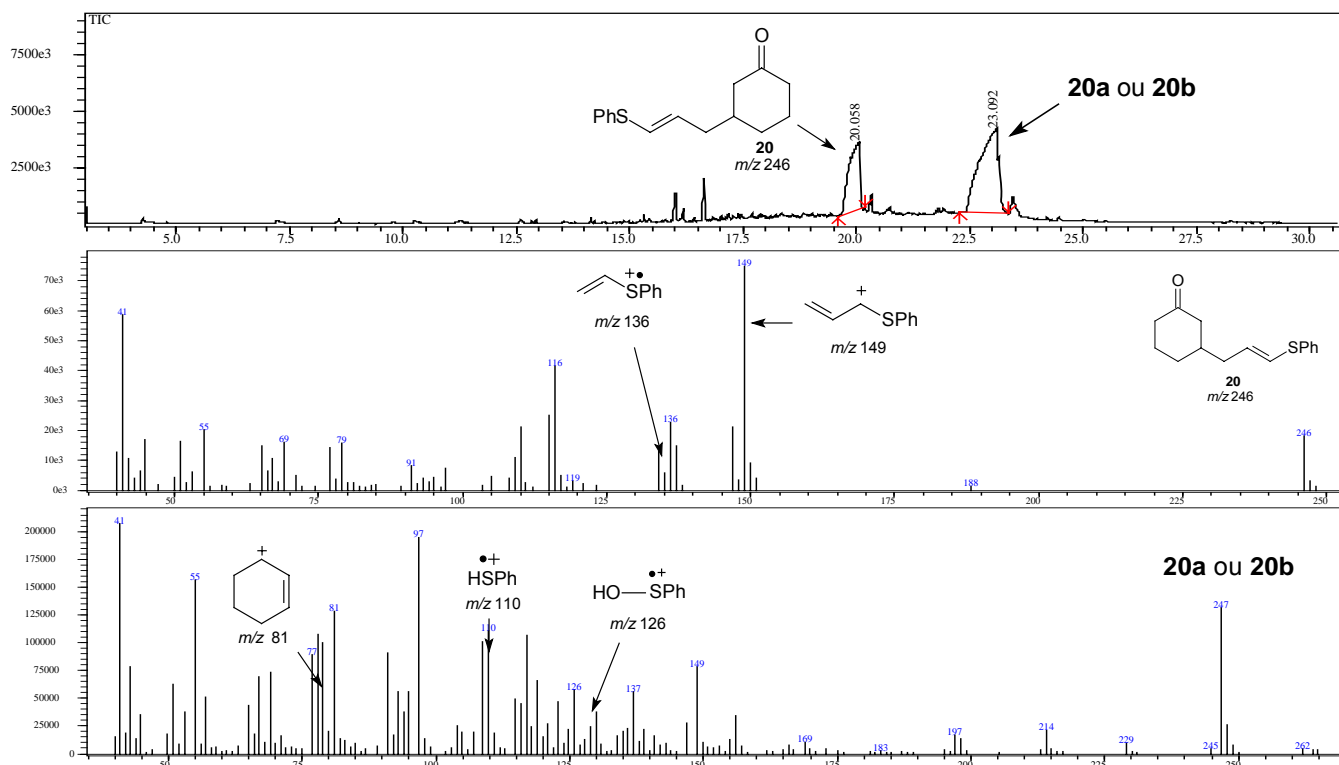
Diversos picos são observados nos cromatogramas da reação do substrato **20** com o fungo CCB 203, dificultando a interpretação dos resultados. Após 96 horas de reação (Figura II.28), foi possível detectar a presença do substrato **20** e determinar a massa de mais duas moléculas. De acordo com a biblioteca de espectros de massa (CLASS-500/Wiley), o pico com  $t_R = 11,6$  é o [(1*E*)-prop-1-enilsulfinil]benzeno e o pico com  $t_R = 15,9$  é o PhSSPh.





