BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
212.56

**Universidade de São Paulo
Instituto de Química**

Dissertação de Mestrado

**Biotransformação de Sulfetos Aromáticos
por Fungos Basidiomicetos e Aplicação da Biocatálise em
Moléculas Bi-Funcionalizadas.**

Luis Cesar Ricci

Prof. André Luiz Meleiro Porto
Orientador

**São Paulo
2005**

DEDALUS - Acervo - CQ

30100010959

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Ricci, Luis Cesar

R491b Biotransformação de sulfetos aromáticos por fungos basidiomicetos e aplicação da biocatálise em moléculas bi-funcionalizadas / Luis Cesar Ricci. -- São Paulo, 2005.
182p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental
Orientador: Porto, André Luiz Meleiro

1. Oxidação : Química orgânica 2. Sulfoxido : Química orgânica
3. Fungo : Botânica 4. Oxidação : Microrganismo I. T. II Porto, André Luiz Meleiro, orientador.

547.23 CDD

“Biotransformação de sulfetos aromáticos por fungos
basidiomicetos e aplicação da biocatálise em
moléculas bi-funcionalizadas”

LUÍS CESAR RICCI

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Mestre em Química - Área: Química Orgânica.

Aprovado por:

Dr. ANDRÉ LUIZ MELEIRO PORTO
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. PAULO ROBERTO HRIHOROWITSCH MORENO
IQ - USP

Profa. Dra. CLARA MEGUMI ABE TANAKA
UEM

SÃO PAULO
10 DE JUNHO DE 2005.

“A verdadeira grandeza de um homem reside na consciência de
um propósito honesto na vida, alicerçado numa estimativa
justa de sua pessoa e de tudo o mais; num frequente auto exame,
numa firme obediência às regras por ele tidas como certas,
sem perturbar-se com o que os outros possam vir a pensar
ou dizer, ou com fazerem elas, ou não, aquilo que ele pensa, diz e faz”
(Marco Aurélio)

“A morte do homem começa no instante em que ele desiste de aprender.” (Albino Teixeira)

A meus pais: Assunta e José Luiz, a quem dedico esta dissertação; minha mãe que é um exemplo de mulher, batalhadora, linda, inteligente e muito católica, meu exemplo de vida; meu pai é a pessoa mais importante para mim, pois foi quem me proporcionou chegar até esta etapa profissional da minha vida. E finalmente a minha irmã, Luana, que é linda.

À Renata, que desde que entrou na minha vida, conheci o que é o amor, e o que é ser amado. Ela representa a alegria que esta dentro de mim, sou muito feliz e realizado ao seu lado.

Ao Prof. André Luiz Meleiro Porto pela orientação científica; pelos conselhos, pelo respeito, pelos momentos de descontração e pelas oportunidades profissionais oferecidas.

Ao Prof. Comasseto; pelo respeito, pela orientação científica e pelos momentos agradáveis de descontração.

A todos os colegas que passaram pelo laboratório no período de 2003-2005.

Aos amigos do Bloco Zero: André, Edna, Leandro, Leonardo, Pedro, Roberto; pelos momentos de alegrias e de trabalho. E é claro ao meu grande amigo Artur e a sua esposa Gisele, pelos momentos importantes tanto profissionais quanto pessoais.

Aos amigos do Bloco Onze: Álvaro (Takeo), Carlos Eduardo, Cristiano, Giuliano, Priscila, Rodrigo, Denis; e em especial ao Denis, ao Rodrigo pelos conselhos e sem dúvida ao Giuliano pela preocupação e pela oportunidade de trabalho.

Ao Alexandre, grande São Paulino, pelo apoio técnico e à dona Rosa pelos cafés e pela limpeza do laboratório.

Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo pelo espaço físico para realização deste trabalho. Ao Instituto de Botânica e a Prof.^a Marina Capelari pela coleção de fungos Basidiomicetos e a Prof. Quézia B. Cass pela separação dos sulfóxidos por CLAE.

E, finalmente, ao órgão de financiamento de pesquisa CNPq pela bolsa de Mestrado.

Neste trabalho realizou-se triagem para oxidação de sulfetos a sulfóxidos utilizando-se fungos Basidiomicetos, os quais são denominados fungos da podridão branca, uma vez que decompõem a lignina presente na madeira, causando o apodrecimento e em alguns casos, a morte da planta.

A triagem foi realizada utilizando-se quatro sulfetos aromáticos (Fig.1) e 6 fungos Basidiomicetos: *Pycnoporus sanguineus* CCB 501, *Trametes versicolor* CCB 202, *Trametes rigida* CCB 285, *Trichaptum byssogenum* CCB 203, *Trametes villosa* CCB 291, *Irpex lacteus* CCB 196.

Na Tabela 1 são mostrados alguns resultados obtidos na oxidação com os microrganismos:

Figura 1

Tabela 1.

Sulfetos	c(%) 1a-4a	c(%) 1b-4b	e.e	Config.	Fungos Basidiomicetos	Rendimentos isolados
1	92	3	7	S	CCB 203	36
2	92	8	80	S	CCB 501	32
3	94	4	99	S	CCB 203	34
4	92	4	-	S	CCB 203	32

c: conversão determinada por GC; e.e. excesso enantiomérico; Config.: configuração absoluta

Na segunda parte deste trabalho, com a finalidade de aplicar a biocatálise em moléculas mais complexas, realizou-se a síntese de 8 compostos bi-funcionalizados com grupos selênio, sulfeto e carbonila (cetona) (Esquema 1), as quais reagiram quimiosseletivamente frente às enzimas.

Esquema 1. Estrutura geral das moléculas sintetizadas ($n = 2$ e 1 , $m = 0, 3$ e 6 e $Y = S$ e Se).

Na última parte deste trabalho foi desenvolvido um novo método de síntese de biciclos [3.2.1] (**32**) (Esquema 2).

Esquema 2. Síntese geral para o biciclo [3.2.1] (**32**)

In the first part of this dissertation, we reported the screening of Basidiomycetes fungus for the oxidation of the sulfides into sulfoxides. The Basidiomycetes fungi are known as white rot fungus, because promote the degrade of lignin in wood, causing the death of the plant. The screening was reported with four aromatic sulfides (Table 1) and six Basidiomycetes fungus: *Pycnoporus sanguineus* CCB 501, *Trametes versicolor* CCB 202, *Trametes rigida* CCB 285, *Trichaptum byssogenum* CCB 203, *Trametes villosa* CCB 291, *Irpex lacteus* CCB 196.

Table 1. Oxidation of aromatic sulfides by whole fungal cells.

Sulfides	c(%) 1a-4a	c(%) 1b-4b	e.e	Config.	Basidiomycetes Fungus	Isolated yeld
1	92	3	7	S	CCB 203	36
2	92	8	80	S	CCB 501	32
3	94	4	99	S	CCB 203	34
4	92	4	-	S	CCB 203	32

c.: conversion by GC; e.e.: enantiomeric excess; Config.: Absolut configuration.

In the second part of this dissertation, we synthesized eight bi-funcionalized compounds with sulfide, selenide and ketone groups (Scheme 1). These compounds were submitted to the action of enzymatic system of Basidiomycetes fungi.

Scheme 1. General structure of bi-funcionalized compounds ($n = 2$ e 1 , $m = 0, 3$ e 6 e $\text{Y} = \text{S, Se}$).

In the last part of this dissertation it is reported a new method for the synthesis of bicycle [3.2.1] (**32**) (Scheme 2).

Scheme 2. General synthesis for the bicycle [3.2.1] (**32**).

aromat. = anel aromático

CCD = cromatografia em camada delgada

CG-EM = cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa

CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência

RMN = espectroscopia de ressonância magnética nuclear

IV = espectroscopia de absorção na região do infravermelho

BVMO's = Baeyer-Villiger mono-oxigenases

CHMO = ciclohexanona mono-oxigenase

CPMO = ciclopentanona mono-oxigenase

NADH = dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NADPH = fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

FAD = dinucleotídeo de flavina e adenina

F.M. = fórmula molecular

FMN = mononucleotídeo de flavina

THF = tetrahidrofurano

LDA = diisopropilamideto de lítio

ee. = excesso enantiomérico

μL = microlitro

mg = miligrama

mL = mililitro

M.M = massa molar

AcOEt = acetato de etila

Outras siglas são explicadas no decorrer do texto.

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	vi
Abreviaturas.....	viii

Capítulo I - Introdução

1) Oxidação química enantiosseletiva de sulfetos pró-quirais.	3
1.1) Método modificado de Sharpless: oxidação na presença de tartarato de titânio quiral.	3
1.1.1) O sistema de Kagan.	4
1.1.2) O sistema de Modena.	6
1.2) Sulfoxidação enantiosseletiva utilizando oxaziridinas quirais.	7
2) Método de Andersen.	9
3) Oxidação biológica enantiosseletiva.	12
3.1) Sulfoxidação catalisada por enzimas.	13
3.2) Sulfoxidação microbiológica.	18
3.2.1) Bactérias.	18
3.2.2) Fungos.	20
3.2.2.1) Fungos Basidiomicetos.	21
3.2.2.1.1) Ciclo catalítico de reação das peroxidases.	23
3.2.3) Leveduras.	24
4) Bibliografia.	25

Capítulo II – Resultados e Discussão

A) Triagem para a oxidação de sulfetos	29
A.1) Síntese dos substratos utilizados na triagem	29
A.1.1) Síntese dos sulfetos	29
A.1.2) Síntese dos sulfóxidos e das sulfonas	30
A.2) Resultados da triagem.	30
A.3) Oxidação enzimática do (Feniletil)sulfeto (1b) utilizando o meio de cultura dos fungos Basidiomicetos.	32
A.3.1) Oxidação enzimática dos sulfetos (1a-d) utilizando células úmidas dos fungos Basidiomicetos.	34
A.3.1.1) (Fenilmetil) sulfeto (1a).	34
A.3.1.2) (Feniletil) sulfeto (1b).	39
A.3.1.3) (Fenilpropil) sulfeto (1c).	43
A.3.1.4) (Fenilalil) sulfeto (1d).	47
A.4) Resultados obtidos utilizando CLAE.	49
A.4.1) Avaliação da resolução enantiomérica dos compostos nas colunas quirais de antibióticos.	49
A.4.2) Cromatogramas e parâmetros cromatográficos referentes a melhor enantiorresolução obtida para o sulfóxido (2d).	49
A.5) Resolução cinética dos sulfóxidos (2b) e (2c).	53
A.6) Conclusão.	56
A.7) Bibliografia.	56

B) Síntese e transformações biológicas de moléculas bi-funcionalizadas.	58
B.1) Triagem dos microrganismos.	59
B.2) Síntese das moléculas bi-funcionalizadas.	65
B.3) Transformações biológicas das moléculas bi-funcionalizadas.	69
B.3.1) Selenetos (12) e (13).	71
B.3.2) Selenetos (8) e (9).	79
B.3.3) Transformação da 2-(tiofenil) ciclohexanona (7).	86
B.3.4) Transformação da 3-[(2E)-3-(tiofenil)prop-2-enil] ciclohexanona	
(14).	92
B.3.5) Sulfetos (10) e (11).	96
B.4) Conclusão.	97
B.5) Bibliografia.	98
 C) Aplicação do sulfóxido (2d) obtido por biocatálise na síntese de axanos.	99
C.1) Conclusão.	109
C.2) Bibliografia.	109
 D) Conclusão Final.	110
 Capítulo III – Parte Experimental	
Parte Experimental.	111
 Capítulo IV - Anexos	
Anexos.	145
 <i>Curriculum Vitae</i>	181

Capítulo I

Introdução

D) Introdução

O químico de síntese se defronta hoje com dois problemas cruciais, de cuja solução depende em grande parte a melhoria da qualidade de vida das populações e a própria sobrevivência do planeta. Esses problemas são a Questão Ambiental¹ e a Tecnologia Quiral.² O primeiro problema tem muito a ver com a produção desordenada de rejeitos químicos pela indústria, sendo que a indústria de química fina e a de produção de fármacos chega a gerar cerca de 100Kg de rejeitos por Kg de produto final. Foram propostas várias soluções para o problema da produção de rejeitos químicos pela indústria, as quais estão sendo lentamente implementadas. Esses rejeitos são em grande parte nocivos e não biodegradáveis. Uma das soluções para resolver este problema é a catálise homogênea, usando complexos metálicos, e a outra é a biocatálise, usando enzimas, que podem ser isoladas ou fazer parte de um microrganismo. Essa última abordagem é extremamente atraente, pois as enzimas e os microrganismos são biodegradáveis e agem cataliticamente sobre os substratos orgânicos a serem transformados.

O outro desafio enfrentado pelo químico, o problema da Tecnologia Quiral, está relacionado à produção de um único enantiômero, quando o composto apresenta centros estereogênicos. Substâncias quirais apresentam diferentes propriedades, incluindo ação terapêutica, dependendo da configuração dos centros estereogênicos presentes na molécula. Assim, um dos estereoisômeros pode apresentar uma atividade benéfica ao organismo e o outro, ação extremamente nefasta. Há casos também em que ambos podem atuar de forma idêntica.

Essa questão é tão importante que os fármacos estão tendo que ser comercializados não mais como racematos, mas em sua forma enantiomericamente pura,³ o que faz com que ocorra uma corrida das indústrias por métodos e reagentes que levem primordialmente a um único enantiômero, uma vez que esse segmento do mercado movimenta vários bilhões de dólares/ano.⁴

Na busca de solução para os problemas acima citados, os químicos lançaram mão da catálise homogênea, usando ligantes quirais, e da biocatálise, usando microrganismos e

enzimas. No Esquema 1, tem-se dois fármacos cuja obtenção em escala industrial envolve um processo enzimático.⁵

Esquema 1. Exemplos de fármacos obtidos em escala industrial utilizando processos enzimáticos.

Dentro do universo de substratos que podem sofrer transformações químicas catalisadas por microrganismos, nós estudamos neste trabalho a oxidação de sulfetos aromáticos pró-quirais, uma vez que sulfóxidos quirais são importantes intermediários na síntese de produtos naturais e são utilizados constantemente como unidade assimétrica auxiliando reações estereosseletivas, como na formação de novas ligações carbono-carbono, reações de Diels-Alder, adição de Michael e na redução assimétrica de β -ceto-sulfóxidos⁶⁻⁸.

A seguir, iremos destacar os principais métodos químicos e biológicos descritos na literatura para se obter sulfóxidos enantiomericamente puros.

1. Oxidação química enantiosseletiva de sulfetos pró-quirais.

Existem dois métodos principais para realizar oxidação assimétrica, o primeiro é baseado na epoxidação assimétrica modificada de Sharpless e o segundo na utilização das oxaziridinas quirais.

1.1. Método modificado de Sharpless: oxidação na presença de tartarato de titânio quiral.

O sucesso notável da epoxidação de álcoois alílicos pelo método de Sharpless promoveu várias aplicações do alcoolato de titânio para a oxidação enantiosseletiva de vários substratos⁹. Seguindo este princípio, surgiram quase que ao mesmo tempo vários trabalhos de oxidação enantiosseletiva de sulfetos realizados principalmente pelos grupos de Kagan e de Modena¹⁰ na década de 80.

A seguir mostraremos as características principais destes dois grupos.

1.1.1. O sistema de Kagan

A principal descoberta feita pelo grupo de Kagan foi que 1 equivalente de água era necessário para produzir o catalisador ativo capaz de oxidar sulfetos pró-quirais a sulfóxidos com elevado rendimento e excesso enantiomérico¹¹.

O reagente de Kagan apresenta a seguinte composição: $\text{Ti}(\text{Oi-Pr})_4/(\text{R,R})\text{-DET}/\text{H}_2\text{O}$ na proporção de 1:2:1 e o agente oxidante utilizado foi o *t*-butil hidroperóxido (TBHP) (1,1 equiv.). Na Tabela 1, estão alguns resultados obtidos por Kagan.

Tabela 1. Oxidação assimétrica de aril alquil e dialquil sulfetos por TBHP e $\text{Ti}(\text{Oi-Pr})_4/(\text{R,R})\text{-DET}/\text{H}_2\text{O}$ ¹¹.

$\text{R}_1-\text{S}-\text{R}_2 \xrightarrow[\text{Ti}(\text{Oi-Pr})_4/(\text{R,R})\text{-DET}/\text{H}_2\text{O} = 1:2:1, \text{CH}_2\text{Cl}_2, -20^\circ\text{C}]{\text{TBHP}} \text{R}_1-\text{S}(\text{R})-\text{R}_2$

Linhas	R ₁	R ₂	Rendimento (%)	ee (%)	Conf. Absoluta
1	<i>p</i> -tolil	metila	90	89	<i>R</i>
2	<i>o</i> -anisila	metila	70	84	<i>R</i>
3	<i>p</i> -anisila	metila	58	86	<i>R</i>
4	1-naftila	metila	98	89	<i>R</i>
5	2-naftila	metila	88	90	<i>R</i>
6	<i>p</i> -tolil	etila	71	74	<i>R</i>
7	<i>p</i> -tolil	<i>n</i> -butila	75	20	<i>R</i>
8	2-naftila	<i>n</i> -propila	78	24	<i>R</i>
9	<i>t</i> -butila	metila	72	53	<i>R</i>
10	ciclohexila	<i>n</i> -butila	67	54	<i>R</i>
11	<i>n</i> -octila	metila	77	53	<i>R</i>

ee.: excesso enantiomérico; Conf. Absoluta.: Configuração absoluta.

Quantidade dos reagentes: $\text{Ti}(\text{Oi-Pr})_4$ = 5 mmol; TBHP = 10 mmol; $(\text{R,R})\text{-DET}$ = 10 mmol; H_2O = 5 mmol; Sulfeto = 5 mmol; CH_2Cl_2 = 50 mL.

Na Tabela 1 pode-se observar uma boa enantiosseletividade (80-90 %) para os aril- e naftil- metil-sulfóxidos (Linhas 1-5) e uma enantiosseletividade mais baixa tanto para as espécies que possuem grupos alquil muito volumosos (linhas 6-8) como para as espécies dialquilsulfetos (linhas 9-11).

Na tentativa de melhorar os resultados acima, Kagan e colaboradores utilizaram cumeno hidroperóxido (CHP) como agente oxidante, ao invés do *t*-butil hidroperóxido (TBHP)¹².

A indução assimétrica foi significativamente mais efetiva para todas as reações e o uso do CHP também permitiu diminuir a quantidade do complexo de titânio para 0,2 equivalentes sem ocorrer uma diminuição no valor do excesso enantiomérico¹³ (Tabela 2).

Tabela 2. Oxidação estereosseletiva catalisada de (arilalquil) e (dialquil) sulfetos, utilizando CHP e o sistema de Kagan¹².

Linhas	R ₁	R ₂	Conversão* (%)	ee (%)	Conf. Absoluta
1	fenila	metila	100	89	<i>R</i>
2	<i>p</i> -MeC ₆ H ₄	metila	100	86	<i>R</i>
3	<i>p</i> -MeC ₆ H ₄	metila	100	89	<i>R</i>
4	<i>p</i> -ClC ₆ H ₄	metila	100	86	<i>R</i>
5	2-naftila	metila	100	88	<i>R</i>
6	<i>p</i> -MeC ₆ H ₄	<i>n</i> -butila	94	91	<i>R</i>
7	<i>p</i> -MeC ₆ H ₄	<i>i</i> -propila	100	91	<i>R</i>
8	fenila	<i>t</i> -butila	33	77	<i>R</i>
9	fenila	benzila	95	79	<i>R</i>
10	benzila	metila	100	14	<i>R</i>
11	<i>n</i> -octila	metila	100	8	<i>R</i>

ee.: excesso enantiomérico; Conf. Absoluta.: Configuração Absoluta.

Quantidade dos reagentes: Ti(O*i*-Pr)₄ = 5 mmol; CHP = 10 mmol; (*R,R*)-DET = 10 mmol; H₂O = 5 mmol; Sulfeto = 5 mmol; CH₂Cl₂ = 50 mL.

* Conversão determinada com base no sulfeto.

Embora o mecanismo exato para a oxidação enantiosseletiva de sulfeto com o catalisador de Sharpless modificado com água ainda seja desconhecido, existe uma boa correlação entre a configuração absoluta do tartarato e o sulfóxido formado, uma vez que sendo o grupo volumoso (G) um anel aromático e o grupo pequeno (P) um grupo alquil, os sulfóxidos formados tem configuração *R* quando (*R,R*)-DET é utilizado (Esquema 2).

Na Figura 1, mostra-se uma proposta de modelo para oxidação assimétrica de sulfetos pró-quirais utilizando o método modificado de Sharpless por Kagan. Neste modelo se propõe que a espécie cataliticamente ativa é um dímero com dois átomos de titânio conectados via uma ponte μ -oxo (Ti-O-Ti).

Esquema 2. Regra para prever a configuração absoluta na sulfoxidação assimétrica pelo reagente de Kagan.

Figura 1. Modelo proposto para o complexo de titânio - tartarato na oxidação enantiosseletiva de sulfetos pró-quirais¹⁴.

1.1.2. O Sistema de Modena

O grupo de Modena desenvolveu um sistema também baseado, como já mencionamos anteriormente, nas condições de epoxidação de Sharpless¹⁰.

O reagente de Modena apresenta a seguinte composição: TBHP/Ti(Oi-Pr)₄/(*R,R*)-DET na proporção de 1:1:4 à -20°C, onde TBHP é o agente oxidante. Os resultados são em geral similares, tanto em rendimento quanto em seletividade, àqueles obtidos usando o reagente de Kagan, entretanto este sistema apresenta melhores resultados na oxidação assimétrica de 1,3-ditiolanos¹⁰ (Tabela 3).

Tabela 3. Oxidação assimétrica de aril alquil e dialquil sulfetos por TBHP e Ti(*Oi*-Pr)₄/*(R,R)*-DET (1:4)¹⁰.

Linhas	Sulfeto	Rendimento isolado (%)	Proporção diastereoisomérica	ee (%)	Conf. Absoluta
1	<i>p</i> -Tol-S-Me	60	-	88	<i>R</i>
2	<i>p</i> -Tol-S- <i>t</i> -Bu	99	-	34	<i>R</i>
3	<i>p</i> -ClC ₆ H ₄ -S-CH ₂ CH ₂ OH	41	-	14	<i>R</i>
4	PhCH ₂ -S-Me	70	-	46	<i>R</i>
5*	2-Ph-2-Me-1,3-ditiolano	66	97:3	83 ^a	N
6	2-Ph-1,3-ditiolano	76	94:6	76 ^a	N
7	2- <i>t</i> -Bu-1,3-ditiolano	82	99:1	70 ^a	N
8	2- <i>t</i> -Bu-2-Me-1,3-ditiolano	61	99:1	68 ^a	N

ee. excesso enantiomérico; Conf. Absoluta.: Configuração Absoluta; N = não determinado.

^a Para o diastereoisomero majoritário.

Quantidade dos reagentes: Ti(*Oi*-Pr)₄ = 5 mmol; TBHP = 10 mmol; (*R,R*)-DET = 20 mmol; Sulfeto = 5 mmol; CH₂Cl₂ = 50 mL.

1.2. Sulfoxidação enantiosseletiva por oxaziridinas quirais.

Uma outra metodologia utilizada na literatura para a obtenção de sulfóxidos com elevada pureza enantiomérica é o uso de oxidantes do tipo oxaziridinas quirais. Esta metodologia iniciou-se na década 90 por Davis e colaboradores, que demonstraram a oxidação assimétrica utilizando quantidades estequiométricas de sulfetos pró-quirais com oxaziridinas quirais é um dos melhores métodos para se obter sulfóxidos opticamente ativos¹⁵. Realizou-se um estudo utilizando três tipos de oxaziridinas quirais **1-3** (Figura 2), que promoveram a formação de sulfóxidos com diferentes estereosseletividades¹⁶. Os melhores resultados para a oxidação assimétrica de sulfetos foram obtidos com *N*-(fenilsulfonyl) (3,3-diclorocanforil) oxaziridina (**3**). Este reagente foi muito eficiente para a oxidação enantiosseletiva de alquil aril sulfetos. Os correspondentes sulfóxidos foram obtidos em bons excessos enantioméricos (66-95%). Em muitos casos, os valores dos excessos enantioméricos foram superiores aqueles utilizando os reagentes de Kagan¹¹ e de Modena¹⁰.

Figura 2. Oxaziridinas quirais utilizadas na oxidação assimétrica de sulfetos pró-quirais.

A oxidação de sulfeto é realizada geralmente em presença de CCl_4 ou CH_2Cl_2 a 20°C , seguida do tratamento com 1 equivalente da oxaziridina (-)-(3) ou (+)-(3) (Tabela 4).

Tabela 4. Oxidação assimétrica de sulfetos com oxaziridina (+)-(3), em CCl_4 à 20°C ¹⁶.