**Figura II.28:** Cromatograma e espectros de massa da reação (96 horas), utilizando o fungo CCB 203.

Quando o fungo CCB 501 foi utilizado, apenas dois picos se destacaram no cromatograma. Com 48 horas de reação, o substrato **20** ( $t_R = 20,0$ ) foi convertido em um produto com  $t_R = 23,1$  (Figura II.29). Essa molécula pode ser o produto da mono-oxidação do grupo sulfeto do substrato **20** (sulfóxido **20a**) ou então o produto da di-oxidação do sulfeto do substrato **20** (sulfona **20b**). Além disso, a presença do íon de  $m/z = 81$  no espectro de massa do produto com  $t_R = 23,1$  é um indício de que o fungo também promoveu a redução da carbonila do substrato **20**. As possíveis estruturas desse produto são apresentadas no Esquema II.27.



**Figura II.29:** Cromatograma e espectros de massa da reação (48 horas), com o fungo CCB 501.



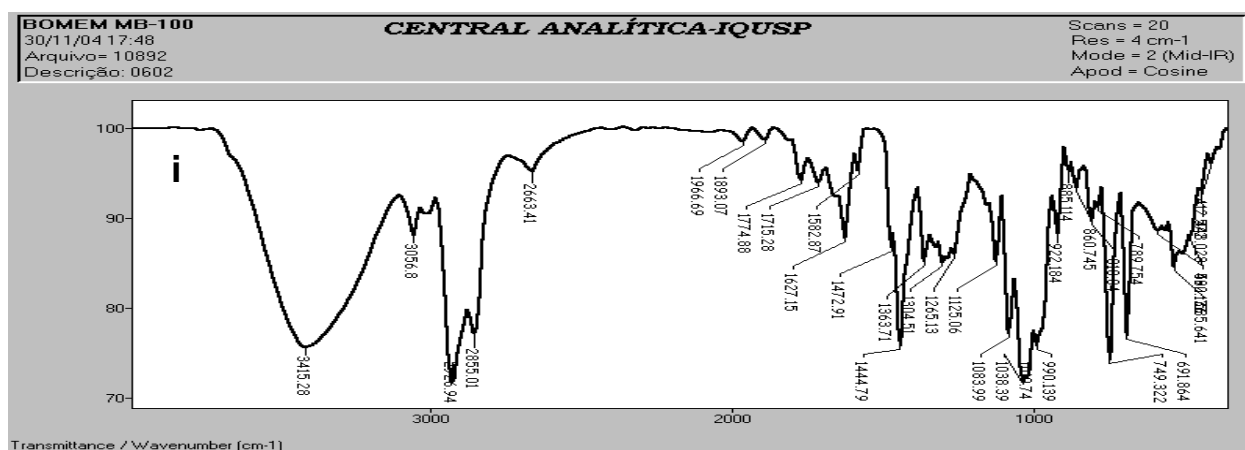


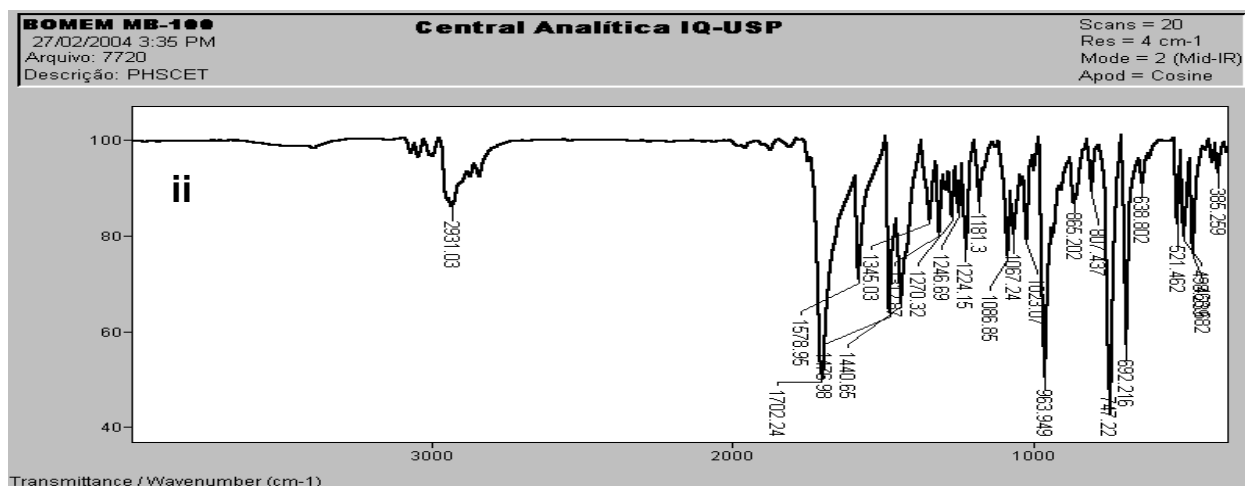
**Esquema II.27:** Possíveis estruturas do produto **20a** e **20b**.

A confirmação da estrutura do produto da biotransformação do substrato **20** foi possível com o seu isolamento e com a análise dos dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e IV e espectro de massa de alta resolução. Para isso foram preparados dez frascos reacionais (procedimento **III.3.7**, Parte experimental). Foi utilizado o fungo CCB 501 como fonte enzimática (8 dias de reação). O produto foi isolado com 25% de rendimento (dados da caracterização do produto: tópico **III.2.3**; Parte experimental).

No espectro de massa de alta resolução foi detectado o íon molecular protonado do produto ( $\text{MH}^+$  265, anexo 65), comprovando que o fungo CCB 501 transformou o substrato **20** no produto **20a**, isto é, promoveu a redução da carbonila e a mono-oxidação do grupo sulfeto do substrato **20**.

O espectro de IV apresentado na Figura 30i confirma a previsão baseada na detecção do íon de  $m/z = 81$  do espectro de massa do produto **20a** (Figura II.27). No espectro de IV observa-se a banda larga característica da ligação OH em  $\nu = 3415 \text{ cm}^{-1}$  (Figura II.28i), inexistente no espectro de IV do substrato **20**. Já no IV do substrato **20** (Figura II.28ii), pode ser observada a absorção característica de estiramento da ligação C=O de cetona,  $\nu = 1702 \text{ cm}^{-1}$ .





**Figura II.30:** Espectros na região do IV do álcool **20a (i)** e do substrato **20 (ii)**.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do produto **20a** (anexo 62) não se observa o sinal em 211 ppm ( $\text{C}_0$ ), presente no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do substrato **20** (anexo 52), que caracteriza a carbonila de uma cetona. Com esses dados foi possível determinar a estrutura do produto **20a**.

### II.3.3.5 – Sulfetos 14 e 15.

Os cromatogramas das transformações dos sulfetos **14** e **15** apresentaram diversos picos, tornando muito difícil a análise das biotransformações. Avaliando as alíquotas das reações por CCD, verificamos que seria possível isolar os produtos majoritários das reações. Entretanto, quando tentamos purificar o bruto da reação biocatalisada, não foi possível separar os produtos dos metabólitos dos fungos, devido a elevada polaridade dos mesmos.

## II.4 – Conclusões

Utilizando diferentes substratos foi possível determinar a presença de diferentes Baeyer-Villiger mono-oxigenases (BVMO's) nos fungos estudados, as quais foram capazes de oxidar cetonas cíclicas e cetonas aromáticas. Tendo como base os produtos da transformação biológica desses substratos, foi também determinada a presença de álcool desidrogenases nesses fungos. Assim como as BVMO's, as álcool desidrogenases também mostraram um comportamento assimétrico na transformação dos substratos.