Linhas	R ¹	R ²	Rendimento (%)	ee (%)	Conf. Absoluta
1	<i>p</i> -tolil	Me	95	>95	<i>S</i>
2	<i>p</i> -anisila	Me	74	80	<i>S</i>
3	<i>p</i> -tolil	<i>n</i> -Bu	90	91	<i>S</i>
4	2-naftila	Me	84	94	<i>S</i>
5	9-antranila	Me	60	95	<i>S</i>
6	9-antranila	<i>i</i> -Pr	60	94	<i>S</i>
7	Ph	ciclopropil	90	92	<i>S</i>
8	Ph	<i>t</i> -Bu	50	26	<i>S</i>

ee.: excesso enantiomérico; Conf. Absoluta.: Configura Absoluta.

Quantidade dos reagentes: Oxaziridina (+) - (4) = 0,25 mmol; CCl_4 = 10 mL; Sulfeto = 0,3 mmol.

Na Tabela 4, observa-se bons valores de excessos enantioméricos ($\geq 91\%$) quando a diferença dos tamanhos dos grupos ligados ao átomo de enxofre é grande (por exemplo, nas Linhas 1-7, Tabela 4), entretanto quando o tamanho destes grupos são similares, o valor do excesso enantiomérico foi baixo (Linha 8, Tabela 4).

Podemos destacar também que o emprego de oxaziridinas quirais na oxidação de sulfetos é muito interessante uma vez que ambos enantiômeros dos sulfóxidos podem ser preparados a partir da escolha da oxaziridina (+)-(3) ou (-)-(3).

Nesta parte do trabalho, nós apresentamos alguns métodos químicos utilizados para oxidação assimétrica de sulfetos pró-quirais nos correspondentes sulfóxidos e podemos destacar que, estes métodos químicos ainda são poucos explorados e a utilização da biocatálise é uma alternativa mais viável e utilizada para a oxidação assimétrica de sulfetos pró-quirais. (Neste trabalho vamos discutir e apresentar as principais utilizações da biocatálise para obter sulfóxidos enantiomericamente puros no Item 3 deste capítulo).

2. Método de Andersen

O método de Andersen não utiliza a oxidação assimétrica de sulfetos, entretanto até hoje é o mais utilizado para produzir sulfóxidos com elevada pureza enantiomérica devido a sua facilidade operacional e disponibilidade dos reagentes, que são comerciais, portanto é oportuno adicionarmos esta metodologia em nossa discussão, uma vez que é muito utilizada em química orgânica (e, além disso, o assunto principal desta dissertação é a obtenção de sulfóxidos quirais). Em 1962, Andersen reportou pela primeira vez, a síntese de um sulfóxido com elevada pureza enantiomérica através de uma reação de substituição nucleofílica no átomo de enxofre¹⁷. A etapa chave do método de Andersen envolve a preparação de um éster sulfinato diastereoisomericamente puro, através de um procedimento descrito por Phillips no início de 1925¹⁸ (Esquema 3).

Esquema 3. Preparação do éster sulfinato diastereoisomericamente puro (**5**).

A esterificação do ácido *p*-toluenosulfínico com (-)-(1*R*,2*S*,5*R*)- mentol (**4**) não foi estereosseletiva, produzindo uma mistura diastereoisomérica dos ésteres (*S*) e (*R*)-mentil *p*-tolueno sulfinatos (**5**) [(*S*):(*R*) ~ (2):(1)]¹⁹. Entretanto, após repetidas cristalizações ocorreu a produção do (-)-(*S*)- mentil *p*-tolueno sulfinato diastereoisomericamente puro com 30% de rendimento.

Devido a importância do (-)-(*S*)-(**5b**) como reagente para síntese de outros derivados sulfinílicos opticamente ativos²⁰, um grande esforço foi realizado para aumentar seu rendimento. A mais importante contribuição foi observada quando Hebrandson e colaboradores empregaram uma conhecida racemização de sulfóxidos pela adição de cloreto de hidrogênio (HCl) gasoso à mistura diastereoisomérica (**5**) inicial, promovendo uma epimerização do diastereoisomero líquido (+)-(*R*)-(**5a**) para o seu epímero cristalino (-)-(*S*)-(**5b**). Esta condição reacional promoveu um aumento no rendimento do (-)-(*S*)-(**5b**) para 90%, esta reação descrita em maiores detalhes do Esquema 4²¹. No caso observamos, que em meio ácido o equilíbrio foi deslocado em direção do diastereoisomero (*S*) menos solúvel, o qual foi isolado por cristalização.

Esquema 4. Epimerização do éster mentil sulfinato (+)-(R)-(5a) em meio ácido.

Andersen trabalhou basicamente com o ataque nucleofílico de um reagente de Grignard no sulfinato (-)-(S)-(5b), substituindo o grupo de saída OMentil para produzir o sulfóxido (+)-(R)-(6) (Esquema 5).

Esquema 5. Obtenção do aril ou alquil sulfóxido com elevada pureza enantiomérica através do tratamento do éster sulfinato com reagente de Grignard.

O método de Andersen permitiu a síntese de um grande número de aril sulfóxidos enantiomericamente puros²², sempre com inversão total de configuração no átomo de enxofre, uma vez que ocorre uma reação de substituição nucleofílica neste átomo. Entretanto existem algumas limitações como o fato dos dialquil e diaril sulfóxidos não poderem ser obtidos por este método, uma vez que os esteres mentil alquil sulfinatos diastereoisomericamente puros não podem ser obtidos²³.

Devido estas limitações, começaram a ocorrer algumas adaptações no método de Andersen. Pode-se citar Mikolajczyk e colaboradores que observaram um aumento no

rendimento da reação de Andersen simplesmente variando o solvente de éter dietílico para benzeno, além disso não ocorreu perda de pureza óptica²⁴. Outra adaptação foi realizada por Harpp através do uso de reagente de lítio-cobre (R_2CuLi) ao invés de reagentes de Grignard, produzindo sulfóxidos mais funcionalizados²⁵ e com elevada pureza óptica.

3. Oxidação biológica enantiosseletiva.

Nas últimas décadas, sulfoxidações assimétricas catalisadas por enzimas e metais têm sido muito utilizadas para a preparação de sulfóxidos opticamente ativos, os quais têm sido empregados como blocos de construção quiral ou grupos estereodirigentes⁶.

Como nosso trabalho foi baseado na utilização da biocatálise, que é uma importante ferramenta em síntese assimétrica, iremos destacar as principais vantagens de se utilizar métodos biocatalíticos em relação a catálise metálica, na tentativa de se obter sulfóxidos enantiomericamente puros, são elas²⁶:

- ✓ Atuam sob condições suaves (pH 7, temperatura de 20 a 40°C), minimizando problemas como decomposição, racemização, epimerização;
- ✓ Exibem seletividades para as reações químicas que catalisam, como por exemplo: quimiosseletividade, enantiosseletividade, regiosseletividade e diastereosseletividade. Além disso, uma grande vantagem é que as reações podem ser realizadas em meio aquoso não causando danos ao meio ambiente, uma vez que a matéria prima é biodegradável.
- ✓ O uso de microrganismos e enzimas isoladas apresentam menor custo financeiro comparando com o uso de catalisadores metálicos.
- ✓ Quando se utiliza catalisadores biológicos (fungos, bactérias ou enzimas isoladas), especificamente no caso de sulfóxidos, obtêm-se elevada enantiosseletividade (em muitos casos chegam a > 99%) enquanto que ao se utilizar catalisadores metálicos os excessos raramente chegam a 95%.

Como todo método tem as suas limitações, iremos citar algumas:

- ✓ As enzimas são obtidas da Natureza em uma única forma enantiomérica.
- ✓ Enzimas exibem elevadas atividades catalíticas em meio aquoso.
- ✓ Enzimas requerem estudos para determinar os melhores parâmetros para sua utilização.

3.1. Sulfoxidação catalisada por enzimas.

As enzimas isoladas foram utilizadas pela primeira vez na oxidação de sulfetos pró-quirais por Walsh e colaboradores no começo de 1980²⁷. O uso do dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) de fígado de porco, contendo monoxigenases produziu o (*R*)-etil-*p*-tolil-sulfóxido (**8**) em 90% de excesso enantiomérico²⁷, enquanto que flavina contendo ciclohexanona monoxigenase (CMO) de *Acinetobacter* produziu o enantiômero oposto (**9**) em 64% de excesso enantiomérico²⁸ (Esquema 6).

Esquema 6. Oxidação enzimática do etil-*p*-tolil-sulfeto (**7**) com FAD e CMO.

Em outros estudos, Colona e colaboradores²⁹ investigaram a ação enzimática da ciclohexanona monoxigenase (CMO) em vários sulfetos pró-quirais (Tabela 5).

Tabela 5. Oxidação enantiosseletiva de sulfetos catalisada por ciclohexanona monoxigenase (CMO)²⁹.

R ₁	R ₂	Rendimento (%)	ee (%)	Conf. Absoluta
Ph	Me	88	99	<i>R</i>
<i>p</i> -FC ₆ H ₄	Me	91	92	<i>R</i>
Ph	Et	86	47	<i>R</i>
<i>p</i> -FC ₆ H ₄	Et	96	93	<i>S</i>
Ph	<i>i</i> -Pr	93	3	<i>S</i>
<i>t</i> -Bu	Me	98	99	<i>R</i>
1,3- ditiana*		81 ^a	>98	<i>R</i>
1,3- ditiolana		94 ^a	>98	<i>R</i>
<i>Bis</i> (metiltio)metano**		92 ^a	>98	<i>R</i>

ee.: excesso enantiomérico; Conf. Absoluta.: Configuração Absoluta.

* estrutura geral da ditiana:

** estrutura do *bis*(metiltio)metano:

Como pode ser observado na Tabela 5, o resultado estereoquímico das reações enzimáticas foram muito dependentes da estrutura do sulfeto. Este método é particularmente adequado para a preparação de (*R*)-*t*- butil metil sulfóxido (99% de excesso enantiomérico), assim como para a mono-oxidação enantiosseletiva de ditioacetais (Tabela 5). Uma característica interessante deste método é o uso de uma segunda enzima para regenerar o NADPH, que é muito caro e, portanto diminui o custo operacional da reação através do uso do NADPH em quantidade catalítica.

Peroxidase são enzimas capazes de catalisar a sulfoxidação. Até hoje, a mais versátil nestas aplicações é cloroperoxidase (CPO) de *Caldariomyces fumago* (CPO), isolada em 1961 por Hager³⁰ e foi utilizada pela primeira vez na sulfoxidação enantiosseletiva por Kobayashi, entretanto com baixos valores de excesso enantiomérico (13%)³¹. Nesta sulfoxidação enantiosseletiva catalisada por CPO, a H_2O_2 é o melhor oxidante, promovendo a síntese de sulfóxidos opticamente puros com elevado rendimento e seletividade³².

Um estudo detalhado realizado por Wong e colaboradores envolvendo a oxidação de (arilmetil) sulfetos *p*-substituídos catalisada por cloroperoxidasas (CPO) utilizando H_2O_2 como oxidante produziu (*R*)-sulfóxidos com elevado rendimento isolado e pureza óptica (Esquema 7)³³.

Esquema 7. Oxidação de (arilmetil)sulfetos *p*-substituídos (10) por CPO.

De modo interessante, quando o ($\pm$)-1-fenil metil hidroperóxido (12) foi utilizado como oxidante, a enzima aceitou seletivamente o (*R*)-hidroperóxido como substrato e oxidou sulfetos exclusivamente para (*R*)-sulfóxidos (13). Além disso, o (*R*)-álcool (15) e o (*S*)-hidroperóxido (14) opticamente ativos foram obtidos como produtos da reação (Esquema 8)³³.

Esquema 8. Oxidação de sulfetos por CPO utilizando hidroperóxidos como oxidantes.

A oxidação catalisada por CPO pode levar a uma competição com a oxidação espontânea dos sulfetos pelo peróxido, produzindo sulfóxidos racêmicos. Esta reação indesejável pode ser minimizada pela redução da concentração dos substratos (sulfeto e hidroperóxido)³³.

Alguns sulfetos aromáticos bicíclicos têm sido recentemente oxidados em elevados excessos enantioméricos (acima de 91%) por vanádio contendo bromoperoxidase (VBrPO) da alga *Corallina officinalis*³⁴. É interessante notar que a VBrPO produz o sulfóxido (*S*)-bicíclico (**17a**), com a estequiometria oposta aquela obtida com CPO do *Caldariomyces fumago* (Esquema 9).

Esquema 9. Oxidação do biciclo (16) com VBrPO e CPO.

Outras peroxidases têm sido utilizadas para catalisar a sulfoxidação enantiosseletiva de (arilalquil) sulfetos, como por exemplo: horseradish peroxidase (HRP)³⁵, citocromo *c* peroxidase (CcP)³⁶, lactoperoxidase (LPO)³⁷ e dioxigenase³⁸.

Finalmente, uma interessante e promissora inovação é a utilização da engenharia molecular para aumentar a eficiência e seletividade de oxidações bioquímicas. Recentemente, Ozaki produziu uma HRP mutante na qual a fenilalanina é substituída pela leucina, conduzindo a um aumento da enantiosseletividade da enzima, produzindo (*S*)-sulfóxidos com elevados excessos enantioméricos³⁹ (Tabela 6).

Tabela 6. Enantiosseletividade na oxidação de tioéteres usando HRP e HRP F41L (mutante)³⁹.

Linhas	R ₁	R ₂	ee (%) (HRP nativa)	ee (%) (HRP F41L)	Conf. Absoluta
1	fenila	etila	35	94	<i>S</i>
2	fenila	ciclopropila	7	94	<i>S</i>
3	2-naftila	metila	69	99	<i>S</i>

ee.: excesso enantiomérico; Conf. Absoluta.: Configuração absoluta. Rendimento não foi determinado.

3.2.Oxidação microbiológica.

A grande vantagem da utilização de células de microrganismos como biocatalisador é evitar a necessidade de isolar as enzimas, assim como a introdução de cofatores. A oxidação biológica de sulfetos a sulfóxidos usando células íntegras têm sido muito empregada para fungos, bactérias e leveduras⁴⁰.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

3.2.1. Bactérias.

Dentre as várias linhagens de bactérias utilizadas na oxidação de sulfetos metalocênicos, *Corynebacterium equi* ATCC 21107 conduziu a oxidação de derivados ferrocênicos sulfetos (18) para os respectivos (R)-sulfóxidos em 95% de excesso enantiomérico⁴¹ (Esquema 10).

Esquema 10. Oxidação do sulfeto metalocênico (18) com *C. equi* ATCC 21107.

Recentemente, Otha⁴² reportou que 2-alkil etil fenil sulfetos podem ser oxidados por *Rhodococcus equi* produzindo o correspondente (R)-sulfóxido em elevados excessos enantioméricos.

Em 1995, Boyd e Dalton reportaram a oxidação microbiológica de um grande número de (arilalkil) sulfetos, ditianas substituídas e ditiolanos para os respectivos sulfóxidos⁴³, sob a ação enzimática de um grupo selecionado de bactéria *Pseudomonas putida*. Por exemplo, a *P. putida* UV4 produziu sulfóxidos com configuração absoluta (R) em elevados excessos enantioméricos (acima de 97%), enquanto que os rendimentos químicos para os diaril sulfóxidos foram baixos (Esquema 11). De modo interessante,

quando outra linhagem de *P. putida* NCIMB 8859 foi empregada, (*S*)-sulfóxidos foram obtidos preferencialmente (Esquema 11).

Esquema 11. Oxidação de (arilalquil) sulfetos utilizando duas diferentes linhagens de bactéria *P. putida*.

3.2.2. Fungos

De maneira geral, Holland e colaboradores estudaram a oxidação de sulfetos pró-quirais sob a ação enzimática de fungos *Helminthosporium* sp e *Mortierella isabellina*. Holland foi o químico que mais empregou a biocatálise (fungos) na oxidação assimétrica de sulfetos a sulfóxidos quirais tendo contribuído com mais de 100 trabalhos nesta área. Ele era pesquisador do Departamento de Química da Universidade de Brock, St. Catharines, Ontario (Canadá).

O fungo *Helminthosporium* oxidou eficientemente fenil e benzil alquil sulfetos⁴⁴, *p*-alquil benzil metil sulfetos⁴⁵ e isotiocianatos sulfetos⁴⁶ para os correspondentes (*S*)-sulfóxidos, entretanto os rendimentos isolados nem sempre foram bons (sulfonas foram obtidas em alguns casos), e os excessos enantioméricos foram geralmente acima de 80% (Tabela 7). Nos estudos desenvolvidos por Holland e col. os fungos *Mortierella isabellina* e *Helminthosporium* sp são complementares, uma vez que o primeiro produziu sulfóxidos com a configuração absoluta *R*, mas com rendimento isolado e enantiosseletividade inferiores aos obtidos com o *Helminthosporium* sp, como no Esquema 12.

Tabela 7. Biotransformações de sulfetos a sulfóxidos com *Helminthosporium* sp⁴⁴.

R ₁	R ₂	Rendimento (%)	ee (%)	Conf. Absoluta
Ph	Et	40	84	<i>S</i>
<i>p</i> -Br-C ₆ H ₄	Me	69	90	<i>S</i>
<i>p</i> -NC-C ₆ H ₄	Me	80	92	<i>S</i>
<i>p</i> -MeO-C ₆ H ₄	Me	83	80	<i>S</i>
<i>p</i> -MeS-C ₆ H ₄	Me	64	80	<i>S</i>
<i>p</i> -Bu-C ₆ H ₄ CH ₂	Me	74	90	<i>S</i>
<i>p</i> -(<i>i</i> -Pr)C ₆ H ₄ CH ₂	Me	77	80	<i>S</i>
<i>p</i> -ClC ₆ H ₄ CH ₂	Me	71	90	<i>S</i>
<i>p</i> -O ₂ N-C ₆ H ₄ CH ₂	Me	95	92	<i>S</i>
<i>p</i> -MeO-C ₆ H ₄ CH ₂	Me	86	80	<i>S</i>

ee.: excesso enantiomérico; Conf. Absoluta.: Configuração Absoluta.

Esquema 12. Oxidação do sulfeto (23) utilizando fungos *Helminthosporium* e *Mortierella isabelina*.

3.2.2.1. Fungos Basidiomicetos

Neste trabalho focamos atenção nos fungos Basidiomicetos, os quais são conhecidos como fungos da podridão branca, uma vez que decompõem a lignina presente na madeira⁴⁸, causando o apodrecimento e em alguns casos, a morte da planta. Esta característica é muito interessante, uma vez que a lignina do ponto de vista químico é um polímero opticamente inativo consistindo de unidades de fenilpropanóides, os quais são ligados por várias ligações covalentes, portanto é uma macromolécula extremamente estável e de difícil decomposição⁴⁹.

Estes fungos secretam enzimas oxidorreduções não específicas⁴⁹ (por exemplo, lacases, lignina peroxidases e manganês peroxidases) responsáveis por degradar a lignina a dióxido de carbono. Além disso, devido ao elevado potencial de óxido-redução destas enzimas extracelulares, os fungos Basidiomicetos são muito utilizados na biorremediação de poluentes de solos e do meio ambiente⁵⁰, em geral, como por exemplo, na degradação de PAHs (hidrocarbonetos aromáticos policíclos), PCBs (Bifenilos Policlorados) e de BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e *o*, *m*, *p*- xilenos).

Na Tabela 8 estão alguns resultados recentes obtidos da biodegradação de um grande número de poluentes por fungos Basidiomicetos.

Tabela 8. Biodegradação de poluentes por fungos e suas oxidasas extracelulares⁵⁰.

Poluentes	Enzimas	Fonte das Enzimas	Diminuição dos Poluentes	Ref.
Corantes Azos	Lacase	<i>P. sanguineus</i>	Acima de 60%	51
Biopolímeros	LiP, MnP	Fungos da decomposição branca	Muito significativo	52,53, 54
CCl ₄ , CHCl ₃	LiP, MnP	<i>P. chrysosporium</i>	Acima de 50%	55
PAHs	LDSs, Lacase	<i>P. chrysosporium</i> , <i>T. versicolor</i>	70-100%	56,57
PCBs	LiP, MnP	<i>C. polyzona</i> , <i>P. ostreatus</i> , <i>T. versicolor</i>	Muito significativo.	58,59
PCP	LDSs	<i>P. chrysosporium</i> , <i>T. versicolor</i>	99%	60,61
TNT, RDX	LiP, MnP	Fungos da decomposição branca	30-50%	62,53

CCl₄: tetracloreto de carbono; CHCl₃: tricloreto de carbono; PAHs: Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos; PCBs: Bifenis policlorados; TNT: 2,4,6- trinitrotolueno; LDS: sistemas enzimáticos degradadores de lignina.

A lignina peroxidase (LiP) e a manganês peroxidase (MnP) utilizam H₂O₂ para catalisar a oxidação de um grande número de compostos aromáticos não fenólicos e as lacases catalisam a oxidação de um grande número de compostos fenólicos utilizando oxigênio molecular como aceptor de elétrons⁶³. Estes fatos tornam os fungos Basidiomicetos atrativos candidatos para transformar sulfetos a sulfóxidos. Com a finalidade de utilizarmos a ação enzimática dos fungos Basidiomicetos, iremos mostrar a seguir os ciclos catalíticos básicos para todas as peroxidases.

3.2.2.1.1. Ciclo catalítico de reação das peroxidases.

O ciclo catalítico inicia-se com a interação entre a enzima nativa e H_2O_2 , com a formação de um complexo ferro-peróxido. Subseqüentemente, ocorre a clivagem da ligação oxigênio-oxigênio do peróxido envolvendo a transferência de 2 elétrons, que resulta na formação do Composto I. Posteriormente, ocorre duas etapas de oxidação dos substratos regenerando a enzima em seu estado nativo e liberando outra molécula de água, via Composto II (intermediário)⁶⁴. A formação do cátion radical sulfeto, ilustrado no Esquema 13, é então convertido para sulfóxido através de uma reação com o meio (H_2O) ou por uma reação com o Composto II, a competição entre estes dois caminhos reacionais vai depender da estabilidade do cátion radical (Esquema 14)⁶⁵.

Esquema 13. Ciclo catalítico de reação de peroxidases⁶⁴.

Esquema 14. Os sulfóxidos podem ter origem do cátion radical seguido por um processo enzimático ou por um caminho não enzimático.

3.2.3. Leveduras

A oxidação enantiosseletiva de sulfetos pró-quirais utilizando leveduras têm sido empregada em menor proporção quando comparada com bactérias e fungos. A levedura mais utilizada foi a *Saccharomyces cerevisiae*.

Recentemente, Roberts e colaboradores descreveram uma elevada oxidação enantiosseletiva do metil-*p*-tolil sulfeto (**26**) para o correspondente (*R*)-sulfóxido (**27**) utilizando *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 73 (Esquema 15)⁴⁷. Esta transformação foi realizada com 92% de excesso enantiomérico e 60% de rendimento isolado, e o produto foi utilizado como auxiliar quiral em sínteses de intermediários chaves na preparação de análogos do ácido mevinico.

Esquema 15. Oxidação do metil-*p*-tolil sulfeto (26) por *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 73.

4. Bibliografia

1. Eissen, O; Metzger, J. O; Schmidt, E.; Schneidewind, U. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 414.
2. Stinson, S. C., *C & EN*. **2001**, May, pg. 45.
3. FDA's Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs <http://www.fda.gov/cder/guidance/stereo.htm>.
4. Stinson, S. C., *C & EN*. **2001**, October, pg. 79.
5. Patel, R. N. *Adv. Synth. Catal.* **2001**, 343, 527.
6. Carreño, M. C. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 1717-1760.
7. Walker, A. J. *Tetrahedron: Asymmetry*. **1992**, 3, 961.
8. Mata, E. G. *Phosphorus, Sulfur and Silicon*. **1996**, 117, 231.
9. Johnson, R. A.; Sharpless, K. B. em *Catalytic Asymmetric Synthesis*. Ojima, I., Ed.; VCH: New York, **1993**; p 227.
10. Di Furia, F.; Modena, G.; Seraglia, R. *Synthesis*. **1984**, 325.
11. Pitchen, P.; Kagan, H. B. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 24, 1049.
12. Zhao, S. H.; Samuel, O.; Kagan, H. B. *Tetrahedron*. **1987**, 43, 5135.
13. Zhao, S. H.; Samuel, O.; Kagan, H. B. *Org. Synth.* **1989**, 68, 49.
14. (a) Kagan, H. B. *Proceedings of the Symposium "Selective Reactions of Metal-Activated Molecules"*. Würzburg, Germany, Sept 18-20, **1991**. (b) Pitchen, P.; Deshmukh, M. N.; Duñach, E.; Kagan, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 8188.
15. Davis, F. A.; Chen, B. C. *Chem. Rev.* **1992**, 92, 919.

16. (a) Davis, F. A.; Reddy, R. T.; Weismiller, M. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 5964. (b)) Davis, F. A.; Reddy, R. T.; Han, W.; Carroll, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1428.
17. Andersen, K. K. *Tetrahedron Lett.* **1962**, 93.
18. Phillips, H. *J. Chem. Soc.* **1925**, 2552.
19. Mislow, K.; Green, M. M.; Laur, P.; Melillo, J. T.; Simmons, T.; Ternay, A. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 1958.
20. Herbrandson, H. F.; Dickerson, R. T.; *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 4102.
21. Mioskowski, C.; Solladie, G. *Tetrahedron*. **1980**, 36, 227.
22. Hebrandson, H. F.; Cusano, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, 83, 2124.
23. Andersen, K. K.; Buynicki, B.; Mikolajczyk, M.; Drabowicz, J. *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 4070.
24. Drabowicz, J.; Buynicki, B.; Mikolajczyk, M. *J. Org. Chem.* **1982**, 47 3987.
25. Harpp, D. N.; Vines, S. M.; Montillier, J. P.; Chan, T.H. *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 3987.
26. Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*. edn. 4. Heidelberg: Springer, Áustria, **2000**.
27. Light, D. R.; Waxman, D. J.; Walsh, C.T. *Biochemistry*. 1982, 21, 2490.
28. Waxman, D. J.; Light, D. R.; Walsh, C.T. *Biochemistry*. 1982, 21, 2499.
29. (a) Carrea, G.; Redigolo, B.; Riva, S.; Colonna, S.; Gaggero, N.; Battistel, E.; Bianchi, D. *Tetrahedron: Asymmetry*. **1992**, 3, 1063. (b) Ottolina, O.; Pasta, P.; Carrea, G.; Colonna, S.; Dallavalle, S.; Holland, H. L. *Tetrahedron: Asymmetry*. **1995**, 6, 1375.
30. Shaw, P. D.; Hager, L. P. *J. Biol. Chem.* **1961**, 236, 1626.
31. Kobayashi, S.; Nakaro, M.; Kimura, T.; Schaap, A. P. *Biochemistry*. **1987**, 26, 5019.
32. Colonna, S.; Gaggero, N.; Casella, L.; Carrea, G.; Pasta, P. *Tetrahedron: Asymmetry*. **1992**, 3, 95.
33. Fu, H.; Kondo, H.; Ichikawa, Y.; Look, G. C.; Wong, C. H. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 7265.
34. Andersson, M.; Willets, A. Allenmark, S. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 8544.

36. Miller, V. P.; DePillis, G. D.; Ferrer, J. C.; Mauk, A. G.; Ortiz de Montellano, P. *R. J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 8936.
37. Colonna, S.; Gaggero, N.; Richelmi, C.; Carrea, G.; Pasta, P. *Gazz. Chim. Ital.* **1995**, 125, 479.
38. Lee, K.; Brand, J. M.; Gibson, D. T.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 212, 9.
39. (a) Ozaki, S.; Ortiz de Montellano, P. –*R. J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 4487. (b) Ozaki, S.; Ortiz de Montellano, P. –*R. J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 7056.
40. (a) Holland, H. L.; *Chem. Rev.* **1988**, 88, 473. (b) Holland, H. L. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 171.
41. Yamazaki, Y.; Hesse, C.; Okuno, H.; Abraham, W. –*R. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, 45, 595.
42. Ohta, H.; Matsumoto, S.; Okamoto, Y.; Sugai, T. *Chem. Lett.* **1989**, 625.
43. Allen, C. C. R.; Boyd, D. R.; Dalton, H.; Sharma, N. D.; Haughley, S. A.; McMordie, R. A. S.; McMurray, B. T.; Sheldrake, G. N.; Sproule, K. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 119.
44. (a) Holland, H.L.; Brown, F. M.; Larsen, B. G. *Tetrahedron: Asymmetry.* **1994**, 5, 124. (b) Holland, H.L.; Brown, F. M.; Larsen, B. G. *Tetrahedron: Asymmetry.* **1995**, 6, 1561.
45. Holland, H.L.; Brown, F. M.; Larsen, B. G. *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, 2, 647.
46. Holland, H.L.; Brown, F. M.; Larsen, B. G. *Tetrahedron: Asymmetry.* **1994**, 5, 1129.
47. Tang, J.; Brackenridge, I.; Roberts, S. M.; Beecher, J.; Willets, A. J. *Tetrahedron.* **1995**, 51, 13217.
48. Have, R. Tem.; Teunissen, P. J. M. *Chem. Rev.* **2001**, 101, 3397.
49. Hofrichter, M. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, 30, 45.
50. Gianfreda, L.; Rao, M. A. *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, 35, 339.
51. Pointing, S. B.; Vrijimoed, L. L. P. *J. Microb. Biotechnol.* **2000**, 16, 317.
52. Reddy, C. A. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1995**, 6, 320.
53. Cameron, M. D.; Timofeevski, S.; Aust, S. D. *Appl. Microb. Biotechnol.* **2000**, 54, 751.

54. Pointing, S. B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, 57, 20.
55. Cameron, M. D.; Aust, S. D. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, 367, 115.
56. Bumpus, J. A. *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, 55, 154.
57. Bogan, B. W.; Lamar, R. T. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 62, 1597.
58. Zeddel, A. Majcherczyk, A.; Hutterman, A. *Toxicol. Environ. Chem.* **1993**, 40, 225.
59. Novotny, C.; Vyas, B. R. M.; Erbanova, P.; Kubatova, A.; Sasek, V. *Folia Microbiol.* **1997**, 42, 136.
60. Alleman, B. C.; Loan, B. E.; Gilbertson, R. L. *Water Res.* **1995**, 29, 61.
61. Lin, J. E.; Wang, H. Y.; Hickey, R. F. *Biotechnol Bioeng.* **1990**, 35, 1125.
62. Bumpus, J. A.; Tatarko, M. *Curr. Microbiol.* **1994**, 28, 185.
63. Tanaka, H.; Itakura, S.; Enoki, A. *J. Biotechnol.* **1999**, 75, 57.
64. Hofrichter, M. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, 30, 454.
65. Baciocchi, E.; Gerini, M. F.; Harvey, P. J.; Lanzalunga, O.; Mancinelli, S. *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 2705.

Capítulo II

Resultados e Discussão

A.Triagem de fungos Basidiomicetos para a oxidação de sulfetos.

B.Síntese e Transformações biológicas de moléculas bi-funcionalizadas.

C.Aplicação do sulfóxido alílico racêmico na síntese de biciclos.

Resultados e Discussão

Parte A

II) Resultados e Discussão

A. Triagem para a oxidação de sulfetos.

A oxidação de sulfetos é a rota usada para a síntese de sulfóxidos. Embora sejam conhecidos muitos agentes oxidantes¹, eles apresentam uma característica comum, causam a overoxidação a sulfonas, portanto diversos trabalhos estão sendo realizados nesta área nos últimos anos buscando oxidantes mais brandos para a síntese de sulfóxidos².

Avanços importantes têm sido feitos na oxidação enantiosseletiva de sulfetos pró-quirais para os correspondentes sulfóxidos quirais³. A principal razão é que os sulfóxidos quirais são muito utilizados como auxiliares ou reagentes em síntese assimétricas devido à suas elevadas diastereosseletividades⁴. O grupo funcional sulfóxido também está envolvido em diferentes atividades biológicas e os sulfóxidos opticamente puros são de grande interesse farmacêuticos⁵.

Devido a estes fatos citados acima, nosso primeiro trabalho foi a realização de uma triagem, utilizando fungos Basidiomicetos, para oxidação de sulfetos pró-quirais (**1a-d**) a sulfóxidos.

A.1. Síntese dos substratos utilizados na triagem.

A.1.1. Síntese de sulfetos (**1a-d**).

A síntese racêmica dos sulfetos **1a-d** foi realizada conforme procedimento descrito na literatura⁶ (Esquema A.1).

Esquema A.1- Síntese dos sulfetos (**1a-d**).

A.1.2. Síntese dos sulfóxidos e das sulfonas.

As sínteses racêmicas dos sulfóxidos (**2a-d**) e das sulfonas (**3a-d**) foram realizadas conforme procedimentos descritos na literatura⁷ (Esquema A.2). Estes compostos foram utilizados como padrões cromatográficos na realização da triagem.

Esquema A.2. Síntese dos sulfóxidos (**2a-d**) e das sulfonas (**3a-d**).

A.2. Resultados da triagem.

A realização de uma triagem é muito interessante, uma vez que se pode investigar a reação enzimática ao longo de um determinado período, e assim determinar as melhores condições experimentais para obter o produto desejável. Deve-se enfatizar que no decorrer da triagem mais de uma reação enzimática pode estar ocorrendo no substrato de interesse, como no caso de um grupo carbonílico, onde pode ocorrer reações de redução, lactonização e reoxidação do álcool.

Neste trabalho, realizou-se o estudo enzimático da oxidação microbiológica dos (fenilalquil) sulfetos **1a-d** com 6 diferentes classes de fungos Basidiomicetos, são eles: *Irpex lacteus* CCB 196, *Pycnoporus sanguineus* CCB 501, *Trametes rigida* CCB 285, *Trametes versicolor* CCB 202, *Trametes villosa* CCB 291 e *Trichaptum byssogenum* CCB 203 (Esquema A.3).

Esquema A.3. Oxidação enzimática de (fenilalquil) sulfetos com fungos Basidiomicetos.

Esta parte do trabalho teve como objetivos principais obter sulfóxidos enantiomericamente puros e avaliar o potencial enzimático da classe de fungos Basidiomicetos, portanto decidimos dividir este estudo em três diferentes condições experimentais.

Na condição **(a)** realizou-se o estudo da oxidação enzimática selecionando-se como substrato o sulfeto (**1b**) com o meio de cultura dos fungos Basidiomicetos, uma vez que é reportado na literatura que esta classe de fungos excretam enzimas óxido-redutases (por exemplo: lacases e peroxidases) que degradam a lignina presente na madeira em dióxido de carbono⁸. Além disso, lacases são enzimas conhecidas por catalisar a oxidação de um grande número de compostos fenólicos utilizando oxigênio molecular como aceptor de elétrons⁹. Portanto, a utilização do meio de cultura destes fungos, como fonte enzimática, pode ser uma maneira interessante e diferente de se obter sulfóxidos enantiomericamente puros ou enriquecidos.

Nas condições **(b)** e **(c)** realizaram-se o estudo do potencial enzimático dos fungos Basidiomicetos na oxidação dos sulfetos **1a-d** em diferentes quantidades (1g e 3g) de células úmidas destes fungos.

A.3. Oxidação enzimática do sulfeto (1b) utilizando o meio de cultura dos fungos Basidiomicetos – Condição (a).

Como já mencionado anteriormente, este trabalho teve a finalidade de verificar a presença de enzimas óxido-redutases excretadas por fungos Basidiomicetos através da oxidação enzimática do sulfeto (1b), como substrato padrão, com o meio de cultura dos fungos Basidiomicetos. O motivo de trabalhar apenas com o sulfeto (1b) e os resultados desta oxidação serão discutidos no decorrer desta discussão.

Os resultados destes estudos estão na Tabela A.1.

Tabela A.1. Oxidação do (feniletil) sulfeto (1b) com meio de cultura dos fungos Basidiomicetos.

Linhas	t	c (%) (2b)	e.e. (%)	Config. Abs.	c (%) (3b)	c (%) (2b)	e.e. (%)	Config. Abs.	c (%) (3b)
#	<i>Irpex lacteus</i> CCB 196					<i>Trametes versicolor</i> CCB 202			
1	2	91	0	-	0	33	0	-	26
2	4	100	0	-	0	0	0	-	0
3	6	100	0	-	0	0	0	-	0
4	8	87	64	R	13	0	0	-	0
#	<i>Pycnoporus sanguineus</i> CCB 501					<i>Trametes villosa</i> CCB 291			
5	2	79	0	-	0	47	0	-	0
6	4	81	0	-	0	50	0	-	0
7	6	100	0	-	0	0	0	-	100
8	8	100	0	-	0	0	0	-	100
#	<i>Trametes rigida</i> CCB 285					<i>Trichaptum byssogenum</i> CCB 203			
9	2	46	0	-	0	28	0	-	0
10	4	46	0	-	0	62	0	-	19
11	6	38	38	S	37	53	25	S	33
12	8	39	>99	S	60	51	55	S	49

t: tempo (dias); c: conversão determinada por CG; Config. Abs.: Configuração Absoluta.

Como pode ser observado na Tabela A.1, quando utilizou-se o meio de cultura como fonte enzimática, pouca ou nenhuma enantiosseletividade do sulfóxido (2b) foi obtido. Quando usou-se o meio de cultura dos fungos *P. sanguineus* CCB 501 e *I. lacteus* CCB 196, o sulfeto (1b) foi biotransformado para o sulfóxido (2b) sem nenhuma estereosseletividade (Tabela A.1, Linhas 1-3, 5-8). Após 8 dias em contato com o meio de cultura do fungo *I. lacteus* CCB 196, o sulfeto (1b) foi biotransformado no (R)-

sulfóxido (**2b**) com 64% de excesso enantiomérico e a sulfona (**3b**) foi obtida como produto da overoxidação do sulfeto (**1b**). Este resultado mostrou que somente após 8 dias de reação é que ocorreu a formação sulfóxido (**2b**) com alguma enantiosseletividade (Tabela A.1, Linha 4).

Quando empregou-se o meio de cultura do fungo *T. rigida* CCB 285 a oxidação do sulfeto (**1b**) produziu (*S*)-sulfóxido (**2b**) com elevado excesso enantiomérico (e.e. $\geq 99\%$) após 8 dias, mas com modesta conversão (Tabela A.1, Linha 12). Foi também observado que o meio de cultura do fungo *T. versicolor* CCB 202 degradou o substrato (**1b**) (Tabela A.1, Linhas 1-4) e o meio de cultura do fungo *T. villosa* CCB 291 aumentou a produção de sulfona (**3b**) em 100 % (Tabela A.1, Linhas 7-8).

Os resultados apresentados na Tabela A.1 indicam a presença de enzimas óxido-redutases no meio de cultura dos fungos Basidiomicetos estudados, uma vez que se observou uma significativa produção de sulfóxidos (**2b**) com os fungos Basidiomicetos *I. lacteus* CCB 196 e *P. sanguineus* CCB 501. Entretanto estes sulfóxidos (**2b**) foram obtidos com modestas enantiosseletividades, logo esta condição experimental não se mostrou eficiente para o nosso objetivo principal que era obter sulfóxidos enantiomericamente puros e portanto, não realizou-se a oxidação enzimática de outros sulfetos utilizando o meio de cultura dos fungos Basidiomicetos.

Com o objetivo de obter sulfóxidos enantiomericamente puros, realizou-se reações biocatalíticas utilizando células úmidas dos fungos Basidiomicetos e os resultados e comentários destes estudos são mostrados a seguir.

A.3.1. Oxidação enzimática dos sulfetos 1a-d utilizando células úmidas dos fungos Basidiomicetos – Condições (b) e (c).

Com base nos resultados mostrados anteriormente, nós resolvemos dar atenção à oxidação enzimática dos sulfetos **1a-d** usando diferentes quantidades de células úmidas (1g e 3g) de fungos Basidiomicetos em solução tampão fosfato (pH 7) e analisando estas reações em tempos periódicos (Tabelas A.2, A.4, A.5 e A.6).

Em geral, as reações realizadas sob estas condições procederam com boa conversão (42-96%, 2 dias) e com bom excesso enantiomérico (de 12 até $\geq 99\%$, 2 dias), usando 1g e 3g de células úmidas de fungos Basidiomicetos. Estes resultados são mostrados e comentados a seguir.

A.3.1.1. (Fenilmetil) sulfeto (**1a**).

Como podemos observar na Tabela A.2, o melhor resultado na oxidação enzimática do (fenilmetil) sulfeto (**1a**) foi obtida com a utilização de 3g de células úmidas do fungo *T. byssogenum* CCB 203, resultando o (-)-(S)-(fenilmetil) sulfóxido (**2a**) em 86% de conversão e 75% de excesso enantiomérico em 8 dias de reação (Tabela A.2, Linha 24, Figura 2).

Na tentativa de obter o (S)-sulfóxido (**2a**) com 8 dias de reação, observou-se uma grande dificuldade na sua extração em meio aquoso, uma vez que esta classe de compostos são extremamente higroscópios. Portanto, decidimos adequar o tempo reacional para 3 dias, com o objetivo de diminuir o tempo de contato do sulfóxido com o fungo e assim obter o (S)-sulfóxido (**2a**) com melhor rendimento isolado, uma vez que estes fungos são conhecidos como biodegradadores. Devemos salientar que esta dificuldade na extração foi encontrada para todos os sulfóxidos **2a-d**, logo adotou-se este tempo como padrão para todas as reação em escala semi-preparativa.

Com base nestes resultados, realizou-se a reação de oxidação enzimática do sulfeto (**1a**) em escala semi-preparativa, utilizando células úmidas do fungo *T. byssogenum* CCB 203 e o (S)-sulfóxido (**2a**) foi obtido em 37% de rendimento e 7% de excesso enantiomérico em 3 dias de reação.

Além disso, o decréscimo na enantiosseletividade no caso do (*S*)-sulfóxido (**2a**), pode ser atribuído ao procedimento experimental realizado, uma vez que realizou-se a reação enzimática em 10 frascos e utilizou-se somente um frasco como controle, portanto é possível que nem todas as reações estivessem no mesmo estágio reacional e isso poderia ter interferido na sua enantiosseletividade. Deve-se levar em conta que os fungos Basidiomicetos são conhecidos como potentes biodegradadores de moléculas orgânicas, portanto poderia estar ocorrendo uma degradação tanto do sulfeto como dos sulfóxidos e sulfonas. Neste trabalho, não investigamos esta suposição porque para realização deste estudo de biodegradação seria necessário um tempo operacional maior para a conclusão deste.

Observamos também que 3g de células úmidas do *I. lacteus* CCB 196 oxidou o sulfeto (**1a**) no (-)-(*S*)-sulfóxido (**2a**) com conversão de 61% e excesso enantiomérico de 75% , mas com um tempo reacional de 6 dias (Tabela A.2, Linha 3). Muitas das biotransformações com o sulfeto (**1a**) ocorreram com conversão e excesso enantiomérico baixos para o sulfóxido (**2a**) e a sulfona (**3a**) foi formada em muitos casos (Tabela A.2).

A oxidação enzimática do sulfeto (**1a**) tem sido estudada por vários pesquisadores na área de biocatálise, dentre eles podemos citar o grupo do Prof. Dr. Herbert L. Holland⁷. A seguir, podemos destacar alguns resultados envolvendo a produção do sulfóxido (**2a**) com diferentes biocatalisadores (Tabela A.3).

Na Figura A.1. tem-se o cromatograma do (±)-(fenilmetil)sulfóxido (**2a**) e na Figura A.2. tem-se os cromatogramas da reação de oxidação enzimática do (fenilmetil) sulfeto (**1a**) com 3g dos fungo *T. byssogenum* CCB 203.

Tabela A.2. Oxidação do (fenilmetil) sulfeto (**1a**) com células úmidas de fungos Basidiomicetos.

Reaction scheme: (Phenylmethyl) sulfide (**1a**) reacts with Fungos Basidiomicetos to yield (S)-phenylmethyl sulfoxide (**3a**) and phenyl sulfoxide.

Linhas	t	c (%) (2a)	e.e. (%)	Config. Abs.	c (%) (3a)	c (%) (2a)	e.e. (%)	Config. Abs.	c (%) (3a)
#	<i>Irpex lacteus</i> CCB 196 (1g)					<i>Irpex lacteus</i> CCB 196 (3g)			
1	2	23	17	<i>S</i>	0	34	5	<i>S</i>	8
2	4	91	26	<i>S</i>	9	70	56	<i>S</i>	10
3	6	78	17	<i>S</i>	22	61	75	<i>S</i>	27
4	8	75	20	<i>S</i>	25	-	-	-	-
#	<i>Pycnoporus sanguineus</i> CCB 501 (1g)					<i>Pycnoporus sanguineus</i> CCB 501 (3g)			
5	2	82	27	<i>S</i>	6	90	36	<i>S</i>	10
6	4	82	30	<i>S</i>	18	82	40	<i>S</i>	18
7	6	76	33	<i>S</i>	24	70	41	<i>S</i>	30
8	8	67	35	<i>S</i>	33	53	42	<i>S</i>	47
#	<i>Trametes rigida</i> CCB 285 (1g)					<i>Trametes rigida</i> CCB 285 (3g)			
9	2	32	19	<i>S</i>	2	79	42	<i>S</i>	0
10	4	83	15	<i>S</i>	7	95	40	<i>S</i>	5
11	6	86	14	<i>S</i>	10	93	42	<i>S</i>	7
12	8	89	10	<i>S</i>	11	88	42	<i>S</i>	12
#	<i>Trametes versicolor</i> CCB 202 (1g)					<i>Trametes versicolor</i> CCB 202 (3g)			
13	2	59	12	<i>S</i>	4	50	10	<i>S</i>	0
14	4	74	22	<i>S</i>	5	81	12	<i>S</i>	19
15	6	86	27	<i>S</i>	10	70	22	<i>S</i>	30
16	8	87	31	<i>S</i>	13	55	25	<i>S</i>	45
#	<i>Trametes villosa</i> CCB 291 (1g)					<i>Trametes villosa</i> CCB 291 (3g)			
17	2	75	14	<i>S</i>	5	82	17	<i>S</i>	15
18	4	95	14	<i>S</i>	5	78	16	<i>S</i>	21
19	6	91	15	<i>S</i>	9	72	15	<i>S</i>	28
20	8	90	16	<i>S</i>	10	74	15	<i>S</i>	26
#	<i>Trichaptum byssogenum</i> CCB 203 (1g)					<i>Trichaptum byssogenum</i> CCB 203 (3g)			
21	2	28	6	<i>S</i>	0	28	12	<i>S</i>	0
22	4	67	21	<i>S</i>	30	92	47	<i>S</i>	3
23	6	27	11	<i>S</i>	70	92	59	<i>S</i>	8
24	8	27	6	<i>S</i>	71	86	75	<i>S</i>	14

t: tempo (dias); c: conversão determinada por CG; e.e. excesso enantiomérico; Config. Abs.: Configuração Absoluta.

Figura A.1. Cromatograma do (±)-(fenilmetil) sulfóxido (2a).

Figura A.2. Cromatogramas da reação de oxidação enzimática do (fenilmetil) sulfeto (1a) com 3g de células úmidas de *T.byssogenum* CCB 203.

Tabela A.3. Exemplos de oxidação de (fenilalquil) sulfetos **1a-4a** com biocatalisadores reportados na literatura.

Biocatalisadores	(fenilmetil) sulfeto (1a)				(feniletil) sulfeto (2a)				(fenilpropil) sulfeto (3a)				(fenilalil) sulfeto (4a)			
	Rend (%) ^a	e.e. (%)	C. A	Ref.	Rend (%) ^a	e.e. (%)	C. A	Ref.	Rend (%) ^a	e.e. (%)	C. A	Ref.	Rend (%) ^a	e.e. (%)	C. A	Ref.
Enzimas isoladas																
Microperoxidase (MP-11)	15 ^b	36	<i>S</i>	[9]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lignina Peroxidase (LiP)	15	37	<i>S</i>	[10]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciclohexanone Monooxygenase (CMO)	88	99	<i>R</i>	[8]	86	47	<i>R</i>	[8]	54	68	<i>S</i>	[8]	-	-	-	-
Cloroperoxidase (CPO)	100	99	<i>R</i>	[8]	83	99	<i>R</i>	[8]	3	27	<i>R</i>	[8]	-	-	-	-
Horseradish peroxidase (HRP)	-	77	<i>S</i>	[11]	-	35	<i>S</i>	[11]	-	12	<i>S</i>	[11]	-	-	-	-
2,5-DKCMO	9 ^c	35	<i>S</i>	[12]	5 ^c	2	<i>R</i>	[12]	8 ^c	8	<i>R</i>	[12]	-	-	-	-
3,6-DKCMO	53 ^c	9	<i>S</i>	[12]	35 ^c	0	-	[12]	20 ^c	19	<i>S</i>	[12]	-	-	-	-
Fungos																
<i>Aspergillus terreus</i>	24	95	<i>S</i>	[4]	76	99	<i>S</i>	[4]	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Helminthosporium sp</i>	30	48	<i>S</i>	[13]	40	84	<i>S</i>	[13]	57	33	<i>S</i>	[13]	-	-	-	-
<i>Mortierella isabelina</i>	65	58	<i>R</i>	[7]	40	86	<i>R</i>	[7]	52	100	<i>R</i>	[7]	-	-	-	-
Bactérias																
<i>Pseudomonas sp</i>	-	100	<i>S</i>	[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter</i>	-	99	<i>R</i>	[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Corynebacterium equi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	56	99	<i>R</i>	[17]
<i>Pseudomonas putida</i>	90	>98	<i>R</i>	[15]	64	>98	<i>R</i>	[15]	5	>98	<i>R</i>	[15]	-	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	33	91	<i>S</i>	[15]	27	84	<i>S</i>	[15]	33	86	<i>R</i>	[15]	-	-	-	-
Leveduras																
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30	60	<i>R</i>	[16]	2	12	<i>R</i>	[15]	-	-	-	-	-	-	-	-

^arendimento isolado; ^bdeterminado por RMN ¹H; ^cdeterminado por CG ou CLAE; e.e.: excesso enantiomérico; C.A.:

Configuração Absoluta; Ref.: Referências; DKCMO: Diketocamphone Monooxygenase.