Inicialmente foi feita uma triagem de fungos do gênero *Aspergillus* e dentre eles dois fungos se destacaram: *A. terreus* URM 3571 e o *A. terreus* SSP 1498. Selecionados os melhores biocatalisadores, foram então preparados experimentos que possibilitaram o isolamento e a caracterização dos produtos enantiomericamente enriquecidos. O sistema enzimático do fungo *A. terreus* URM 3571 transformou a 2-metilcicloexanona (**1a**) no (1S,2S)-2-metilcicloexanol (**2a**) com um e.e. de 88%. Já o sistema enzimático do *A. terreus* SSP 1498 transformou a 2- e a 4-metilcicloexanona (**1a** e **1b**) nos isômeros (*R*) das lactonas **3a** e **3b** com bons excessos enantioméricos.<sup>a</sup>

De acordo com Stewart et al. (2004),<sup>27</sup> atualmente os pesquisadores buscam uma BVMO que transforme cetonas pró-quirais nos isômeros (*R*) das lactonas correspondentes. O *A. terreus* SSP 1498 pode ser considerado um catalisador assimétrico de grande validade, pois seu sistema enzimático foi capaz de converter diferentes cetonas pró-quirais (**1a** e **1b**) nos isômeros (*R*) das lactonas correspondentes.

Com a segunda parte do trabalho foi possível demonstrar que a alteração do meio de cultura de crescimento dos fungos alterou as propriedades biocatalíticas desses microrganismos, levando até a uma inversão na enantiopreferência da biotransformação. Foi demonstrado também que os fungos *A. foetidus* CCT 2683 e *E. nigrum* SSP 1948 podem ser usados como catalisadores complementares, pois com eles pode-se obter respectivamente os enantiômeros (*R*) e (*S*) do 1-fenil-etanol com bons excessos enantioméricos. Além disso, foi demonstrado que os efeitos

---

<sup>a</sup> Andrade, L. H.; Keppler, A. F.; Schoenlein-Crusius, I. H.; Porto, A. L. M.; Comasseto J. V. Enzymatic evaluation of different *Aspergillus* strains by biotransformation of cyclic ketones. *Enzyme Microb. Tech.* **2005**, *no prelo*.

estereoelétrônicos que governam a reação de Baeyer-Villiger clássica são os mesmos para as reações de Baeyer-Villiger enzimáticas.<sup>b</sup>

A terceira e última parte do trabalho combinou o conhecimento biocatalítico acumulado em nosso laboratório com a aplicação sintética dos biocatalisadores. Para isso, sintetizamos oito exemplos de compostos bi-funcionalizados com grupos sulfeto, seleneto e carbonila (cetona). Esses compostos foram transformados por dois fungos selecionados por triagem: o *T. frygossium* CCB 203 e o *P. sanguineos* CCB 501. Além das análises das transformações por CG-EM, fizemos também experimentos que possibilitaram o isolamento e a caracterização dos produtos das biotransformações. O estudo dessas moléculas com dois sítios passíveis de sofrer biotransformações foi apenas preliminar e trabalhos já em desenvolvimento em nosso laboratório visam aprofundar a análise dos aspectos regio e enantiosseletivos dessas transformações.<sup>d</sup>

Baseando-se em tudo que foi discutido, pode-se concluir com esse trabalho que as enzimas presentes nos metabolismos desses fungos, particularmente, são muito versáteis e quando selecionadas de forma adequada, oferecem um controle químico e enantiosseletivo das biotransformações. Também ficou claro que esses experimentos não estão aprimorados para uma aplicação em grande escala, visto que o rendimento dos produtos isolados não podem ser considerados adequados para esse fim. No entanto, a utilização efetiva e cotidiana da biocatálise ainda é o grande desafio a ser vencido. A compreensão das variáveis que afetam o comportamento das biotransformações e a triagem de sistemas enzimáticos com elevado potencial biocatalítico são as primeiras etapas para o desenvolvimento de uma tecnologia quiral limpa e apropriada para processos industriais.

---

<sup>b</sup> Andrade, L. H.; Keppler, A. F.; Schoenlein-Crusius, I. H.; Porto, A. L. M.; Comasseto J. V. Evaluation of acetophenone monooxygenase and alcohol dehydrogenase activities in different fungal strains by biotransformation of the acetophenone derivatives. *J. Mol Catal. B: Enzymatic* **2004**, *31*, 129.

<sup>d</sup> Andrade, L. H.; Keppler, A. F.; Ricci, L. C.; Schoenlein-Crusius, I. H.; Porto, A. L. M.; Comasseto J. V. **manuscrito em preparação.**