A.3.1.2. (Feniletil) sulfeto (1b).

Como pode ser observado na Tabela A.4 (pg.41), as reações de oxidação do sulfeto (**1b**) ocorreram com boas conversões e diferentes seletividades para os sulfóxidos formados. Os melhores resultados na oxidação enzimática do (feniletil) sulfeto (**1b**) foram obtidos com o fungo *P. sanguineus* CCB 501. Entretanto, ocorreram resultados diferentes variando apenas a quantidade de células úmidas deste fungo. Pode-se destacar que utilizando apenas 1g de células úmidas de *P. sanguineus* CCB 501 produziu o (-)-(S)-(feniletil) sulfóxido (**2a**) em 63% de excesso enantiomérico após 1 dia de reação (Tabela A.4, Linha 5). Ao estendermos o tempo de reação para 8 dias o excesso enantiomérico aumentou para >99% (Tabela A.4, Linha 8, Figura A.4). Quando realizou-se a oxidação enzimática do sulfeto (**1b**) com 3g de células úmidas de *P. sanguineus* CCB 501 produziu o (S)-sulfóxido (**2b**) em 90% de excesso enantiomérico após 4 dias de reação e ao estendermos este tempo para 8 dias o excesso enantiomérico aumentou para >99% (Tabela A.4, Linhas 5-8).

Com base nestes resultados, realizou-se a reação do sulfeto (**1b**) em escala semi-preparativa, tendo como base o estudo utilizando 3g de células úmidas do fungo *P. sanguineus* CCB 501 e o (S)-sulfóxido (**2b**) foi obtido em 35% de rendimento e 80% de excesso enantiomérico em 3 dias de tempo reacional.

Como já mencionamos anteriormente, este baixo rendimento isolado do (S)-sulfóxido (**2b**), deve-se principalmente a dificuldade de realizar a extração de sulfóxidos em geral de meio aquoso, uma vez que esta classe de compostos são higroscópios e, além disso, o decréscimo na enantioseletividade deve-se ao procedimento experimental adotado.

Pode-se observar também na Tabela A.4 que utilizando 1g de células úmidas dos fungos *T. villosa* CCB 291, *I. lacteus* CCB 196, *T. rigida* CCB 285 e *T. versicolor* CCB 202 obteve-se uma maior conversão do sulfeto (**1b**) para o sulfóxido (**2b**) e menor produção de sulfona (**3b**), comparando-se com o uso de 3g dos respectivos fungos. Através destes resultados pode-se verificar a importância de se realizar previamente uma triagem para as reações de biotransformação, uma vez que resultados distintos são obtidos de acordo com a metodologia empregada.

Adiante, será discutida a resolução cinética dos sulfóxidos (Seção A.5.) e vamos observar que existe além da oxidação do sulfeto uma reação de resolução cinética do sulfóxido.

Isto explica o aumento do excesso enantiomérico, em alguns casos, com o decorrer do tempo reacional (Tabela A.4).

A oxidação enzimática do sulfeto (**1b**) tem sido estudada por biocatálise, utilizando-se diversas fontes enzimáticas como microorganismos^{4,7,13,14} e enzimas isoladas^{8,9,10,11}. Podemos observar que o emprego de células de microorganismos ainda é a que apresenta melhor resultado na obtenção de sulfóxidos com boa seletividade (Tabela A.3).

Na Figura A.3. tem-se o cromatograma obtido para o ($\pm$)-(feniletil) sulfóxido (**2b**) e na Figura A.4 tem-se os cromatogramas da reação de oxidação enzimática do (feniletil) sulfeto (**1b**) com 1g de células úmidas de *P. sanguineus* CCB 501.

Tabela A.4. Oxidação do (feniletil) sulfeto (**1b**) com células úmidas de fungos Basidiomicetos.

Linhas	t	c (%) (2b)	e.e. (%)	Config. Abs	c (%) (3b)	c (%) (2b)	e.e. (%)	Config. Abs.	c (%) (3b)
#	<i>Irpex lacteus</i> CCB 196 (1g)					<i>Irpex lacteus</i> CCB 196 (3g)			
1	2	72	25	<i>S</i>	0	82	30	<i>S</i>	6
2	4	92	26	<i>S</i>	7	85	33	<i>S</i>	14
3	6	80	35	<i>S</i>	20	76	33	<i>S</i>	23
4	8	72	40	<i>S</i>	28	49	32	<i>S</i>	51
#	<i>Pycnoporus sanguineus</i> CCB 501 (1g)					<i>Pycnoporus sanguineus</i> CCB 501 (3g)			
5	2	83	63	<i>S</i>	17	51	44	<i>S</i>	0
6	4	60	83	<i>S</i>	40	92	90	<i>S</i>	8
7	6	59	94	<i>S</i>	41	88	>98	<i>S</i>	11
8	8	52	>99	<i>S</i>	48	86	>99	<i>S</i>	14
#	<i>Trametes rigida</i> CCB 285 (1g)					<i>Trametes rigida</i> CCB 285 (3g)			
9	2	37	7	<i>S</i>	0	81	50	<i>S</i>	18
10	4	88	15	<i>S</i>	9	62	63	<i>S</i>	38
11	6	92	14	<i>S</i>	8	70	55	<i>S</i>	30
12	8	88	19	<i>S</i>	12	63	53	<i>S</i>	37
#	<i>Trametes versicolor</i> CCB 202 (1g)					<i>Trametes versicolor</i> CCB 202 (3g)			
13	2	92	70	<i>S</i>	5	90	70	<i>S</i>	10
14	4	90	73	<i>S</i>	10	86	72	<i>S</i>	14
15	6	70	75	<i>S</i>	30	54	73	<i>S</i>	46
16	8	56	77	<i>S</i>	44	40	73	<i>S</i>	60
#	<i>Trametes villosa</i> CCB 291 (1g)					<i>Trametes villosa</i> CCB 291 (3g)			
17	2	90	31	<i>S</i>	3	79	51	<i>S</i>	21
18	4	96	32	<i>S</i>	4	77	51	<i>S</i>	23
19	6	94	32	<i>S</i>	6	57	52	<i>S</i>	43
20	8	94	35	<i>S</i>	6	46	52	<i>S</i>	54
#	<i>Trichaptum byssogenum</i> CCB 203 (1g)					<i>Trichaptum byssogenum</i> CCB 203 (3g)			
21	2	81	-	<i>S</i>	2	49	30	<i>S</i>	0
22	4	89	30	<i>S</i>	11	86	36	<i>S</i>	9
23	6	33	64	<i>S</i>	67	76	47	<i>S</i>	24
24	8	26	80	<i>S</i>	74	-	-	-	-

t: tempo (dias); c: conversão determinada por CG; e.e. excesso enantiomérico; Config. Abs.: Configuração Absoluta.

Figura A.3. Cromatograma obtido para o (±)-(feniletil) sulfóxido (**2b**).

Figura A.4. Cromatogramas da reação de oxidação enzimática do (feniletil) sulfeto (**1b**) com 1g de células úmidas de *P. sanguineus* CCB 501.

A.3.1.3. (Fenilpropil) sulfeto (1c).

Os melhores resultados dos estudos de oxidação enzimática de (fenilalquil) sulfetos com fungos Basidiomicetos foram obtidos com o (fenilpropil) sulfeto (**1c**). O (-)-(S) sulfóxido (**2c**) foi obtido com elevado excesso enantiomérico (e.e. >99%) e conversão (37%-100%) com todos os fungos Basidiomicetos utilizados (Tabela A.5). Pode-se observar também que utilizando 1 g de células integras dos fungos *P. sanguineus* CCB 501, *T. villosa* CCB 291 e *T. rigida* CCB 285, obteve-se maior conversão em sulfóxido (**2c**) e menor conversão em sulfona (**3c**), comparando-se o uso com 3g dos respectivos fungos.

Quando realizou-se a reação em escala semi-preparativa com *T. byssogenum* CCB 203 o (S)-sulfóxido (**2c**) foi obtido em 34 % de rendimento e excesso enantiomérico de >99% em 3 dias de reação.

Com base nos resultados, obtidos na oxidação dos (arilalquil) sulfetos podemos sugerir que a medida que aumenta a cadeia carbônica do grupo R ligado ao átomo de enxofre (R = Metila<Etila<Propila), ocorre um aumento na estereosseletividade do sulfóxido formado. Além disso, podemos sugerir que existe uma relação direta entre o volume do grupo R ligado ao átomo de enxofre e o sítio ativo das enzimas dos fungos Basidiomicetos estudados, uma vez que a produção do (fenilmetil) sulfóxido (**2a**), através da oxidação enzimática com células úmidas de todos os fungos Basidiomicetos, ocorreu com baixa enantiosseletividade (Tabela A.2), com o (feniletil) sulfóxido (**2b**) ocorreu um aumento na enantiosseletividade em alguns casos (Tabela A.4) e com o (fenilpropil) sulfóxido (**2c**), que apresenta o grupo R mais volumoso, observou-se uma elevada enantiosseletividade (>99%) com todos os fungos Basidiomicetos (Tabela 6). Esta observação pode ser análoga ao modelo da caixa proposto por Holland⁷, quando estudou uma série de (arilalquil) sulfóxidos obtidos sob a ação enzimática dos fungos *Heminthosporium sp* e *Mortierella isabellina*. Baseando-se neste estudo, pode-se supor que os fungos Basidiomicetos utilizados neste estudo, apresentam um modelo para sulfoxidação quiral semelhante a do fungo *Helminthosporium*, uma vez que os sulfóxidos obtidos por ação enzimática destes fungos também apresentam configuração absoluta (S). A oxidação enzimática do sulfeto (**1c**) com vários biocatalisadores (como por exemplo: fungos, bactérias, enzimas isoladas) também tem sido estudada por vários pesquisadores.

A seguir, podemos destacar alguns resultados envolvendo a biotransformação deste sulfeto no seu respectivo sulfóxido (Tabela A.3).

Na Figura A.5. tem-se o cromatograma para ($\pm$)-(fenilpropil) sulfóxido (**2c**) e a Figura A.6. tem-se os cromatogramas da reação de oxidação enzimática do (fenilpropil) sulfeto (**1c**) com 3g do fungo *T. byssogenum* CCB 203.

Tabela A.5. Oxidação do (fenilpropil) sulfeto (**1c**) com células úmidas de fungos Basidiomicetos.

Linhas	t	c (%) (2c)	e.e. (%)	Config. Abs.	c (%) (3c)	c (%) (2c)	e.e. (%)	Config. Abs.	c (%) (3c)
#	<i>Irpex lacteus</i> CCB 196 (1g)					<i>Irpex lacteus</i> CCB 196 (3g)			
1	2	56	63	<i>S</i>	-	88	86	<i>S</i>	8
2	-	-	-	-	-	88	86	<i>S</i>	11
3	6	94	75	<i>S</i>	6	79	86	<i>S</i>	21
4	8	89	>99	<i>S</i>	11	77	86	<i>S</i>	23
#	<i>Pycnoporus sanguineus</i> CCB 501 (1g)					<i>Pycnoporus sanguineus</i> CCB 501 (3g)			
5	2	100	11	<i>S</i>	0	88	15	<i>S</i>	10
6	4	73	13	<i>S</i>	7	68	44	<i>S</i>	32
7	6	52	80	<i>S</i>	48	43	>99	<i>S</i>	56
8	8	46	>99	<i>S</i>	54	37	>99	<i>S</i>	63
#	<i>Trametes rigida</i> CCB 285 (1g)					<i>Trametes rigida</i> CCB 285 (3g)			
9	2	95	95	<i>S</i>	-	90	90	<i>S</i>	5
10	4	96	95	<i>S</i>	4	92	91	<i>S</i>	10
11	6	94	92	<i>S</i>	6	85	86	<i>S</i>	15
12	8	94	92	<i>S</i>	6	87	88	<i>S</i>	13
#	<i>Trametes versicolor</i> CCB 202 (1g)					<i>Trametes versicolor</i> CCB 202 (3g)			
13	2	75	>99	<i>S</i>	-	91	>99	<i>S</i>	9
14	4	95	>99	<i>S</i>	5	87	>99	<i>S</i>	13
15	6	86	>99	<i>S</i>	14	87	>99	<i>S</i>	13
16	8	78	>99	<i>S</i>	22	84	>99	<i>S</i>	16
#	<i>Trametes villosa</i> CCB 291 (1g)					<i>Trametes villosa</i> CCB 291 (3g)			
17	2	89	92	<i>S</i>	7	60	>99	<i>S</i>	40
18	4	93	92	<i>S</i>	7	57	>99	<i>S</i>	43
19	6	93	94	<i>S</i>	7	48	>99	<i>S</i>	51
20	8	92	>99	<i>S</i>	8	48	>99	<i>S</i>	51
#	<i>Trichaptum byssogenum</i> CCB 203 (1g)					<i>Trichaptum byssogenum</i> CCB 203 (3g)			
21	2	94	>99	<i>S</i>	3	90	>99	<i>S</i>	4
22	4	93	>99	<i>S</i>	5	94	>99	<i>S</i>	4
23	6	93	>99	<i>S</i>	5	94	>99	<i>S</i>	4
24	8	94	>99	<i>S</i>	6	96	>99	<i>S</i>	4

t: tempo (dias); c: conversão determinada por CG; e.e. excesso enantiomérico; Config. Abs.: Configuração Absoluta.

Figura A.5. Cromatograma obtido para o (±)-(fenilpropil) sulfóxido (2c).

Figura A.6. Cromatogramas da reação de oxidação enzimática do (fenilpropil) sulfeto (1c) com 3g de células úmidas de *T. frygossu* CCB 203.

A.3.1.4. (Fenilalil) sulfeto (1d).

A reação de oxidação do (fenilalil) sulfeto (**1d**) com fungos Basidiomicetos ocorreu com elevada conversão (82-97%) (Tabela A.6). Entretanto o (fenilalil) sulfóxido (**2d**) enantiomericamente puro ou enriquecido, com base nos estudos da literatura¹⁸, sofre uma reação de racemização térmica (50°C-70°C). Esta racemização térmica foi demonstrada através de estudos cinéticos e além disso, comprovou-se que ocorre através de um rearranjo sigmatrópico [2,3] reversível e totalmente concertado, o qual irá produzir sulfinatos alílicos aquirais (Figura A.7). Por causa deste motivo, não foi possível determinar a enantiosseletividade do sulfóxido (**2d**) obtido da oxidação enzimática com células úmidas de fungos Basidiomicetos (Tabela A.6), através do uso da técnica de cromatografia gasosa.

Preliminarmente, os (fenilalil) sulfóxidos (**2d**) obtidos da oxidação enzimática do (±)-sulfeto (**1d**) com todos os fungos Basidiomicetos apresentaram configuração absoluta *S*, uma vez que os seus valores de rotação óptica medidos $[\alpha]_D$ foram comparados com os da literatura¹⁷ (Parte Experimental). Devido aos baixos valores obtidos e calculados para a rotação óptica evidenciou-se que não estava ocorrendo uma seletividade na obtenção do sulfóxido alílico pelos fungos Basidiomicetos.

Figura A.7. Interconversão dos enantiômeros $R \rightleftharpoons S$ do (fenilalil)sulfóxido

Buscando alternativas para determinar a enantiosseletividade deste composto frente aos fungos Basidiomicetos estudados, nós utilizamos a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em colaboração com a Prof.Dra.Quézia B. Cass, da Universidade Federal de São Carlos.

Devemos destacar que estas análises por CLAE, não foram realizadas pelo nosso laboratório e sim na Universidade Federal de São Carlos.

Tabela A.6. Oxidação do (fenilalil) sulfeto (**1d**) com células úmidas de fungos Basidiomicetos.

Linhas	t	c (%) (2d)	c (%) (3d)	Config. Abs.	c (%) (2d)	c (%) (3d)	Config. Abs.
#	#	<i>Irpex lacteus</i> CCB 196 (1g)			<i>Irpex lacteus</i> CCB 196 (3g)		
1	2	71	3	<i>S</i>	36	1	<i>S</i>
2	4	93	4	<i>S</i>	92	4	<i>S</i>
3	6	92	6	<i>S</i>	86	12	<i>S</i>
4	8	91	7	<i>S</i>	75	23	<i>S</i>
#	#	<i>Pycnoporus sanguineus</i> CCB 501 (1g)			<i>Pycnoporus sanguineus</i> CCB 501 (3g)		
5	2	83	2	<i>S</i>	57	0	<i>S</i>
6	4	96	3	<i>S</i>	77	4	<i>S</i>
7	6	94	6	<i>S</i>	91	9	<i>S</i>
8	8	89	11	<i>S</i>	86	14	<i>S</i>
#	#	<i>Trametes rigida</i> CCB 285 (1g)			<i>Trametes rigida</i> CCB 285 (3g)		
9	2	4	0	<i>S</i>	18	0	<i>S</i>
10	4	85	0	<i>S</i>	68	0	<i>S</i>
11	6	96	1	<i>S</i>	97	0	<i>S</i>
12	8	93	7	<i>S</i>	94	6	<i>S</i>
#	#	<i>Trametes versicolor</i> CCB 202 (1g)			<i>Trametes versicolor</i> CCB 202 (3g)		
13	2	52	0	Nd	95	0	nd
14	4	94	0	Nd	95	3	nd
15	6	95	5	Nd	95	5	nd
16	8	82	18	Nd	92	8	nd
#	#	<i>Trametes villosa</i> CCB 291 (1g)			<i>Trametes villosa</i> CCB 291 (3g)		
17	2	60	0	<i>S</i>	66	2	<i>S</i>
18	4	75	4	<i>S</i>	82	6	<i>S</i>
19	6	89	13	<i>S</i>	79	15	<i>S</i>
20	8	79	21	<i>S</i>	72	28	<i>S</i>
#	#	<i>Trichaptum byssogenum</i> CCB 203 (1g)			<i>Trichaptum byssogenum</i> CCB 203 (3g)		
21	2	54	0	<i>S</i>	17	0	<i>S</i>
22	4	66	0	<i>S</i>	42	0	<i>S</i>
23	6	88	8	<i>S</i>	79	3	<i>S</i>
24	8	85	14	<i>S</i>	83	11	<i>S</i>

t: tempo (dias); c: conversão determinada por CG; Config. Abs.: Configuração Absoluta. nd: não determinada.

A.4. Resultados obtidos utilizando CLAE.

A.4.1. Avaliação da resolução enantiomérica dos compostos nas colunas quirais de antibiótico.

Foram avaliadas quatro colunas quirais: CHIROBIOTIC V[®], CHIROBIOTIC R[®], CHIROBIOTIC T[®], CHIROBIOTIC TAG[®], comercializadas pela Astec (Whippany, N.J.EUA), as quais possuem como seletor quiral os glicopeptídeos macrocíclicos: vancomicina, ristocetina A, teicoplanina e teicoplanina aglicona, respectivamente.

Como fase móvel para o modo normal investigado foi empregada uma mistura de Hex/EtOH (80:20 v/v).

É válido ressaltar que a coluna CHIROBIOTIC V[®] não apresentou discriminação quiral para nenhum dos compostos investigados.

A.4.2. Cromatogramas e parâmetros cromatográficos referentes a melhor enantiorresolução obtida.

Condições cromatográficas para a separação dos enantiômeros do (±)-(fenilalil)sulfóxido (2d) (Figura A.8).

Fase estacionária: CHIROBIOTIC R

Fase móvel: hexano/etanol 80:20.

Fluxo: 0,5 mL/min.

Comprimento de onda : 254 nm

Figura A.8. Cromatograma obtido para a separação dos enantiômeros do (±)-(fenilalil)sulfóxido (**2d**) por CLAE.

Nestas condições experimentais, realizou-se a análise das amostras do (fenilalil)sulfóxido (**2d**) com os fungos Basidiomicetos em 3 dias de tempo reacional (Tabela A.7).

Tabela A.7. Resultados da enantioseletividade do (fenilalil) sulfóxido (**2d**) realizado por CLAE sob ação enzimática dos fungos Basidiomicetos.

Fungos Basidiomicetos	Dias	k1	k2	Área 1	Área 2	e.e.(%) (2d)
<i>Trametes rigida</i> CCB 285	3	3,95	4,46	52,36	47,64	5
<i>Trichaptum byssogenum</i> CCB 203	3	4,05	4,57	51,82	48,18	3
<i>Trametes versicolor</i> CCB 202	3	3,95	4,44	53,59	46,41	7
<i>Trametes villosa</i> CCB 291	3	3,92	4,42	52,81	47,19	5
<i>Irpex lacteus</i> CCB 196	3	3,82	4,27	54,45	42,12	12

Como pode ser observado, a reação ocorreu com modestas seletividades. Onde o melhor resultado na oxidação enzimática do (fenilalil) sulfeto (**1d**) foi obtida com o fungo *I. lacteus* CCB 196 (Tabela A.7, Figura A.9), mas neste caso, detectou-se uma impureza

que estava colidindo com o (*R*)- enantiomero. Entretanto, ainda com objetivo de obter o (fenilalil) sulfóxido (**2d**) com maior pureza enantiomérica, realizamos um estudo com fungos da classe dos Hypomicetos, os quais já apresentaram bons resultados na oxidação de diversos compostos no nosso laboratório¹⁹.

Figura A.9. Cromatograma do (fenilalil) sulfóxido (**2d**) obtido da oxidação enzimática do sulfeto (**1d**) com 3 g de células úmidas de *I. lacteus* CCB 196.

Os 5 fungos da classe dos Hypomicetos utilizados neste estudo foram: *Aspergillus terreus* CCT 3320, *Emmericella nidulans* CCT 3119, *Aspergillus niger* CCT 1078, *Aspergillus foetidus* CCT 2683, *Aspergillus terreus* CCT 3571. As reações de oxidação enzimática do sulfeto (**1d**) envolvendo estes fungos Hypomicetos foram realizadas com o mesmo procedimento experimental que no caso dos fungos Basidiomicetos, a única diferença foi o tempo de crescimento dos fungos (Parte Experimental).

Nos cromatogramas a seguir podemos observar que os sulfóxidos (**2d**) também foram obtidos com pouca ou nenhuma seletividade (Figura A.10). E então com base nestes

resultados, infelizmente não conseguimos obter até o momento este sulfóxido com alta enantiosseletividade, mesmo utilizando classes diferentes de fungos.

Figura A.10. Cromatogramas do (fenilalil) sulfóxido (2d) obtido da oxidação enzimática do sulfeto (1d) com 3g de células úmidas dos seguintes fungos: **a)** *Aspergillus terreus* CCT 3320; **b)** *Aspergillus niger* CCT 1078; **c)** *Emericella nidulans* CCT 3119; **d)** *Aspergillus terreus* CCT 3571.

A.5. Resolução cinética dos sulfóxidos (2b) e (2c).

Em muitos casos, mostrados anteriormente, a oxidação de sulfóxidos a sulfonas não foi detectada em curto espaço de tempo (24-48 h), porém as oxidações dos sulfetos pró-quirais **1a-d** por fungos Basidiomicetos produziram os (*S*)-sulfóxidos **2a-d** em todos os casos (Tabelas A.2, A.4, A.5 e A.6). Entretanto, quando se empregou células úmidas do fungo *P. sanguineus* CCB 501 na oxidação enzimática do sulfeto (**1b**), obteve-se um comportamento reacional análogo ao observado na oxidação enzimática do sulfeto (**1c**), ou seja, obteve-se uma baixa enantiosseletividade (α) no estágio inicial da reação e alta no final da mesma (Tabela A.4 e A.6). Contudo, este comportamento é incoerente com a definição de seletividade (α), a qual é constante ao longo de uma reação enzimática. Entretanto, para reações enzimáticas que se desenvolvem em duas etapas, a enantiosseletividade da reação depende das quatro constantes de velocidades, k_1 , k_2 , k_3 , k_4 ²⁰. Como geralmente as enzimas demonstram uma preferência por grupos de mesma quiralidade, sugeriu-se que $k_1 > k_2$ (preferência pelo par de elétrons pró-*S*) e $k_4 > k_3$. Consequentemente, o excesso enantiomérico mais elevado em tempo reacional mais longo deve-se à formação preferencial de (-)-(*S*)-(**2b**) e (-)-(*S*)-(**2c**) associada à maior velocidade de oxidação de (+)-(*R*)- (**2b**) e (+)-(*R*)-(**2c**) (Esquema A.4).

Esquema A.4. Resolução cinética dos sulfóxidos (**2b**) e (**2c**) por células úmidas de fungos *P. sanguineus* CCB 501.

A comprovação de uma resolução cinética eficiente, na segunda etapa reacional da oxidação de **(2b)** e **(2c)**, foi constatada submetendo-se uma alíquota dos sulfóxidos racêmicos **(2b)** e **(2c)** sob a ação enzimática de células úmidas em repouso do fungo *P. sanguineus* CCB 501 onde 50% do sulfóxido (*R*)-**(2b)** e **(2c)** transformou-se em sulfona **(3b)** e **(3c)**, enquanto o sulfóxido (*S*)-**(2b)** e **(2c)** também foi transformado para sulfona, mas com uma velocidade menor (Tabela A.8, Figura A.11). Portanto, com estes resultados conseguimos observar que nestes sistemas ocorre uma oxidação enzimática seguida de uma resolução cinética eficiente. Portanto, podemos concluir que nos casos onde foram obtidos baixos valores de excessos enantioméricos dos sulfóxidos é porque ainda não havia ocorrido a segunda reação que seria a resolução cinética do sulfóxido formado.

Tabela A.11. Resolução cinética dos sulfóxidos **(2b)** e **(2c)**.

Linhas	t	c (%) (2b)	e.e. (%)	Config. Abs.	c (%) (3b)	c (%) (2c)	e.e. (%)	Config. Abs.	c (%) (3c)
#		(feniletil) sulfóxido (2b)				(fenilpropil) sulfóxido (2c)			
1	2	78	12	<i>S</i>	22	59	26	<i>S</i>	41
2	4	56	30	<i>S</i>	44	38	84	<i>S</i>	62
3	6	37	55	<i>S</i>	63	32	>99	<i>S</i>	68
4	8	34	86	<i>S</i>	66	28	>99	<i>S</i>	72
5	10	32	>99	<i>S</i>	68	-	-	-	-

t: tempo (dias); c: conversão determinada por CG; e.e. excesso enantiomérico; Config. Abs.: Configuração Absoluta.

Figura A.11. Cromatogramas obtidos para a resolução cinética do (±)-(fenilpropil) sulfóxido (**2c**) com 3g de células úmidas de *T. byssogenum* CCB 203.

Comportamento similar a estes demonstrados acima, foi observado na oxidação enzimática do (feniletil) sulfeto (**1b**) com células úmida de *A. terreus* CCT 3320, ou seja, obteve-se baixa enantiosseletividade (α) no estágio inicial da reação e alta no final da mesma²⁰.

A.6. Conclusão

Neste trabalho nós concluímos que as células úmidas de fungos Basidiomicetos oxidam eficientemente (arilalquil) sulfetos (**1a-d**) para os respectivos sulfóxidos (**2a-d**) com boa conversão e elevados excessos enantioméricos, entretanto os fungos que apresentaram melhores resultados foram *Pycnoporus sanguineus* CCB 501 e *Trichaptum byssogenum* CCB 203.

O (fenilalil) sulfóxido (**2d**) foi obtido com boa conversão em um curto espaço de tempo, mas não houve nenhuma seletividade sob ação enzimática dos fungos utilizados.

A subsequente oxidação de sulfóxidos à sulfonas foi comprovada através de uma eficiente resolução cinética dos sulfóxidos (**2b**) e (**2c**). Além disso, demonstramos também a presença de enzimas extracelulares de fungos Basidiomicetos no meio de cultura, as quais promoveram a oxidação dos sulfetos (**1a-d**), porém sem seletividade.

Na literatura³² existem trabalhos envolvendo oxidação enantiosseletiva de sulfetos pró-quirais através da biocatálise, mas com um número restrito de microrganismos, sendo os mais utilizados os fungos *Helminthosporium* sp e *Mortierella isabelina*. Este trabalho foi importante pois utilizou-se fungos Basidiomicetos Brasileiros, os quais não tinham sido empregados para este fim até o momento. Devemos salientar também, que este estudo de oxidação microbiológica com microrganismos brasileiros é muito importante tendo em vista a rica biodiversidade brasileira e a disponibilidade de novas linhagens, tanto de fungos quanto de outras fontes de enzimas.

A.7. Bibliografía

1. Mata, E. G. *Phosphorus, Sulfur and Silicon*. **1996**, 117, 231.
2. Carreño, M. C. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 1717.
3. Fernández, I.; Khier, N. *Chem. Rev.* **2003**, 103, 3651.
4. Porto, A. L. M.; Cassiola, F.; Dias, S. L. P.; Joekes, I.; Guchiken, Y.; Rodrigues, J. A. R.; Moran, P. J. S.; Manfio, G. P.; Marsioli, A. J. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*. **2002**, 19-20, 327.
5. Hofrichter, M.; *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, 30, 454.

6. (a) Shin, K-S.; Lee, Y-J. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, 384, 109. (b) Yaver, D. S.; Golightly, E. J. *Gene.* **1996**, 181, 95.
7. Holland, H.L.; Pöpperl, H.; Ninniss, R. W.; Chenchiah, P. C. *Can. J. Chem.* **1985**, 63, 1118.
8. Holland, H. L.; *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 171.
9. Kadnikova, E. N.; Kostic, N. M.; *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 2600.
10. Baciocchi, E.; Gerini, M. F.; Harvey, P. J.; Lanzaunga, O.; Mancinelli, S. *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 2705.
11. Ozaki, S-I.; Montellani, P. R. O. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 7056.
12. Beecher, J.; Willets, A. *Tetrahedron: Asymmetry.* **1998**, 9, 1899.
13. Holland, H. L.; Brown, F. M.; Lakshmaiah G.; Larsen B. G.; Patel, M.; *Tetrahedron: Asymmetry.* **1997**, 8, 683.
14. Kelly, D. R.; Knowles, C. J.; Mahdi, J. G.; Taylor, I. N.; Wright, M. A. *Tetrahedron: Asymmetry.* **1996**, 7, 365.
15. Beecher, J.; Richardson, P.; Roberts, S.; Willetts, A. *Biotechnol. Lett.* **1995**, 17, 1069.
16. Boyd, D. R.; Sharma, N.; Haughey, S. A.; Kennedy, M. A.; McMurray, B. T.; Sheldrake, G. N.; Allen, C. C. R.; Dalton, H.; Sproule, K. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1998**, 1, 1929.
17. Ohta, H.; Okamoto, Y.; Tsuchihashi, G-i. *Agric. Biol. Chem.* **1985**, 49, 2229.
18. Gasparri, F.; Misisti, D.; Villani, C. *J. Chromatog. A.* **1995**, 694, 163.
19. Andrade, L. H.; Omori, A. T.; Porto, A. L. M.; Comasseto, J. V. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* **2004**, 29, 47.
20. Porto, A. L. M e Marsaioli, A. J. Tese de Doutorado, **2002**, Unicamp.

Resultados e Discussão

Parte B.

A Parte B do Resultado e Discussão desta dissertação foi realizada em colaboração com o aluno de Mestrado Artur Franz Keppler, o qual já realizou sua defesa no dia 08/04/2005. Os resultados apresentados nesta seção mostram apenas o início de um trabalho que se encontra em andamento no laboratório por outros alunos.

B - Síntese e transformações microbiológicas de moléculas bi-funcionalizadas.

Em diversas rotas sintéticas nos deparamos com blocos de construção que contém grupos funcionais que devem ser preservados. Usualmente são utilizadas etapas de proteção desses grupos para depois promover a transformação em outra parte da molécula e com isso, ocorre perda de tempo e muitas vezes de rendimento global. Afim de diminuir o número de etapas reacionais, as enzimas apresentam-se como uma alternativa interessante.

Além da estereosseletividade, estes catalisadores naturais podem apresentar um ótimo potencial quimiosseletivo e como esta característica é muito pouco explorada, o estudo sistemático de microrganismos que apresentem enzimas com potencial para promover este tipo de reações tende a crescer rapidamente nos próximos anos.

Conforme o levantamento feito por van Berkel¹, as enzimas CHMO, CPMO e HAPMO além de oxidar cetonas podem também oxidar sulfetos, levando a sulfóxidos (Tabela B.1). Além disso, esse trabalho mostra que essas enzimas não diferenciam o grupo carbonila do grupo sulfeto, oxidando ambos indistintamente.

Tabela B.1. Oxidação de sulfetos arílicos por diferentes monoxigenases.

mono-oxygenases

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

HAPMO: 4-Hidroxiacetofenona monoxigenase; CHMO: ciclohexanona monoxigenase; CPMO: ciclopentanona monoxigenase; e.e. excesso enantiomérico.

Nosso grupo vem desenvolvendo nos últimos anos, vários estudos na área de biocatálise, como por exemplo, realizações de triagens de microrganismos para detectar a presença de enzimas oxidorreduções em microrganismos Brasileiros^{2,4}. Nestes casos, podemos mencionar as reações de desracemização³, oxidação de sulfetos² e cetonas⁴ utilizando-se células de fungos em substratos com estruturas simples.

Com a finalidade de aplicar a biocatálise em moléculas mais complexas, no que diz respeito à presença de vários centros quimiosseletivos, iniciamos um estudo visando a oxidação de sulfetos e selenetos, redução de carbonilas de cetonas e a oxidação de álcoois presentes numa mesma molécula. Devemos mencionar que o estudo biocatalítico em moléculas com mais de um centro quimiosseletivo, proporciona uma maior probabilidade de se obter vários produtos, uma vez que as células íntegras dos fungos utilizados apresentam uma grande variedade de enzimas.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

B.1. Triagem dos microrganismos.

Como já foi mencionado, este trabalho teve como objetivo promover biotransformações em moléculas bi-funcionalizadas, as quais contêm grupos carbonila e selênio ou carbonila e sulfeto em suas estruturas. Neste estudo, pretendemos avaliar o potencial quimiosseletivo dos fungos Hypomicetos e Basidiomicetos frente a estas moléculas.

A utilização destes tipos de microrganismos é a mais recomendada, pois já avaliamos as enzimas destes microrganismos e detectamos que são bastante promissoras frente às monoxigenases para as oxidações de cetonas (Baeyer-Villiger) e sulfetos. O estudo da oxidação de cetonas utilizando fungos Hypomicetos (*Aspergillus* sp) foi concluída pelo aluno de mestrado Artur Franz Keppler⁴ e o de oxidação de sulfetos concluída por nós (Parte A - Resultados e Discussão).

Como já estudamos a ação enzimática dos fungos Basidiomicetos frente à oxidação de sulfetos pró-quirais, precisava-se averiguar a ação enzimática destes fungos frente às oxidações de Baeyer-Villiger. Para isso, selecionamos quatro fungos Basidiomicetos que apresentaram melhores resultados na oxidação de sulfetos (Parte A, Resultados e Discussão), são eles: *T. versicolor* CCB 202, *T. rigida* CCB 285, *I. lacteus* CCB 196 e *P. sanguineus* CCB 501. Selecionados os melhores biocatalisadores, utilizamos as cetonas

cíclicas (**4a**) e (**4b**) como substratos modelos para determinar a presença de possíveis CHMO e CPMO nos microrganismos citados.

As reações destes microrganismos com as cetonas cíclicas (**4a**) e (**4b**), foram monitoradas por um período de 7 dias e os resultados das análises cromatográficas das alíquotas estão apresentadas na Tabela B.2.

Tabela B.2. Biotransformação das cetonas (**4a**) e (**4b**) promovida por fungos Basidiomicetos.

Linhas	Fungos Basidiomicetos	T (d)	Álcool (5a) c. ^a (%)	Lactona (6a) c. ^a (%)	Álcool (5b) c. ^a (%)	Lactona (6b) c. ^a (%)
1	<i>T. versicolor</i> CCB 202	3	41	-	79	-
2	<i>T. rigida</i> CCB 285	5	64	-	-	-
3	<i>I. lacteus</i> CCB 196	7	57	-	85	-
4	<i>P. sanguineus</i> CCB 501	1	34	-	75	-

c: conversão determinada por CG.

Como pode ser observado na Tabela B.2, nas condições experimentais empregadas, nenhum dos quatro fungos Basidiomicetos foram capazes de promover a reação de Baeyer-Villiger, indicando que estes fungos não expressaram as monoxigenases requeridas para este tipo de reação. Por outro lado, foram eficientes na oxidação de sulfetos (Tabelas A.2, A.4, A.5 e A.6). A análise desses dados permitiu concluir que as enzimas presentes nos metabolismos destes fungos apresentaram, em moléculas adicionadas separadamente, seletividade para a oxidação de sulfetos frente a cetonas. No entanto, estes resultados ainda precisavam ser complementados, pois a intenção neste trabalho era avaliar a oxidação seletiva dos grupos funcionais presentes em uma única molécula. Então, antes de iniciarmos os estudos com as moléculas bi-funcionalizadas, seria interessante promover as reações com os fungos Basidiomicetos na presença simultânea das cetonas cíclicas com os sulfetos. Estes estudos poderiam demonstrar se os

fungos Basidiomicetos eram capazes de promover biotransformações em sistemas multifuncionais mantendo a eficiência das reações realizadas adicionando-se os substratos separadamente.

Para isso, em um mesmo frasco reacional (Procedimento B.1.3., Parte experimental, pg. 115), foi adicionada uma mistura dos substratos 4-metil-ciclohexanona (**4b**) e (fenilmetil) sulfeto (**1a**) (1:1) frente aos microrganismos apresentados na Tabela B.3.

Tabela B.3. Biotransformação dos substratos (**4b**) e (**1a**).

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

^ac: conversão determinada por análise cromatográfica

Fungos Basidiomicetos

Quando comparamos os resultados experimentais das Tabelas B.2, B.3, A.2, podemos observar que a mistura dos substratos promoveu uma alteração considerável nas biotransformações promovidas pelos fungos Basidiomicetos. Por exemplo, quando a biotransformação da cetona (**4b**) foi promovida pelo fungo *T. versicolor* CCB 202, obteve-se o álcool correspondente (**5b**) com conversão de 79% (7 dias de reação; Tabela B.2, linha 1). Usando o mesmo biocatalisador e misturando os substratos (**4b**) e (**1a**), o álcool (**5b**) foi obtido com conversão de 82% (1 dia de reação; Tabela B.3, linha 1), portanto observou-se um aumento na velocidade da reação de redução da carbonila na presença do sulfeto (**1a**) no meio reacional.

Um comportamento interessante pode ser observado quando o fungo *P. sanguineus* CCB 501 foi utilizado como fonte enzimática. Neste caso, quando foram misturados os substratos (**4b**) e (**1a**), ocorreu um incremento na produção do álcool (**5b**) de 100% com relação à biotransformação da cetona (**4b**) (Tabela B.2., linha 4), demonstrando uma preferência na redução da carbonila na presença do sulfeto (**1a**), uma vez que estas reações apresentam a mesma condição reacional (Tabela B.2., linha 4 e Tabela B.3., linha 4).

Podemos observar também, que o fungo *T. versicolor* CCB 202 promoveu uma rápida oxidação do sulfeto (**1a**) quando a cetona (**4b**) estava presente no meio reacional e inclusive com baixa produção de sulfona (**3a**) (Tabela B.3., linhas 1-3) e quando utilizou-se o sulfeto (**1a**) de maneira isolada a sua oxidação ocorreu lentamente e com elevada produção da sulfona (**3a**) (Tabela A.2., linhas 14 e 15).

Quando utilizou-se o fungo *P. sanguineus* CCB 501, a oxidação do sulfeto (**1a**) foi afetada de forma significativa quando a cetona (**4b**) estava presente no meio reacional. Na Tabela A.2 (linha 5) observa-se, que a reação de oxidação do sulfeto (**1a**) atingiu um nível satisfatório de oxidação [(**2a**), conversão de 90%] em 2 dias. Enquanto que, em 4 dias de reação (Tabela B.3., linha 5), o mesmo sulfeto agora na presença da cetona (**4b**) foi convertido ao sulfóxido correspondente (**2a**) com conversão de 45%. Neste caso observou-se que ocorreu uma queda considerável da conversão, pois o sulfóxido foi sendo oxidado a sulfona (**3a**) (Tabela B.3., linhas 5 e 6). Devemos observar também que ocorreram diferenças na seletividade das reações quando dois substratos (no caso, cetona

e sulfeto) foram colocados no mesmo frasco reacional e quando apenas um substrato estava presente, entretanto o mais importante para o nosso estudo preliminar foi que as enzimas dos fungos Basidiomicetos mostraram-se ativas frente aos substratos utilizados, ou seja, a cetona (**4b**) foi reduzida no respectivo álcool (**5b**) e o sulfeto (**1a**) oxidado ao sulfóxido (**2a**).

Fungos Hypomicetos

Outra parte deste trabalho envolveu o emprego de fungos *Aspergillus terreus* frente às reações contendo dois substratos no mesmo meio reacional [cetona (**4b**) e sulfeto (**1a**)], uma vez que estes fungos são reportados na literatura por serem muito ativos para promover reações de Baeyer-Villiger⁴ e oxidação de sulfetos² frente às suas monoxigenases. Para estas reações selecionamos dois fungos, o *Aspergillus terreus* CCT 3571 e o *Aspergillus terreus* CCT 3320.

Conforme já era esperado, as monoxigenases presentes nas linhagens dos fungos *Aspergillus terreus* foram capazes de promover reações de Baeyer-Villiger assim como oxidação de sulfetos (Tabela B.3., linhas 10-15).

Quando o fungo *A. terreus* CCB 3571 foi utilizado, a oxidação de Baeyer-Villiger foi muito eficiente frente à reação de redução competitiva (Tabela B.3., linhas 10-12), além disso, observou-se que a reação de oxidação do sulfeto (**1a**) foi tão efetiva que a sulfona (**3a**) foi obtida como produto majoritário desta oxidação. No caso do fungo *A. terreus* CCT 3320 a reação de Baeyer-Villiger não ocorreu, entretanto a oxidação do sulfeto (**1a**) foi eficaz, obtendo-se novamente a sulfona (**3a**) como produto majoritário (Tabela B.3., linhas 13-15).

A análise destes resultados deixou claro até aqui, que mudando alguma variável reacional, o comportamento do sistema enzimático pode sofrer alterações. Sendo assim, concluiu-se que nas condições experimentais empregadas, os fungos Basidiomicetos não foram capazes de promover reações de Baeyer-Villiger. Em virtude disso, para realizarmos os estudos quimiosseletivos resolvemos que os fungos Basidiomicetos seriam mais interessantes de serem utilizados, pois não promoveram simultaneamente reações de oxidação de sulfetos e de cetonas.

Devemos destacar a presença de outras enzimas nos fungos Basidiomicetos, como por exemplo, as álcoois desidrogenases que atuaram de forma significativa na redução do grupo carbonila de cetonas cíclicas conduzindo aos respectivos álcoois em boas conversões. Portanto é importante destacar que o emprego de células íntegras de fungos é uma alternativa bastante útil, uma vez que podem promover vários tipos de reações. Entretanto, o interesse em obtê-las vai depender dos objetivos de cada trabalho.

B.2. Síntese das moléculas bi-funcionalizadas.

Nos estudos preliminares de avaliação do potencial enzimático dos fungos foram utilizados substratos modelos que eram disponíveis comercialmente (Parte B1- Resultados e Discussão). O objetivo deste trabalho não foi somente à 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 grupo carbonila e sulfeto ou carbonila e selênio. As diferenças estruturais presentes 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 B.1.

Figura B.1. Substratos sintetizados para a biotransformação de moléculas bi-funcionalizadas.

Para explorar a influência das diferenças estruturais dos compostos nas biotransformações, uma série de moléculas bi-funcionalizadas (**7-14**) (Figura B.1) foram sintetizadas mantendo-se um padrão estrutural.

Todos os compostos apresentam na sua estrutura uma cetona cíclica com seis átomos de carbonos, a única exceção foi o composto (**9**), o qual possui uma cetona cíclica com cinco átomos de carbono. Os grupos sulfetos e selenetos distanciam-se do grupo carbonila nas séries (**7-9**) e (**10-13**). Aparentemente fora da série, o composto (**14**) foi sintetizado para outro fim (Resultados e Discussão - Parte C) e aproveitado neste estudo por apresentar características interessantes, uma vez que é o único que possui na sua estrutura uma substituição β -carbonila e uma insaturação. Todos os compostos foram preparados conforme procedimentos descritos na literatura, cada qual foi detalhado no capítulo Parte Experimental – Parte C (Pg. 127).

O sulfeto (**7**) foi preparado a partir da reação da 2-cloro-ciclohexanona (**17**) com o ânion tiofenolato (**16**) (Esquema B.1), conforme Procedimento C.2.1 (Pg. 129).

Esquema B.1. Síntese da 2-(feniltio)ciclohexanona (**7**).

Os compostos (10-13) foram preparados partindo do ceto-éster (18), que sofreu uma remoção do hidrogênio α à carbonila. O enolato formado (19) reagiu com o di-bromo (20), levando aos intermediários (21a) e (21b) (Esquema B.2), conforme os Procedimentos C.3.1. (Parte experimental, Pg. 132).

Esquema B.2. Síntese dos β -ceto-ésteres bromados (21).

Os compostos (10) e (11) foram preparados a partir da reação dos brometos (21a) e (21b) com o ânion tiofenolato (16). Os compostos (22a) e (22b) foram purificados e descarboxilados, levando aos produtos (10) e (11) (Esquema B.3), conforme os procedimentos C.3.1., C.3.2., e C.3.4. (Parte experimental, Pg. 132 e 134).

Esquema B.3. Síntese da 2-[3-(feniltio)propil]ciclohexanona (10) e da 2-[6-(feniltio)hexil]ciclohexanona (11).

A síntese dos selenetos (12) e (13) seguiu um procedimento semelhante ao descrito anteriormente. Inicialmente foi preparado o selenolato de fenila (24) a partir da reação do PhSeSePh (23) com NaBH₄. Assim como o tiofenolato, o ânion selenolato reagiu com os brometos (21a) e (21b). Os compostos (25a) e (25b) foram purificados e descarboxilados, levando aos produtos (12) e (13) (Esquema B.4); conforme os procedimentos C.3.1., C.3.3. e C.3.4. (Parte experimental, Pg. 132, 133, 134).

Esquema B.4. Síntese da 2-[3-(fenilseleno)propil]ciclohexanona (12) e da 2-[6-(fenilseleno)hexil] ciclohexanona (13).

Os selenetos (8) e (9) foram preparados a partir dos enolatos de lítio da ciclopentanona (26) e da ciclohexanona (27), respectivamente. Os enolatos (28) e (29) reagiram com o brometo de fenilselenila (30), preparado em outro frasco reacional (Esquema B.5); conforme os Procedimentos C.2.2. e C.2.3. (Parte experimental, Pg. 130 e 131).

Esquema B.5. Síntese da 2-(fenilseleno)ciclohexanona (8) e da 2-(fenilseleno)ciclopentanona (9).

B.3. Transformações biológicas das moléculas bi-funcionalizadas.

Buscando a união da síntese orgânica e das reações biocatalíticas adquiridas ao longo dos estudos desenvolvidos, a aplicação dos microrganismos selecionados em moléculas preparadas especialmente para este fim, pode ser considerada uma etapa importante dos estudos desenvolvidos nesse trabalho.

No Esquema B.6 são apresentados, a título de exemplo, as possíveis biotransformações do substrato (10) promovidas pelas enzimas presentes nos fungos empregados neste trabalho. Como podemos observar, utilizando-se uma molécula bi-funcionalizada, podemos obter a formação de pelo menos 4 produtos considerando-se a atuação enzimática quimiosseletiva, ou seja, somente a oxidação de Baeyer-Villiger (BVMO's) promoveriam a formação da lactona (10a), enquanto que as álcoois desidrogenases levariam ao álcool (10b), além disso as oxidases ainda poderiam formar somente o sulfóxido (10c) ou poderia ocorrer também a formação da sulfona (10d). Sem considerar, nestes casos, a atuação de duas enzimas em mais de um centro quimiosseletivo.

Esquema B.6. Possíveis biotransformações do composto (10) por enzimas presentes em células úmidas de microrganismos.

Conforme resultados apresentados no **tópico B.1** (Tabela B.3), as enzimas dos fungos Basidiomicetos poderão promover duas biotransformações no composto (**10**). Esses microrganismos podem oxidar o grupo sulfeto e reduzir o grupo 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 (**12**) e (**13**) pode sofrer uma eliminação oxidativa (tópico B.3.1).

O objetivo principal desse estudo foi verificar se as enzimas presentes no metabolismo dos fungos Basidiomicetos eram quimiosseletivas para a oxidação de sulfetos, para isso foram selecionados os fungos *T. byssogenum* CCB 203 e *P. sanguineus* CCB 501, que apresentaram os melhores resultados para este tipo de reação (Resultados e discussão – Parte A, Pg. 42 e 46). Visto que o acompanhamento das biotransformações seria muito complexo, buscamos um método analítico rápido e eficiente para avaliar as reações.

Como poderia ocorrer à formação de uma grande variedade de produtos, utilizamos várias técnicas de análise como CG-EM, RMN ^1H e ^{13}C e IV. De acordo com os resultados em cada análise foi possível sugerir as principais biotransformações promovidas pelas enzimas dos fungos Basidiomicetos nos compostos (**7-14**). Além disso, em alguns casos, foi possível obter os rendimentos isolados dos produtos biocatalisados, os quais foram caracterizados de forma completa.

O procedimento experimental utilizado nesta experiência está na Parte Experimental - Parte C (Pg. 127 e 128). Para facilitar a discussão dos resultados, estes serão divididos em blocos, nos quais estão contidos os compostos que apresentam semelhanças estruturais.

B.3.1. Selenetos (12) e (13).

Antes de discutir as reações de biocatálise para os selenetos (12) e (13), faremos algumas observações, com relação à reação de eliminação oxidativa, que é uma das reações mais conhecidas envolvendo compostos de selênio. 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 (12) (Esquema B.7), o selenóxido (12i) não foi isolado devido a sua instabilidade⁵. No entanto, o alceno (12b) serviu como indício de que ocorreu a oxidação do átomo de selênio.

Esquema B.7. Eliminação oxidativa do seleneto (12)

Os resultados obtidos nas biotransformações dos compostos (12) e (13) mostraram que além de oxidar sulfetos, os fungos *T. byssogenum* CCB 203 e *P. sanguineus* CCB 501 possuem enzimas capazes de oxidar selenetos a selenóxidos.

Biotransformação da 2-[3-(fenilseleno)propil] ciclohexanona (12).

Para comprovar a pureza do substrato (12) e determinar sua fragmentação por espectrometria de massas, foi feita a análise por CG-EM (Figura B.2).

Figura B.2. Cromatograma e espectro de massas do substrato (12).

Os fungos *T. byssogenum* CCB 203 e *P. sanguineus* CCB 501 levaram à biotransformação do substrato (12) em um curto espaço de tempo, uma vez que em 48h de reação, todo material de partida (12) foi consumido. Nessas alíquotas (dos dois fungos), foi detectada a presença do álcool (12a) ($t_R=19,8$) e do produto relativo a oxidação do seleneto (12b) ($t_R = 6,40$), conforme o cromatograma mostrado na Figura B.3. Para ambos os fungos, a partir da alíquota de 96h de reação o produto (12b) não foi mais detectado, podendo estar ocorrendo uma possível degradação deste produto de eliminação, pois os fungos Basidiomicetos são bastante utilizados como biodegradadores naturais de matéria orgânica e de PAHs (hidrocarbonetos aromáticos policíclos), PCBs (Bifenis Policlorados) e de BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e *o*, *m*, *p*- xilenos).

Figura B.3. Cromatograma e espectro de massas da reação (48h), utilizando 3g do fungo *P. sanguineus* CCB 501 e 20 μ L do substrato (12).

No caso do fungo *P. sanguineus* CCB 501, os dois produtos apresentaram uma proporção de 55:45 (12a:12b), indicando uma possível competição das enzimas óxido-redutases pelo substrato (12) (Figura B.3.). Entretanto, quando utilizou-se o fungo *T. byssogenum* CCB 203 a proporção foi de 84:16 (12a:12b), mostrando uma preferência para as enzimas que promoveram a redução da carbonila (Figura B.4).

Figura B.4. Cromatograma e espectro de massas da reação (48h), utilizando 3g do fungo *T. byssogenum* CCB 203 e 20 μ L do substrato (12).

Nesta parte do trabalho podemos concluir que os fungos *P. sanguineus* CCB 501 e *T. byssogenum* CCB 203 promoveram a redução do grupo carbonílico e a oxidação do selênio a selenóxido, com subsequente eliminação, conduzindo a formação do alceno (12b) em apenas 48h de reação.

Biotransformação da 2-[6-(fenilseleno)hexil] ciclohexanona (13)

Para comprovar a pureza do substrato (13) e determinar sua fragmentação por espectrometria de massas, foi feita a análise por CG-EM (Figura B.5).

Figura B.5. Cromatograma e espectro de massas do substrato (13).

Apesar dos compostos (12) e (13) serem semelhantes, apresentaram comportamentos diferentes quando foram submetidos às enzimas dos fungos *T. byssogenum* CCB 203 e *P. sanguineus* CCB 501. A análise do cromatograma da alíquota em 48h de reação do substrato (13) com o fungo *T. byssogenum* CCB 203 (Figura B.6) apresentou apenas um sinal referente à biotransformação deste substrato, enquanto que nenhum traço do substrato (13) foi detectado. Isso indicou que a enzima que promoveu a oxidação do seleneto foi também eficiente na biotransformação de (13). Enquanto que, utilizando o fungo *P. sanguineus* CCB 501, na alíquota de 48h de reação, ainda foi detectada a presença do substrato (13) ($t_R = 23,1$; Figura B.6).

T. byssogenum CCB 203*P. sanguineus* CCB 501

Figura B.6. Cromatogramas e espectros de massas das reações (48h), utilizando 3g dos fungos *T. byssogenum* CCB 203 e *P. sanguineus* CCB 501 e 20 μ L do substrato (13) – método 1.

Após 144 h de reação com o fungo *P. sanguineus* CCB 501, observou-se que uma parte do substrato foi biotransformado via oxidação e subsequente eliminação, produzindo o alceno (13b) (t_R =10,9 min). Nessa análise também foi detectado o produto de redução, o álcool (13a) (t_R = 24,1 min) e uma pequena quantidade do substrato (13) que não reagiu (Figura B.7). Esse resultado demonstrou que os fungos *T. byssogenum* CCB 203 e *P. sanguineus* CCB 501 possuem sistemas enzimáticos distintos.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Figura B.7. Cromatograma e espectro de massas da reação (144h), utilizando 3g do fungo *P. sanguineus* CCB 501 e 20 μ L do substrato (13).

Como pode ser observado nos cromatogramas (Figuras B.6 e B.7), as enzimas álcoois desidrogenases presentes nos sistemas enzimáticos dos fungos *T. byssogenum* CCB 203 e *P. sanguineus* 501 não foram eficazes na redução da carbonila do substrato (13), visto que o sinal do álcool (13a) somente foi detectado na alíquota após 144h de reação. Vale ressaltar que essas enzimas reduziram a carbonila do substrato (12) logo nas primeiras 48h de reação (Figura B.3.e B.4).

Levando em consideração as análises qualitativas utilizadas, foi possível avaliar as biotransformações nos substratos (12) e (13) e verificar quais enzimas estavam atuando preferencialmente nestas reações.

Com relação aos fungos *T. byssogenum* CCB 203 e *P. sanguineus* CCB 501, pode-se observar que os 3 grupos metileno que diferenciam os compostos (12) e (13) foram suficientes para que as transformações ocorressem de forma distinta. Quando empregou-se o fungo *T. byssogenum* CCB 203, ocorreu a completa oxidação dos grupo seleneto do composto (13) em apenas 48h de reação. No mesmo tempo de reação, o composto (12) sofreu transformações competitivas, levando a uma mistura do produto de oxidação do grupo seleneto seguida de eliminação redutiva (c = 45%) com o produto de redução da carbonila (c = 55%). Quando empregou-se o fungo *P. sanguineus* CCB 501, a biotransformação do composto (13) foi parcial, ou seja, foi detectado a presença de (13) em todas as alíquotas (48, 96 e 144h de reação). Por outro lado, quando o composto (12) foi submetido à enzimas do fungo *P. sanguineus* CCB 501, este foi totalmente consumido após 48h de reação. Apesar das pequenas diferenças estruturais dos compostos (12) e (13), foi possível observar que as enzimas presentes nos metabolismos dos fungos foram específicas frente às reações em moléculas bi-funcionalizadas.

B.3.2. Selenetos (8) e (9).

Os resultados obtidos com os selenetos (8) e (9) mostraram que quando o selênio está ligado ao carbono α ao grupo carbonila, não ocorreu a oxidação ao selenóxido frente as enzimas dos fungos *T. byssogenum* CCB 203 e *P. sanguineus* CCB 501.

Biotransformação da 2-(fenilseleno) ciclohexanona (8).

Para verificar a pureza do substrato (8), foi feita a análise por CG-EM (Figura B.8).

Figura B.8. Cromatograma e espectro de massas do substrato (8).

Quando o fungo *P. sanguineus* CCB 501 foi utilizado na biotransformação do substrato (8), observou-se apenas a redução do grupo carbonila (48h de reação), levando ao álcool (8a) ($t_R = 15,7$ e $15,9$) em conversão de 82% e 18% do substrato (8) permaneceu intacto (Figura B.9). Deve-se destacar que de acordo com a biblioteca de espectros de massas (CLASS-500/Wiley), os picos com $t_R = 3,3$ e com $t_R = 7,6$ correspondem, a ciclohexanona e o ácido octanóico, respectivamente.

Figura B.9: Cromatograma e espectros de massas da reação (48h), utilizando 3g do fungo *P. sanguineus* CCB 501 e 20 μ L do substrato (8).

Um comportamento semelhante foi observado quando a biotransformação foi promovida pelo fungo *T. byssogenum* CCB 203. Quando a reação atingiu 48h de reação, praticamente todo o substrato (8) foi biotransformado no álcool (8a). A diferença entre os dois fungos foi que após 144h o fungo *T. byssogenum* CCB 203 promoveu uma possível degradação de uma parte do produto (8a), produzindo no meio reacional PhSeSePh. Enquanto que na reação com o fungo *P. sanguineus* CCB 501, em 144h, não foi detectado a formação do PhSeSePh.

Com base no íon molecular detectado ($M^+ = 256$) e na fragmentação do produto (8a) (Figura B.10), foi sugerido que os picos com $t_R = 15,7$ e $15,9$ sejam uma mistura diastereomérica dos álcoois (8a).

Figura B.10: Espectros de massas dos álcoois *cis* e *trans* (8a).

A confirmação da estrutura do produto (8a) foi possível através do seu isolamento e com a análise dos dados de RMN ^1H , ^{13}C e IV. Para realizar o isolamento do produto, foram preparados 10 frascos reacionais utilizando-se o fungo *P. sanguineus* CCB 501 (procedimento C.1.4, Parte experimental). O produto (8a) foi isolado com 45% de rendimento (dados da caracterização do produto: Parte C; Parte experimental, Pg. 139). No espectro de absorção na região do infravermelho (IV) do substrato (8) (Figura B.11), observou-se a absorção característica de estiramento da ligação C=O de cetona ($\nu = 1701\text{ cm}^{-1}$) que não estava presente no IV do produto (8a) (Figura B.11). No espectro do produto (8a) a banda larga característica da ligação OH em ($\nu = 3441\text{ cm}^{-1}$) indicou que ocorreu uma redução do grupo carbonila.

Figura B.11: Espectros na região do IV do substrato (8) e do álcool (8a).

A análise do espectro de RMN ^{13}C do substrato (8) apresentou um sinal em δ 207 ppm (C_0) característico de grupo carbonila de cetona, enquanto que no espectro de RMN ^{13}C do álcool (8a) (anexo 53) apresentou dois sinais δ 72 ppm e δ 68 ppm característicos de carbono ligado a grupo hidroxílico (anexo 55) referentes à mistura diastereoisomérica dos álcoois (8a). Os dados espectroscópicos do produto da reação biocatalisada (8a) confirmaram sua estrutura. Neste trabalho não realizamos estudos para determinar os excessos enantioméricos dos possíveis álcoois formados (Esquema B.8.)

Esquema B.8. Mistura diastereoisomérica do álcool (8a).

Biotransformação da 2-(fenilseleno) ciclopentanona (9).

Na Figura B.12 tem-se o cromatograma e o espectro de massas do substrato (9) obtido por CG-EM (Figura B.12).

Figura B.12: Cromatograma e espectro de massas do substrato (9).

Quando empregou-se o fungo *P. sanguineus* CCB 501 o substrato (9) foi lentamente biotransformado no álcool (9a) em 48h de reação. Observou-se também uma possível biotransformação, que pode ser tanto do substrato (9) como do produto (9a), pois se verificou a presença de PhSeSePh ($t_R = 19,7$). Enquanto que, quando realizou-se a reação com o fungo *T. byssogenum* CCB 203, observou-se que todo o composto (9) foi biotransformado provavelmente em diastereoisômeros do álcool (9a) (Esquema B.9) e (Figura B.13 e Figura B.14)

Esquema B.9: Mistura diastereoisomérica do álcool (9a)

P. sanguineus CCB 501*T. byssogenum* CCB 203

Figura B.13: Cromatogramas e espectros de massas da reação (48h), utilizando 3g do fungo *P. sanguineus* CCB 501 e 3g do *T. byssogenum* CCB 203 e 20 μ L do substrato (9).

Figura B.14: Espectros de massas dos álcoois *cis* e *trans* (9a).

Para confirmar a estrutura do produto foram preparados 10 frascos reacionais utilizando o fungo *T. byssogenum* CCB 203 (procedimento C.1.4, Parte experimental). O produto (9a) foi isolado com um rendimento de 10 % e essa substância foi caracterizada por RMN 1H (Anexos 55 e 56). Neste espectro de RMN 1H podemos observar dois sinais referentes a mistura diastereoisomérica dos álcoois (9a) em δ 4,17 ppm e δ 3,41 ppm.

B.3.3.3 - Biotransformação da 2-(tiofenil) ciclohexanona (7).

Na Figura B.15. tem-se o cromatograma e o espectro de massas do substrato (7) obtido por CG-EM.

Figura B.15: Cromatograma e espectro de massas do substrato (7).

Utilizando-se o fungo *P. sanguineus* CCB 501 (Figura B.16), observou-se que praticamente todo o substrato foi biotransformado no álcool (7a) (94% de conversão, $t_R = 15,2$), após 48h de reação. Um comportamento semelhante foi observado quando utilizou-se o fungo *T. byssogenum* CCB 203 (Figura B.16).

Figura B.16: Cromatogramas e espectros de massas da reação (48h), utilizando 3g dos fungos *P. sanguineus* CCB 501 e *T. byssogenum* CCB 203 e 20 μ L do substrato (7).

Na análise da alíquota com 96h de reação, utilizando-se o fungo *P. sanguineus* CCB 501, verificou-se uma redução da área do pico do produto (7a) ($t_R = 15,2$) e um aumento da área do pico do substrato (7) ($t_R = 15,4$), de acordo com a Figura B.17. Conforme relatado anteriormente, com 48h de reação, o fungo *P. sanguineus* CCB 501 havia biotransformado praticamente todo o substrato (7) no produto (7a). Os picos de $t_R = 17,9$ e $t_R = 18,3$ foram destacados e suas estruturas são discutidas a seguir.

Figura B.17: Cromatograma e espectros de massa da reação (96h), utilizando o fungo *P. sanguineus* CCB 501 e 20 μ L do substrato (7).

O mesmo comportamento foi observado na biotransformação promovida pelo fungo *T. byssogenum* CCB 203, após 96h de reação (Figura B.18).

Figura B.18: Cromatograma e espectros de massas da reação (96h), utilizando 3g do fungo CCB *T. byssogenum* 203 e 20 μ L do substrato (7).

A confirmação da estrutura do produto (7a) foi possível com o seu isolamento e com a análise dos dados de RMN ^1H , ^{13}C e IV. Para isso foram preparados dez frascos reacionais (procedimento C.1.4, Parte experimental, Pg. 128). Foi priorizado o isolamento do produto (7a), por isso a reação foi realizada utilizando o fungo *P. sanguineus* CCB 501 como fonte enzimática (48h de reação). O produto (7a) foi isolado com 75% de rendimento (dados da caracterização do produto: Seção C.2.1.; Parte experimental).

No espectro de absorção na região do infravermelho (IV) do substrato (7) (Figura B.19), observou-se a absorção característica de estiramento da ligação C=O de cetona ($\nu = 1708\text{ cm}^{-1}$). No espectro IV do produto (7a), observou-se uma banda larga característica da ligação OH ($\nu = 3381\text{ cm}^{-1}$) indicando que ocorreu a redução do grupo carbonila (Figura B.19).

Figura B.19: Espectros na região do IV do substrato (7) e do álcool (7a).

No espectro de RMN ¹³C obteve-se um sinal em δ 207 ppm (C₀) característico da carbonila da cetona (7) (anexo 49), enquanto que no espectro RMN ¹³C do álcool (7a) observou-se dois sinais em δ 72 ppm e δ 67 ppm que são característicos de carbono ligado a um grupo hidroxílico (anexo 51). Além disso, estes dois sinais, são provavelmente da mistura diastereoisomérica dos álcoois *cis* e *trans* (7a) (Esquema B.10). No espectro de massas observa-se a mesma fragmentação para estes álcoois (Figura B.20).

Esquema B.10: Mistura diastereoisomérica do álcool (7a). **Figura B.20:** Espectros de massas dos álcoois (9a).

B.3.4 - Biotransformação da 3-[(2E)-3-(feniltio)prop-2-enil] ciclohexanona (14).

Na Figura B.21 tem-se o cromatograma e o espectro de massas do composto (14) obtidos por CG-EM.

Figura B.21: Cromatograma e espectro de massas do substrato (14) (método 5).

No cromatograma da reação do substrato (14) com o fungo *T. byssogenum* CCB 203, foram observados vários picos dificultando a interpretação dos dados. Após 96h de reação (Figura B.22), detectou-se a presença do substrato (14) e obteve-se o espectro de massas de mais duas moléculas provenientes desta biotransformação. Também foi detectado pela biblioteca de espectros de massas (CLASS-500/Wiley), um pico com $t_R = 15,9$ que corresponde ao PhSSPh.

Figura B.22: Cromatograma e espectros de massas da reação (96h), utilizando 3g do fungo *T. byssogenum* CCB 203 e 20 mg do substrato (14).

Quando o fungo *P. sanguineus* CCB 501 foi utilizado, apenas dois picos majoritários foram observados no cromatograma. Com 48h de reação, o substrato (14) ($t_R = 20,0$) foi convertido em um produto com $t_R = 23,1$ (Figura B.23). Essa molécula poderia ser o produto da oxidação do grupo sulfeto para o sulfóxido (14a) ou então em sulfona (14b). As possíveis estruturas desse produto são apresentadas no Esquema B.11.

Figura B.23: Cromatograma e espectros de massas da reação (48h), com 3g do fungo *P. sanguineus* CCB 501 e 20 mg do substrato (14).

Esquema B.11: Possíveis biotransformações do substrato (14) nos produtos (14a) e (14b).

A confirmação da estrutura do produto desta biotransformação foi possível com o seu isolamento e com a análise dos dados espectroscópicos de RMN ^1H , ^{13}C e IV e espectro de massa de alta resolução. Para isso foram preparados dez frascos reacionais (procedimento III.3.7, Parte experimental), onde foi utilizado o fungo *P. sanguineus* CCB 501 como fonte enzimática (8 dias de reação). O produto foi isolado com 25% de rendimento (dados da caracterização do produto: tópico C.5.; Parte experimental, Parte C).

No espectro de massas de alta resolução foi detectado o íon molecular do produto (MH^+ 265, anexo 65), comprovando que o fungo *P. sanguineus* CCB 501 biotransformou o substrato (**14**) no produto (**14a**), isto é, promoveu a redução da carbonila e a oxidação do grupo sulfeto a sulfóxido.

No espectro de IV do produto (**14a**) observou-se uma banda larga característica da ligação OH em ($\nu = 3415\text{ cm}^{-1}$) (Figura B.24), enquanto que no espectro de IV do substrato (**14**) observou-se uma banda característica da ligação C=O de cetona em ($\nu = 1702\text{ cm}^{-1}$). Além disso, no espectro de IV do composto (**14a**) observou-se uma banda característica da ligação S=O do sulfóxido em ($\nu = 1038\text{ cm}^{-1}$).

Figura B.24: Espectros na região do IV do álcool (14a) e do composto (14).

No espectro de RMN ¹³C do produto (14a) (anexo 74) observou-se dois sinais em δ 71 ppm e δ 67 ppm característico de carbono ligado a grupo hidroxílico e além disso, são referentes a mistura diastereoisomérica dos álcoois (14a) Com base nesses dados foi possível determinar a estrutura do produto (14a).

B.3.5. Sulfetos (10) e (11).

Os cromatogramas das biotransformações dos sulfetos (10) e (11) apresentaram diversos picos, tornando difícil a análise destas 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, devido a elevada polaridade dos mesmos, portanto estes compostos não foram caracterizados.

B.4. Conclusão

O principal objetivo neste trabalho foi verificar as enzimas presentes no metabolismo dos fungos *P. sanguineus* CCB 501 e *T. byssogenum* CCB 203 apresentavam um elevado potencial quimiosseletivo na redução e na oxidação de compostos que contêm grupos funcionais sulfetos e selenetos ligados a cetonas cíclicas (Tabela B.4.).

Tabela B.4.

Substratos	Fungos Basidiomicetos	Tipo de Reação	Produto Majoritário	Rendimento isolado (%)
7	<i>P. sanguineus</i> CCB 501	Redução		75
8	<i>P. sanguineus</i> CCB 501	Redução		45
9	<i>T. byssogenum</i> CCB 203	Redução		10
12	<i>T. byssogenum</i> CCB 203 e <i>P. sanguineus</i> CCB 501	Oxidação e Redução		nd
13	<i>T. byssogenum</i> CCB 203 e <i>P. sanguineus</i> CCB 501	Oxidação e Redução		nd
14	<i>P. sanguineus</i> CCB 501	Oxidação e Redução		25

Este trabalho também foi importante do ponto de vista sintético, uma vez que envolveu vários tipos de reações contribuindo para o aprendizado do aluno em síntese orgânica.

Como este estudo foi apenas inicial, e envolveu um tempo considerável para a realização de vários materiais de partida, a determinação da estereosseletividade das reações biocatalíticas, assim como os rendimentos isolados dos produtos majoritários e os seus respectivos valores de rotação óptica estão sendo realizados por outros alunos no grupo.

B. 5. Bibliografía

- 1) Kamerbeek, N. M.; Janssen, D. B.; van Berkel, W. J. H.; Fraaije, M. W. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, 345, 667.
- 2) Ricci, L. C.; Comasseto, J. V.; Andrade, L. H.; Capelari, M.; Cass. Q. B.; Porto, A. L. M. *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, 36, 937.
- 3) Comasseto, J. V.; Andrade, L. H.; Omori, A. T.; Assis, L. F.; Porto, A. L. M. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* **2004**, 29, 55.
- 4) Andrade, L. A.; Keppler, A. F.; Schoenlein-Crusius, I. H.; Porto, A. L. M.; Comasseto, J. V. *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, 36, 967.
- 5) Back, T. G. *em Organoselenium Chemistry: A Practical Aproach*. Engman, L.; Gupta, V.; Oxford University Press: Londres, **1999**. Capítulo 4, pg 71. ISBN 0-19-850141-2.

Resultados e Discussão

Parte C

C. Aplicação do sulfóxido alílico racêmico na síntese de axanos.

Como exemplo de uma aplicação sintética do (fenilalil) sulfóxido (**2d**), propomos a síntese de núcleos bicíclicos sesquiterpênicos do tipo axanos, que são encontrados em produtos naturais marinhos¹, como a axamida **I**. Esta rota sintética é muito interessante do ponto de vista prático, sintético e farmacêutico, uma vez que é bastante simples e os núcleos bicíclicos sesquiterpênicos apresentam pronunciada atividade citotóxica e antimicrobiana¹. Como a reação de adição de Michael com ânions de sulfóxidos alílicos à ciclopentenonas já foi bem estudada na literatura², inclusive sendo aplicada na síntese de produtos naturais como (+)-hirsuteno³. Assim, utilizamos estas condições reacionais para realizar a síntese racêmica dos precursores de sesquiterpenos (**33a**), (**33b**), (**34a**) e (**34b**) (Figura 1).

Figura 1. Estrutura dos precursores dos sesquiterpenos.

Inicialmente realizou-se a síntese de alguns materiais de partida como o (fenilalil) sulfóxido (**2d**) (**Parte A**) e a 3-metil-ciclohexanona (**35**)⁴ (Figura 2).

Figura 2. Síntese do (fenilalil) sulfóxido (**2d**) e da 3-metil-ciclohexanona (**35**).

Na primeira etapa desta síntese o sulfóxido (**2d**) foi convertido na correspondente ílida de enxofre na presença de base (LDA, THF, -78°C , 1h) a qual promoveu um ataque nucleofílico à 2-ciclohexenona somente na posição 4, através de uma conhecida reação de adição de Michael, resultando em uma mistura inseparável de diastereoisômeros do correspondente sulfóxido vinílico (**31**) com 62% de rendimento (Figura 3). A confirmação da estrutura do produto (**31**) foi possível através da análise dos dados espectroscópicos de RMN ^1H , ^{13}C e IV.

No espectro de IV do composto (**31**) (Figura 4), observou-se a absorção característica do estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ de cetona (ν 1708 cm^{-1}) (Anexo 63) e no espectro de RMN ^{13}C observa-se um deslocamento químico em δ 210,48 ppm característico de um carbono carbonílico (Anexo 66). Além disso, o diastereoisômero majoritário foi em relação do (*E*)-isômero na proporção de *E/Z* (5:1) obtida da análise do espectro de RMN ^1H (Anexos 64 e 65).

Figura 3. Síntese do sulfóxido vinílico (**31**)

Figura 4. Espectro no IV do sulfóxido vinílico (31)

Na etapa seguinte, o sulfóxido vinílico (31) foi reduzido ao seu correspondente sulfeto (14) através de uma reação que utilizou zinco metálico e ácido acético à temperatura ambiente por um período de 3 h (Figura 5)⁵. O rendimento nesta etapa foi de 90% para o sulfeto (14) e este composto foi obtido na forma de um sólido branco. Para confirmar esta redução, analisou-se o espectro de IV e de RMN ¹H do composto (14) (Anexos 57 e 58).

No espectro de IV do composto (31) (Figura 6), observou-se a absorção característica de estiramento da ligação S=O de sulfóxido (ν 1040 cm⁻¹) que não estava presente no IV do produto (14). No espectro de RMN ¹H do composto (31), observou-se que os hidrogênios alílicos e os hidrogênios do grupo fenil estão localizados em campo mais baixo do que no composto (14), levando-nos a sugerir que no composto (31) estes hidrogênios estão mais desblindados, devido a maior deslocalização eletrônica no composto (31), pela presença do grupo S=O.

Além disso, observou-se no espectro de RMN ¹H do composto (14) uma mistura diastereoisomérica na proporção de *E/Z* (1:1).

Figura 5. Síntese do sulfeto vinílico (14).

Figura 6. Espectro no IV do sulfeto vinílico (14)

Embora estivéssemos realizando a síntese racêmica dos biclos (33a) e (34a), tentamos realizar a separação dos enantiômeros e diastereoisômeros do sulfóxido vinílico (31) e do correspondente sulfeto vinílico (14) por métodos cromatográficos. A grande vantagem desta separação seria acompanhar a pureza dos intermediários durante as etapas de uma síntese assimétrica futura.

Assim, realizou-se a separação dos diastereoisômeros por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) em colaboração com a Prof. Dra. Quézia B. Cass, da Universidade Federal de São Carlos.

Os resultados obtidos foram os seguintes:

Condições Cromatográficas:

Fase estacionária: *Tris*-(*S*)-1-feniletilcarbamato de amilose.

Fase móvel: hexano/isopropanol 98:02.

Fluxo: 0,5 mL/min.

Comprimento de onda : 254 nm

Figura 7. Cromatograma da separação dos possíveis diastereoisômeros do sulfeto (**14**).

Como foi observado no espectro de RMN ^1H , o composto (**14**) estava presente na forma de uma mistura diastereoisomérica na proporção *E/Z* (1:1), portanto no cromatograma acima observamos a separação dos possíveis diastereoisômeros deste composto. Entretanto não foi obtida a separação dos enantiômeros nestas condições cromatográficas.

Enfim, chegamos a etapa chave desta síntese que é a reação de ciclização do sulfeto (**14**). Esta ciclização foi realizada sob duas condições experimentais:

a) Utilizando TiCl_4 , ácido acético e água.

b) Utilizando uma mistura ácido fórmico-ácido trifluoroacético (catalítico).

Na condição (a) da ciclização intramolecular envolvendo cetona e sulfeto vinílico na presença de 1 equivalente de TiCl_4 em ácido acético e 4 equivalentes de água à temperatura ambiente, num tempo total de reação de 30 minutos, resultou na formação do biciclo [3.2.1] (32) como produto majoritário (54%). Entretanto a formação deste mostrou dependência com o tempo reacional (Figura 8). O composto (24a) e o tiofenol foram identificados por CGEM.

Figura 8. Síntese do composto (32) dependente do tempo de reação.

A estrutura do composto (32) foi confirmada através da análise dos dados espectroscópicos de RMN ^1H , ^{13}C e IV. No espectro de IV (Figura 9) observou-se uma banda de absorção fraca característica do estiramento da ligação OH em álcoois terciários (ν 3255 cm^{-1}) e no espectro de RMN ^{13}C observou-se um deslocamento químico em δ 80,72 ppm característico de carbono terciário ligado a um grupo hidroxila.

Figura 9. Espectro no IV do composto (32).

No espectro de massas, observou-se um íon pico base (100%) de $m/z = 203$ (Figura 10). A fragmentação do composto (32) (Esquema 1), característica de álcoois cíclicos é iniciada com o íon radicalar hidroxila⁷. Sendo assim, este íon foi tomado como constatação da formação de um álcool cíclico.

Figura 10. Espectro de Massas do composto (32).

Esquema 1. Propostas de fragmentação do composto (32)

Esta reação, envolveu aparentemente a complexação do par de elétrons do oxigênio com a espécie de TiCl_4 , deixando o carbono carbonílico mais deficiente em elétrons, o qual sofreu um ataque nucleofílico do carbono β -tiofenil, levando a um carbocátion secundário. Em seguida, a água atuou como base formando uma ligação dupla exocíclica (Figura 11).

Podemos destacar que a formação deste álcool terciário não foi verificada na literatura nestas mesmas condições reacionais, portanto esta é uma proposta interessante para a formação de novos núcleos a partir de ciclohexenonas. A estrutura do álcool (32) foi confirmada por análise de HMQC e Cosy (2D) (Anexos 70 e 71) (Figura 12).

Figura 11. Proposta do mecanismo para a formação do produto (32).

Figura 12. Atribuição dos deslocamentos químicos baseados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (1D e 2D)

Na condição **(b)**, (88% $\text{HCO}_2\text{H}/\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}(\text{cat})/70^\circ\text{C}/3\text{h}$) também utilizada na literatura⁵ para ciclização intramolecular do composto **(14)**, não observou-se a formação do bicyclo [4.3.0] **(33a)** como produto majoritário e sim a decomposição do material de partida, em vários subprodutos não identificados.

Após a realização das etapas sintéticas com a 3-ciclohexenona, iniciamos a síntese racêmica dos intermediários do produto natural, utilizando a 3-metil-ciclohexenona como material de partida, a qual possui um grupo metila na posição 3 que nos permite levar a

formação dos bicíclcos (**33b**) e (**34b**), através de uma estratégia sintética simples. Inicialmente, o sulfóxido (**2d**) foi convertido na correspondente ilida de enxofre na presença de base (LDA, THF, -78°C , 1h), a qual reagiu com a 3-metil-ciclohexenona (**35**), entretanto nestas condições experimentais não foi observado nenhum produto de adição (1,2) e (1,4). Afim de otimizar a reação, a mesma foi efetuada sob diferentes condições experimentais e em nenhum caso levou a formação do produto de adição (1,2 e/ou 1,4), onde o material de partida foi recuperado (Tabela 1).

Tabela 1. Condições para a reação de Michael da 3-metil-ciclohexenona (**35**) com o (fenilalil) sulfóxido (**2d**).

Solventes	Aditivos	Produto desejado
THF	LDA	N
THF	LDA + 3eq. HMPA	N
THF	LDA + 3 eq. $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$	N
THF	Me_3SiCl	N
Éter Etilico	LDA	N
Éter Etilico	LDA + 3 eq. HMPA	N
Éter Etilico	LDA + 3 eq. $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$	N

N = não formado.

Este resultado foi considerado inesperado, uma vez que utilizou-se vários reagentes capazes de promover à adição (1,2 e/ou 1,4) à cetonas cíclicas, como HMPA e $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$. Entretanto, este resultado nos mostrou que ciclohexenonas são menos reativas do que ciclopentenonas e além disso a presença de um grupo metila na posição 3 dificultou as reações de adição, sendo necessário utilizar outras espécies nucleofílicas mais reativas. Devemos destacar que vários estudos na literatura para adição (1,4) de ânions de sulfóxidos alílicos foram realizados em ciclopentenonas substituídas ou não e quando realizou-se exemplos com ciclohexenonas, o produto de adição sempre ocorreu na posição (1,2) ou (1,4)⁵. No nosso caso, não obtivemos nenhum produto onde o material de partida foi recuperado quantitativamente.

C.1. Conclusão

Este trabalho teve como objetivo inicial realizar a síntese racêmica dos precursores de sesquiterpenos para posteriormente realizar as suas sínteses quirais a partir do (fenilalil)sulfóxido (**2d**). Entretanto, até o momento não conseguimos obter este sulfóxido enantiomericamente puro, fato que foi discutido na Seção A (Resultados e discussão).

A principal novidade neste trabalho foi na etapa de ciclização do sulfeto vinílico (**14**) utilizando a condição com TiCl_4 , ácido acético e água. O produto ciclizado (**32**) apresentou uma estrutura nova e interessante do ponto de vista sintético, uma vez que possui um grupo álcool terciário e um grupo sulfeto vinílico. Este produto foi caracterizado pelas técnicas de RMN ^1H e ^{13}C , 2D (HMQC), I.V. e EM.

A próxima etapa deste trabalho será a separação dos enantiômeros do ($\pm$)-(fenilalil)sulfóxido (**2d**) utilizando uma coluna preparativa acoplada ao aparelho de CLAE, com a colaboração da Prof. Dra. Quézia B. Cass da Universidade Federal de São Carlos (UfsCar), para assim realizarmos a síntese quiral do composto (**32**).

C.2. Bibliografia

1. Ohkubo, T.; Akino, H.; Asaoka, M.; Takei, H. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 3365.
2. Carreño, M. C. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 1717.
3. Procter, D. J. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans 1.* **2001**, 4, 335.
4. Porto, A. L. M.; Marsaioli, A. J. Tese de Doutorado. **2002**, Unicamp.
5. Hua, D. H.; Venkataraman, S.; Jô Coulter, M.; S-Z, Gurudas. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 719.

B I B L I O T E C A
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Conclusão Final

Esta dissertação apresentou resultados muito interessantes, pois conseguimos unir uma ferramenta valiosa como a biocatálise (utilizando fungos Basidiomicetos) com a síntese orgânica. Além disso, estes estudos apresentaram desafios que foram superados com muito trabalho e dedicação por todo o grupo.

Dentre estes resultados, destacam-se: os bons resultados na oxidação do (feniletil) sulfeto (**1b**) e (fenilpropil) sulfeto (**1c**) com os fungos *P. sanguineos* CCB 501 e *T. byssogenum* CCB 203. Nós tivemos dois desafios neste estudo, foram eles: os sulfóxidos (**2a-c**) foram obtido em modestos rendimentos e o (fenilalil) sulfóxido (**2d**) obtido com nenhuma seletividade sob ação enzimática dos fungos utilizados.

Na tentativa de aumentar o rendimento dos sulfóxidos, adequou-se o tempo reacional para 3 dias, pois estes são muito higroscópicos e além disso, realizou-se um estudo de extração com diferentes solventes.

A partir deste estudo de oxidação de sulfetos com fungos Basidiomicetos, decidimos aplicar a biocatálise em moléculas mais complexas, no que diz respeito à presença de vários centros quimiosseletivos. Este trabalho foi muito interessante, principalmente do ponto de vista sintético uma vez que envolveu vários tipos de reações contribuindo para o aprendizado em síntese orgânica.

O último trabalho desta dissertação apresentou um resultado inédito na etapa de ciclização do sulfeto vinílico (**14**) utilizando uma condição com TiCl_4 , ácido acético e água.

Estes trabalhos proporcionaram, até o momento, um artigo em revista de elevado impacto na área de síntese orgânica e biocatálise. Além disso, participamos de um congresso internacional (Brazilian Meeting on Organic Chemistry – Bmos) e dois congressos nacionais (27ª e 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ) onde tivemos a oportunidade de mostrar à comunidade científica o trabalho desenvolvido no laboratório.

Capítulo III

Parte Experimental

Parte Experimental

Parte A

III) Parte Experimental

A.1. Introdução.

Neste capítulo são apresentados os procedimentos e resultados experimentais obtidos tanto na parte sintética como na parte biocatalítica do trabalho. Os dados analíticos referentes aos produtos obtidos em cada tipo de reação são listados logo a seguir do procedimento utilizados para obtê-los.

A.2. Procedimentos gerais.

Todos os solventes e reagentes utilizados nas reações foram previamente tratados e purificados conforme procedimentos descritos na literatura¹.

A.2.1. Cromatografia em camada delgada e em coluna.

As análises cromatográficas em camada delgada foram efetuadas empregando-se as placas comerciais da Merck (E. Merck, tipo 5544, 0,2 mm e placas de vidro de 2 cm x 5 cm utilizando sílica gel 60 G Merck Darmstadt) as quais foram reveladas sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm), solução de vanilina em uma mistura de ácido sulfúrico-etanol (6 % vanilina m/v, 4 % ác. sulfúrico e 10 % de água, v/v, em etanol), anisaldeído (*p*-anisaldeído = 0,5 mL, ácido sulfúrico = 1,0 mL, ácido acético = 50mL) e iodo. Nas separações por cromatografia em coluna “flash” utilizou-se sílica gel 60 Merck 230-400 mesh.

A.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Para realização das análises cromatográficas do composto ($\pm$)-(fenilalil) sulfóxido (**2d**) utilizou-se um cromatógrafo líquido da marca WATERS, composto por uma bomba modelo 510 acoplada a um detector espectrofotométrico de absorção no UV visível de comprimento de onda variável, uma coluna quiral CHIROBIOTIC R (25,00 x 0,46 cm D.I.) comercializada pela Astec e um injetor manual REODYNE 7125 com alça dosadora

de 20 μL . A fase móvel utilizada foi uma mistura de solventes *n*-hexano/etanol (80:20) num fluxo de 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

A.2.3. Rotaevaporador.

Os solventes foram evaporados em um rotaevaporador Buchi 461, operando a pressão de 100-200 mmHg.

A.2.4. Cromatografia a Gás (CG).

As análises por cromatografia gasosa foram efetuadas em cromatógrafo a gás HP 5890 series II equipado com coluna metilsilicone, metilfenilsilicone 5% de 30m x 0,2mm x 0,22 μm , utilizando detector de ionização de chama e H_2 como gás de arraste. Os excessos enantioméricos foram determinados através das áreas dos cromatogramas em um cromatógrafo Shimadzu Série HP-5730 equipado com as seguintes colunas quirais: Chirasil-Dex CB β -ciclodextrina (25 m x 0.25 mm) para o sulfóxido (**2c**) e Supelco ALPHA DexTM α -ciclodextrina (30 m x 0,25 mm x 0.25 μm) para os sulfóxidos (**2a**) e (**2b**).

A.2.5. Espectrometria de Massas (CG-EM).

As análises por CG-EM foram efetuadas em um espectrômetro Shimadzu QP-5050, acoplado com um cromatógrafo Shimadzu GC-17 A, equipado com coluna capilar DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25 μm), utilizando-se detector de impacto eletrônico (EI). Além disso, Hélio foi utilizado como gás de arraste.

A.2.6. Espectrometria no Infravermelho (IV).

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro Bomem MB -100 com transformada de Fourier e calibração interna. As amostras foram preparadas na forma de filme e as absorções estão expressas em números de onda (cm^{-1}).

A.2.7. Ressonância Magnética nuclear de ^1H e ^{13}C .

Os espectros de RMN ^1H a 500 MHz e RMN ^{13}C a 500 MHz foram registrados em um espectrômetro Bruker DPX-500 (IQ-USP), utilizando-se clorofórmio deuterado como solvente e tetrametilsilano (TMS). Os espectros de RMN ^1H a 300 MHz e RMN ^{13}C a 300 MHz foram registrados em um espectrômetro Bruker DPX-300 e também em um aparelho Varian Gemini 300. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As multiplicidades estão assim representadas: s (singlete), d (dubleto), t (triplete), q (quarteto), quint (quintuplete), m (multiplete), dd (duplo dubleto) e dt (duplo triplete).

A.2.8. Polarímetro.

As medidas de rotação óptica foram determinados em polarímetro digital DIP-370 da Jasco.

A.3. Bibliografia

1) Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.; Perrin, D. R. *em Purification Of Laboratory Chemicals*. Pergamon Press: Oxford, **1980**. Segunda Edição. ISBN 0-08-022961-1.

Parte Experimental

Parte B

Parte Experimental – Parte B.**Parte Biocatalítica.****B.1. Coleção de cultura dos fungos Basidiomicetos usados neste estudo.**

Os fungos Basidiomicetos foram isolados de diferentes regiões dos Estados de São Paulo e do Mato Grosso do Sul e foram doados pela Coleção de Cultura de Basidiomicetos (CCB) do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo pela Prof. Dra. Marina Capelari:

Site do Instituto de Botânica: www.ibot.sp.gov.br

Endereço do Instituto de Botânica, Seção de Micologia e Liquenologia: Av. Miguel Estéfano, CP 4005, CEP 01061-970, São Paulo, SP, Brasil.

- ✓ *Irpex lacteus* CCB 196, Ribeirão Grande, São Paulo , Brasil.
- ✓ *Pycnoporus sanguineus* CCB 501, Mogi Guaçu, São Paulo, Brasil.
- ✓ *Trametes rigida* CCB 285, Miranda, Mato Grosso do Sul, Brasil.
- ✓ *Trametes versicolor* CCB 202, São Paulo, Brasil.
- ✓ *Trametes villosa* CCB 291, Águas da Prata, São Paulo, Brasil.
- ✓ *Trichaptum byssogenum* CCB 203, São Vicente, São Paulo, Brasil.

B.1.1. Procedimento geral para o crescimento dos fungos Basidiomicetos.

Os fungos Basidiomicetos utilizados nas reações foram cultivados em um meio de cultura sólido enriquecido em placas de Petri. Este meio de cultura enriquecido foi utilizado devido a estudos realizados com algumas linhagens já descritas na literatura¹ e então estendeu-se aos microrganismos que trabalhamos.

O meio enriquecido é constituído de 20g/L de glucose; 2g/L de extrato de levedura; 5g/L de peptona; 1g/L de KH₂PO₄; 0,5 g/L de MgSO₄.7H₂O e 0,053g/L de NaCl.

Para o crescimento destes fungos, cortou-se um pequeno pedaço do fungo (0,5 x 0,5 cm) crescido em meio sólido e adicionou-se em 500 mL do meio de cultura líquido

previamente esterilizado em frascos Erlenmeyers de 1000 mL na temperatura entre 28-32°C, sob agitação rotativa (150-170 rpm), durante 8 dias.

B.1.2. Procedimento padrão para reações biocatalíticas utilizando meio de cultura e o sulfeto 1b (Condição I).

Após 8 dias de incubação, a massa celular foi separada do meio de cultura líquido por filtração em funil de Buchner. Em seguida, 100 mL do meio de cultura foi transferido para frascos Erlenmeyers de 250 mL e então o (feniletil) sulfeto (**1b**) (20 µL) foi adicionado. O progresso das reações foi monitorado por análises em cromatografia gasosa e por tempos periódicos de 2 a 8 dias (Tabela A.1).

B.1.3. Procedimento padrão para biooxidações em pequena escala utilizando os sulfetos 1a-d (Condição II e III).

Após o crescimento dos fungos, a massa celular foi separada do meio de cultura líquido por filtração em funil de Buchner. Em seguida, a massa celular (1g e 3g) foi transferida para frascos Erlenmeyers de 250 mL e ressuspensos em 40 mL de uma solução tampão fosfato (Na_2HPO_4 e KH_2PO_4) em pH 7². Esta suspensão foi utilizada imediatamente na biotransformação, adicionando-se os sulfetos **1a-4a** (20 µL) e as reações foram realizadas sob agitação rotativa (150-170 rpm), na temperatura entre 28-32°C e monitoradas por tempos periódicos de 2 a 8 dias (Tabelas A.2, A.4, A.5, A.6).

B.1.4. Análises do curso reacional das reações biocatalíticas.

O progresso das reações foi monitorado a cada 48 h, através da coleta de 4 mL de amostra. Estas amostras foram extraídas com acetato de etila (1 mL) sob agitação (Vortex), seguida de centrifugação (6000 rpm, 5 min). A fase orgânica foi analisada por CG/FID (4 µL) em coluna capilar quiral. Os produtos das reações biocatalisadas foram comparados com a mistura racêmica previamente obtida por oxidação química.

B.1.5. Procedimento geral para a extração dos sulfóxidos.

As reações foram monitoradas por cromatografia a gás (CG) e após atingir um período de 3 dias, a mistura foi filtrada, saturada com NaCl e a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (4 x 150 mL). Em seguida, secou-se a fase orgânica de coloração amarela com MgSO₄, filtrou-se e evaporou-se o solvente. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando-se uma mistura de hexano /acetato de etila (1:1) como eluente.

B.1.6. Rendimentos isolados dos sulfóxidos 2a-d obtidos através da biocatálise.

As células úmidas filtradas dos fungos Basidiomicetos (3 g) foram ressuspensas em uma solução tampão fosfato (pH 7, 40 mL) em 10 frascos Erlemeyers de 250 mL. Em seguida, os sulfetos **1a-d** (20 µL) foram adicionados. As reações foram realizadas sob agitação rotativa (32°C, 160 rpm) até que o material de partida fosse consumido. A seguir são mostrados os resultados obtidos para os rendimentos isolados.

- ✓ (-)-(S)-(fenilmetil) sulfóxido (**2a**): *T. byssogenum* CCB 203 (rendimento: 36%, 3 dias, e.e. 7%).
- ✓ (-)-(S)-(feniletil) sulfóxido (**2b**): *P. sanguineus* CCB 501 (rendimento: 35%, 3 dias, e.e. 80%).
- ✓ (-)-(S)-(fenilpropil) sulfóxido (**2c**): *T. byssogenum* CCB 203 (rendimento: 39%, 3 dias, e.e. 85%) e (rendimento: 34%, 6 dias, e.e. >99%).
- ✓ (-)-(S)-(fenilalil) sulfóxido (**2d**): *I. lacteus* CCB 196 (rendimento: 30%, 3 dias); *P. sanguineus* CCB 501 (rendimento: 32%, 3 dias); *T. rigida* CCB 285 (rendimento: 41%, 3 dias); *T. byssogenum* CCB 203 (rendimento: 32%, 3 dias).

B.1.7. Determinação da configuração absoluta dos sulfóxidos 2a-d.

Os valores de rotação óptica foram medidos em um polarímetro digital da Jasco DIP-370. As configurações absolutas foram atribuídas por comparação do sinal de rotação óptica medido com os valores reportados na literatura³⁻⁸.

- ✓ *T. byssogenum* CCB 203: (-)-(S)-(fenilmetil) sulfóxido (**2a**): $[\alpha]_D^{20} -10.0^\circ$ (*c* 0.10, CHCl₃), e.e. 7%.
- ✓ *P. sanguineus* CCB 501: (-)-(S)-(feniletil) sulfóxido (**2b**): $[\alpha]_D^{20} -133.3^\circ$ (*c* 1.50, CHCl₃), e.e. 80%.
- ✓ *T. byssogenum* CCB 203: (-)-(S)-(fenilpropil) sulfóxido (**2c**): $[\alpha]_D^{20} -141.5^\circ$ (*c* 1.19, CHCl₃), e.e. 85%.
- ✓ *T. byssogenum* CCB 203: (-)-(S)-(fenilpropil) sulfóxido (**2c**): $[\alpha]_D^{20} -90.0^\circ$ (*c* 0.6, CHCl₃), e.e. 99%.
- ✓ *T. rigida* CCB 285: (-)-(S)-(fenilalil) sulfóxido (**2d**): $[\alpha]_D^{20} -3.16^\circ$ (*c* 1.9, EtOH).
- ✓ *T. byssogenum* CCB 203: (-)-(S)-(fenilalil) sulfóxido (**2d**): $[\alpha]_D^{20} -3.50^\circ$ (*c* 2.0, EtOH).
- ✓ *P. sanguineus* CCB 501: (-)-(S)-(fenilalil) sulfóxido (**2d**): $[\alpha]_D^{20} -7.92^\circ$ (*c* 5.3, EtOH).
- ✓ *I. lacteus* CCB 196: (-)-(S)-(fenilalil) sulfóxido (**2d**): $[\alpha]_D^{20} -6.0^\circ$ (*c* 2.0, EtOH).

B.1.8. Procedimento padrão para reações de resolução cinética dos sulfóxidos (2a) e (2c).

Após o crescimento do fungo *Pycnoporus sanguineus* CCB 501, a massa celular foi separada do meio de cultura líquido por filtração em funil de Büchner. Em seguida, a massa celular (3g) foi transferida para frascos Erlemeyers de 250 mL e ressuspensas em 40 mL de uma solução tampão fosfato (Na₂HPO₄ e KH₂PO₄) em pH 7². Esta suspensão foi utilizada imediatamente na biotransformação, adicionando-se os sulfóxidos racêmicos (**2a**) e (**2c**) (20 µL) e as reações foram realizadas sob agitação rotativa (150-170 rpm) , na temperatura entre 28-32°C pelo tempo indicado na Tabela A.11.

B.1.9. Condições de Análises do CG.

Injetor 220 °C; Detector 220 °C; Pressão da Coluna. (Kpa) 100; Split ratio (1:20); oven 90 –180 °C; rate 3 °C/min.

- ✓ (R,S)-(fenilmetil) sulfóxido (**2a**) : tempo de retenção do [(R)-isômero: 18.25 min; (S)-isômero: 18.41min)].
- ✓ (R,S)-(feniletil) sulfóxido (**2b**) : tempo de retenção do [(R)-isômero: 20.77 min; (S)-isômero 20.87 min)].
- ✓ (R,S)-(fenilpropil) sulfóxido (**2c**) : tempo de retenção do [(R)-isômero: 18.72 min; (S)-isômero 18.59 min)].
- ✓ (R,S)-(fenilalil) sulfóxido (**2d**) : tempo de retenção do [(R)-isômero: 23.4 min; (S)-isômero 23.4 min)].

B.2. Síntese dos substratos e dos padrões cromatográficos utilizados na triagem com fungos Basidiomicetos⁹.**B.2.1 Procedimento geral para síntese de aril alquil sulfetos.**

Em um balão de 50 mL, adicionou-se o tiofenol (1 mmol) em 30 ml de diclorometano. Em seguida, agitou-se em banho de gelo por 10 min e adicionou-se K_2CO_3 (3 mmol) e logo em seguida adicionou-se o haleto de alquila (1 mmol). Após a adição destes reagentes, adicionou-se lentamente trietilamina (1 mmol). As reações ocorreram num período de 1 à 2 h. Em seguida, adicionou-se NH_4Cl e extraiu-se a fase orgânica com diclorometano (3 x 30 mL), secou-se sob $MgSO_4$, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna usando hexano como eluente.

(Fenilmetil) sulfeto (1a)

F.M. C_7H_8S , **M.M.** 124, líquido incolor de odor forte

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 2,44 (s, 3H, Me); 7,23 (m, 5H).

RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 15,8 ($\underline{C}H_3$, Me); 125,0 ($\underline{C}H$); 126,7 (2 $\underline{C}H$); 128,8(2 $\underline{C}H$); 138,4 ($\underline{C}_0$).

I.V. (KBr) (cm^{-1}): 2920 (C-H); 738 (aromat.).

E.M. (m/z) (%rel.): 124 (100); 78 (55); 109 (42); 45 (29); 65 (24).

Rendimento: 81 %.

(Feniletil) sulfeto (1b)

F.M. C₈H₁₀S, **M.M.** 138, líquido incolor de odor forte

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,33-1,29 (t, *J* 7,2 Hz, 3 H, Me); 2,98-2,91 (q, *J* 7,5 Hz, 2 H, CH₂); 7,19-7,13 (tt, *J* 7,4 Hz e *J* 1,2 Hz, 1 H); 7,31-7,25 (td, *J* 7,4 Hz e *J* 1,2 Hz, 2H); 7,35-7,32 (dd, *J* 7,4 Hz e *J* 1,2 Hz, 2H).

RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 14,3 (CH₃); 27,6 (CH₂); 125,7 (CH); 128,6 (2 CH); 129,0 (2 CH); 136,6 (C₀).

I.V.(filme)(cm⁻¹): 2926-2971 (C-H); 739 (aromat.).

E.M. (m/z) (%rel.): 138 (100); 110 (68); 123 (65); 45 (58); 66 (34); 109 (22); 77 (17).

Rendimento: 83 %.

(Fenilpropil) sulfeto (1c)

F.M. C₉H₁₂S, **M.M.** 152, líquido incolor de odor forte.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,03-1,00 (t, *J* 7,5 Hz, 3H, Me); 1,70-1,63 (m, 2H); 2,90-2,87 (t, *J* 7,1 Hz, 1H); 7,16-7,13 (m, 1H); 7,28-7,24 (m, 2H); 7,33-7,31 (m, 3H).

RMN ¹³C (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 13,39 (CH₃); 22,50 (CH₂); 35,62 (CH₂); 125,64 (CH); 128,77 (2 CH); 128,97 (2 CH); 136,94 (C₀).

I.V. (KBr) (cm⁻¹): 3058-2871 (C-H); 739 (aromat.).

E.M. (m/z) (%rel.): 110 (100); 152 (68); 123 (51); 45 (49); 41 (21).

Rendimento: 77 %.

(Fenilalil) sulfeto (1d)

F.M. C₉H₁₀S, **M.M.** 150, líquido incolor de odor forte.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3,62-3,48 (m, 2H, CH₂); 5,24-5,17 (dq, *J* 1,2 Hz e *J* 17,1 Hz, 1H); 5,35-5,32 (m, 1H); 5,73-5,59 (m, 1H); 7,57-7,51 (m, 3H); 7,65-7,58 (m, 2H).

RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 60,77 (CH₂); 123,73 (CH); 124,24 (CH); 125,15 (CH); 128,94 (CH); 131,00 (CH); 142,84 (C₀).

I.V. (KBr) (cm⁻¹): 3060- 3078 (C-H); 739 (aromat.).

E.M. (m/z) (%rel.): 41 (100).150 (61); 135 (60); 117 (41); 65 (40); 45 (28); 51 (22); 109 (34); 91 (18); 77 (12).

Rendimento: 79 %.

B.2.2 Procedimento geral para a síntese dos sulfóxidos racêmicos.

Em um balão de 50 mL, adicionou-se o aril alquil sulfeto (1mmol) em metanol (5 mL) e água (5 mL) e agitou-se por 10 minutos à 0° C. Após este tempo, adicionou-se periodato de sódio (1 mmol) e deixou-se a reação sob agitação por um período de 1h à 2h após atingir a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se NaCl (15 mL) e extraiu-se a fase orgânica com diclorometano (3 x 30 mL), secou-se sob MgSO₄, filtrou-se e evaporou-se o solvente no rotaevaporador. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna usando como eluente hexano:acetato de etila 1:1.

(Fenilmetil) sulfóxido (2a)

F.M. C₇H₈OS, **M.M.** 140, sólido incolor de odor forte.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2,71 (s, 3H, Me); 7,56-7,48 (m, 3H); 7,67-7,63 (m, 2H).

RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 43,9 (CH₃); 123,4 (2 CH); 129,3 (2 CH); 130,9 (CH); 145,8 (C₀).

I.V. (KBr) (cm⁻¹): 2914-3057 (C-H); 1036 (SO); 750 (aromat.).

E.M. (m/z) (%rel.): 51 (100); 125 (90,9); 140 (82,4); 77 (77,8); 97 (73,1); 65 (26,5); 109 (6,8).

Rendimento: 72 %.

(Feniletil) sulfóxido (2b)

F.M. C₈H₁₀OS, **M.M.** 154, líquido incolor de odor forte.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,22-1,17 (t, J 7,5 Hz, 3H, Me); 2,94-2,73 (m, 2H); 7,55-7,48 (m, 3H); 7,62-7,58 (m, 2H).

RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 5,9 (CH₃); 50,4 (CH₂); 124,3 (2 CH); 129,1 (2 CH); 130,9 (CH); 143,8 (C₀).

I.V. (KBr) (cm⁻¹): 3056-2875 (C-H); 1045 (SO); 750 (aromat.).

E.M. (m/z) (%rel.): 78 (100); 125 (42,0); 51 (24,2); 154 (12,4).

Rendimento: 79 %.

(Fenilpropil) sulfóxido (2c)

F.M. C₉H₁₂OS, **M.M.** 168, líquido amarelo de odor forte.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,05-1,03 (t, *J* 7,5 Hz, 3H, Me); 1,68-1,62 (m, 1H, CH_a); 1,82-1,76 (m, 1H, CH_b); 2,84-2,73 (m, 2H, CH₂); 7,53-7,47 (m, 3H); 7,63-7,60 (m, 2H).

RMN ¹³C (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 13,03 (CH₃); 15,70 (CH₂); 58,96 (CH₂); 123,85 (2 CH); 129,02 (2 CH); 130,77 (CH); 143,65 (C₀).

I.V. (KBr) (cm⁻¹): 3056-2875 (CH); 1044 (SO); 751 (aromat.).

E.M. (m/z) (%rel.): 78(100); 126 (53,6); 43 (27,1); 51 (22,3); 77 (19,0).

Rendimento: 82%.

(Fenilalil) sulfóxido (2d)

F.M. C₉H₁₀OS, **M.M.** 166, líquido amarelo de odor forte.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3,63-3,48 (m, 2H, CH₂); 5,24-5,17 (dq, *J* 1,2 Hz e *J* 17,1 Hz, 1H, H_a); 5,36-5,32 (dt, *J* 0,6 Hz e *J* 10,5 Hz, 1H, H_b); 5,73-5,59 (m, 1H, H_c); 7,56-7,49 (m, 3H); 7,63-7,59 (m, 2H).

RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 60,77 (CH₂); 123,76 (CH); 124,15 (CH); 125,16 (CH); 128,95 (2 CH); 131,02 (2 CH); 142,85 (C₀).

I.V. (KBr) (cm⁻¹): 3080-2912 (CH); 1042 (SO); 752 (aromat.).

E.M. (m/z) (%rel.): 41 (100); 51 (78,0); 125 (66,8); 77 (39,8); 97 (33,0); 166 (19,8); 65 (12,2); 109 (8,3).

Rendimento: 75 %.

B.2.3 Procedimento geral para a síntese das sulfonas.

Em um balão de 50 mL, adicionou-se o aril alquil tioéter (1 mmol) em metanol (5 mL) e água (5 mL) e agitou-se por 10 minutos à 0° C. Após este tempo, adicionou-se periodato de sódio (2 mmol) e deixou-se a reação sob agitação por um período de 6 a 8h após atingir a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se NaCl (15 mL) e extraiu-se a fase orgânica com diclorometano (3 x 30 mL), secou-se sob MgSO₄, filtrou-se e evaporou-se o solvente no rotaevaporador. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna usando como eluente acetato de etila.

(Fenilmetil) sulfona (3a)

F.M. C₇H₈O₂S, **M.M.** 156, sólido incolor de odor forte.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3,06 (s, 3H); 7,71-7,53 (m, 3H); 7,97-7,93 (m, 2H).

RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 44,5 (CH₃); 127,34 (2 CH); 129,40 (2 CH); 133,71 (CH); 140,74 (C₀).

I.V. (KBr) (cm⁻¹): 3090-29626 (C-H); 1297 (SO assimétrica); 1148 (SO simétrica); 748 (aromat.).

E.M. (m/z) (%rel.): 77 (100); 51 (41,2); 94 (29,2); 141 (15,5); 156 (16,0).

Rendimento: 67%.

(Feniletil) sulfona (3b)

F.M. C₈H₁₀O₂S, **M.M.** 170, líquido incolor de odor forte.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,29-1,26 (t, *J* 7,5 Hz, 3H, Me); 3,14-3,10 (q, *J* 7,5 Hz, 2H); 7,59-7,56 (m, 2H); 7,68-7,65 (m, 1H); 7,92-7,90 (m, 2H).

RMN ¹³C (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7,4 (CH₃); 50,6 (CH₂); 128,2 (2 CH); 129,3 (2 CH); 133,7 (CH); 138,7 (C₀).

I.V. (KBr) (cm⁻¹): 3065-2882 (CH); 1313 (SO assimétrica); 1146 (SO simétrica); 738 (aromat.).

E.M. (m/z) (%rel.): 77 (100); 78 (60,5); 51 (47,7); 94 (42,5); 170 (25,0).

Rendimento: 62%.

(Fenilpropil) sulfona (3c)

F.M. C₉H₁₂O₂S, **M.M.** 184, líquido amarelo de odor forte.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,02-0,97 (t, *J* 7 Hz, 3H); 1,81-1,68 (m, 2H); 3,09-3,01 (m, 2H); 7,60-7,54 (m, 2H); 7,69-7,61 (m, 1H); 7,94-7,89 (m, 2H).

RMN ¹³C (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 12,9 (CH₃); 16,53 (CH₂); 58,03 (CH₂); 128,06 (CH); 129,26 (2 CH); 133,62 (2 CH); 139,28 (C₀).

I.V. (KBr) (cm⁻¹): 3065-2880 (CH); 1312 (SO assimétrica); 1146 (SO simétrica); 754 (aromat.).

E.M. (m/z) (%rel.): 78 (100), 43 (89,3); 77 (73,4); 41 (54,9); 51 (38,0); 184 (13,3).

Rendimento: 54%.

(Fenilalil) sulfona (3d)

F.M. C₉H₁₀O₂S, **M.M.** 182, líquido amarelo de odor forte.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3,81-3,78 (d, *J* 7,4 Hz, 2H); 5,18-5,09 (dd, *J* 0,8 Hz e 17,2 Hz, 1H, **Ha**); 5,33-5,28 (d, *J* 10,2 Hz, 1H, **Hb**); 5,88-5,67 (m, 1H, **Hc**); 7,67-7,49 (m, 3H); 7,88-7,83 (m, 2H).

RMN ¹³C (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 61,82 (CH₂); 125,61 (CH); 129,43 (2 CH); 129,98 (2 CH); 134,67 (CH); 139,38 (C₀).

I.V. (KBr) (cm⁻¹): 3066-2920 (CH); 1315 (SO assimétrica); 1146 (SO simétrica); 753 e 693 (aromat.).

E.M (m/z) (%rel.): 41 (100); 77 (86,4); 51 (39,8); 117 (27,0); 141 (24,0).

Rendimento: 60 %.

B.3. Bibliografia.

1. Hage, A.; Petra, D. G. I.; Field, J. A.; Schipper, D.; Wijnberg, J. B. P. A.; Kamer, P. C. *J. Tetrahedron: Asymmetry*. **2001**, 12, 1025.
2. Assupção, R. M. V.; Morita, T. *Manual de Soluções e Reagentes e Solventes*. Ed. Edgard Blucher e Ed. da USP. **1968**.
3. Porto, A. L. M.; Cassiola, F.; Dias, S. L. P.; Joekes, I.; Gushiken, Y.; Rodrigues, J. A. R. *J. Mol. Cat B: Enzymatic*. **2000**, 19-20, 327.
4. Ohta, H.; Okamoto, Y.; Tsuchihashi, G-I. *Agric. Biol. Chem.* **1985**, 49, 2229.
5. Ohta, H.; Okamoto, Y.; Tsuchihashi, G-I. *Chem. Lett.* **1984**, 205.
6. Mikolajczyk, M.; Drabowicz, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 2511.
7. Holland, H. L.; Pöpperl, H.; Ninniss, R. W. *Can. J. Chem.* **1985**, 63, 1118.
8. Gasparrini, F.; Misisti, D.; Villani, C. *J. Cromatogr A*. **1995**, 694, 163.
9. Porto, A. L. M.; Marsaioli, A. J. Tese de Doutorado. **2002**, IQ-Unicamp.

Parte Experimental

Parte C

Parte Experimental – Parte C.**C.1. Parte Biocatalítica.****C.1.1. Coleção de cultura dos fungos Basidiomicetos usados neste estudo.**

Os fungos Basidiomicetos foram isolados de diferentes regiões dos Estados de São Paulo e do Mato Grosso do sul e foram doados pela Coleção de Cultura de Basidiomicetos (CCB) do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo pela Prof. Dra. Marina Capelari:

Site do Instituto de Botânica: www.ibot.sp.gov.br

Endereço do Instituto de Botânica, Seção de Micologia e Liquenologia: Av. Miguel Estéfano, CP 4005, CEP 01061-970, São Paulo, SP, Brasil.

:

- ✓ *Pycnoporus sanguineus* CCB 501 Mogi Guaçu, São Paulo, Brasil.
- ✓ *Trichaptum byssogenum* CCB 203, São Vicente, São Paulo, Brasil.
- ✓ *Trametes versicolor* CCB 202, São Paulo, Brasil.

C.1.2. Procedimento padrão para biooxidações em pequena escala utilizando os substratos 7-14.

Após o crescimento dos fungos, a massa celular foi separada do meio de cultura líquido por filtração em funil de Buchner. Em seguida, a massa celular (3g) foi transferida para frascos Erlemeyers de 250 mL e ressuspensos em 40 mL de uma solução tampão fosfato (Na_2HPO_4 e KH_2PO_4) em pH 7¹. Esta suspensão foi utilizada imediatamente na biotransformação, adicionando-se os substratos 7-14 (20 mg) e a mistura reacional foi realizada sob agitação rotativa (150-170 rpm), na temperatura entre 28-32°C e monitoradas por tempos periódicos de 2 a 6 dias através da técnica de espectrometria de massas.

C.1.3. Análises do curso reacional das reações biocatalíticas.

Colocou-se três reações biocatalíticas para cada substrato, que foram monitoradas à cada 2 dias através da extração de uma das reações. Na extração, a mistura foi filtrada, saturada com NaCl e a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (4 x 150 mL). Em seguida, secou-se a fase orgânica de coloração amarela com MgSO₄, filtrou-se, evaporou-se o solvente e analisou-se no CG-MS.

C.1.4. Rendimentos isolados dos produtos obtidos através da biocatálise.

As células úmidas dos fungos Basidiomicetos (3g) foram ressuspensas em uma solução tampão fosfato (pH 7, 40 mL) em 10 frascos Erlemeyers de 250 mL. Em seguida, os substratos **7-14** (20 mg) foram adicionados nestes frascos. As misturas foram monitoradas sob agitação rotativa (32°C, 160 rpm) até que o material de partida fosse consumido.

C.1.5. Condições de Análises do CG-EM.

Foram utilizados 2 diferentes métodos para as análises cromatográficas em espectrometria de massas (CG-EM), os quais foram otimizados de acordo com os compostos. Os seguintes parâmetros foram modificados: a pressão do gás carreador (pressão interna da coluna), a taxa de aquecimento e a temperatura inicial da coluna.

Método 1 (CG-EM): gás carreador – He, 92 kPa; temp. injetor = 230°C; temp. detector = 230°C; temp. coluna = início 60°C, rampa de 10°C/min até 280°C. Tempo total de programação = 20 min.

Método 2 (CG-EM): gás carreador – He, 95 kPa; temp. injetor = 230°C; temp. detector = 230°C; temp. coluna = início 40°C, rampa de 10°C/min até 230°C. Tempo total de programação = 20 min.

C.2. Parte Sintética.

As análises espectroscópicas foram realizadas somente para os produtos finais de cada reação, portanto, nesta seção não iremos apresentar os dados espectrais dos compostos intermediários.

C.2.1. Procedimento para síntese de 2- (feniltio) ciclohexanona (7)².

Em um balão de 50 mL, adicionou-se o tiofenol (1,1 g, 10 mmol) em 30 mL de diclorometano. Agitou-se em banho de gelo por 10 min e adicionou-se K₂CO₃ (4,14 g, 30 mmol) e em seguida o 2-cloro-ciclohexanona (1,33 g, 10 mmol). Após este tempo, adicionou-se lentamente trietilamina (1,01 g, 10 mmol). As reações ocorreram num período de 1 à 2 h. Em seguida, adicionou-se uma solução saturada de NH₄Cl e extraiu-se a fase orgânica com diclorometano (3 x 50 mL), secou-se com MgSO₄, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna usando como mistura de eluentes hexano: acetato de etila, 1:1.

F.M. C₁₂H₁₄OS, **M.M.** 206, líquido amarelo de odor forte.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2,36-1,61 (m, 7H); 2,98-2,82 (m, 1H); 3,89-3,79 (m, 1H); 7,32-7,18 (m, 3H); 7,42-7,36 (m, 2H).

RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 207,84 (C=O); 133,75 (C₀); 131,74 (2 CH); 128,89 (2 CH); 127,29 (CH) ; 56,32 (CH); 38,96 (CH₂); 33,85 (CH₂); 27,22 (CH₂); 22,52 (CH₂).

I.V. (KBr) (cm⁻¹): 3057-2862 (C-H); 1708 (C=O); 745 (aromat.).

E.M. (m/z) (%rel.): 110 (100); 206 (45); 41 (40); 69 (17).

Rendimento: 75 %.

C.2.2. Procedimento para síntese de 2- (fenilselênio) ciclohexanona (8)³.

Em um balão de 2 bocas de 25 mL sob atmosfera inerte de nitrogênio preparou-se uma solução de diisopropilamina (0,504 g, 5 mmol) em THF seco. Em seguida, adicionou-se *n*- butil- lítio (4,3 mL, solução 1,3M em hexano) à -78°C , e deixou-se sob agitação por 1h. Após este tempo, adicionou-se lentamente a ciclohexanona (0,49 g, 5 mmol) e deixou-se sob agitação por 45 minutos nesta temperatura. Em outro balão, preparou-se uma solução de difenildisseleneto (0,94 g, 3 mmol) em THF seco e deixou-se em agitação à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se bromo (0,48 g, 3 mmol) e transferiu-se lentamente com uma seringa, o brometo de selenelila formado para o balão contendo a ciclohexanona na forma enólica à -78°C e deixou-se em agitação até chegar à temperatura ambiente. A reação ocorreu num período de 40 minutos à 1 h. Após este tempo, lavou-se a solução com uma solução de HCl 1N (2 x 30 mL) e em seguida, extraiu-se a fase orgânica com uma mistura de hexano/éter etílico 5:5 (3 x 50 mL), secou-se com MgSO_4 , filtrou-se e evaporou-se o solvente. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna usando como mistura de eluentes hexano: acetato de etila 9:1. Rendimento: 61%.

F.M. $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{OSe}$, **M.M.** 254, líquido amarelo de odor forte.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 2,35-1,67 (m, 7H); 3,02-2,92 (m, 1H); 3,93-3,89 (m, 1H); 7,38-7,25 (m, 3H); 7,67-7,52 (m, 2H).

RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 207, 80 ($\text{C}=\text{O}$); 134,61 (2 CH); 129,19 (2 CH); 128,60 (C_0); 128,09 (CH); 51,58 (CH); 38,52 (CH_2); 34,01 (CH_2); 26,87 (CH_2); 22,90 (CH_2).

I.V. (KBr) (cm^{-1}): 3056-2859 (C-H); 1701 (C=O); 740 (aromat.).

E.M (m/z) (%rel.): 41 (100); 69 (40); 254 (36); 158 (35); 78 (28).

C.2.3 Procedimento para síntese de 2- (fenilselênio) ciclopentanona (9)³.

Em um balão de 2 bocas de 25 mL sob atmosfera inerte de nitrogênio preparou-se uma solução de diisopropilamina (0,504 g, 5 mmol) em THF seco. Em seguida, adicionou-se *n*- butil- lítio (4,3 mL, solução 1,3M em hexano) à -78°C , e deixou-se sob agitação por 1h. Após este tempo, adicionou-se rapidamente a ciclopentanona (0,42 g, 5 mmol) e deixou-se sob agitação por 45 minutos nesta temperatura. Em outro balão, preparou-se uma solução de difenildisseleneto (0,94 g, 3 mmol) em THF seco e deixou-se sob agitação à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se bromo (0,48 g, 3 mmol) e transferiu-se lentamente, com uma seringa, o brometo de selenelila formado para o balão contendo a ciclohexanona na forma enólica à -78°C e deixou-se sob agitação até atingir a temperatura ambiente. A reação ocorreu num período de 30 minutos e em seguida, lavou-se com uma solução de HCl 1N (2 x 30 mL) e, extraiu-se a fase orgânica com uma mistura de hexano/éter etílico 5:5 (3 x 50 mL), secou-se com MgSO_4 , filtrou-se e evaporou-se o solvente. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna usando como mistura de eluentes hexano/acetato de etila 8:2. Rendimento: 52%.

F.M. $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{OSe}$, **M.M.** 240, líquido amarelo de odor forte.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 2,47-1,83 (m, 6H); 3,70-3,66 (m, 1H); 7,17-7,28 (m, 3H); 7,51-7,55 (m, 2H)

RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 213,4 ($\text{C}=\text{O}$); 134,30 (2 CH); 130,53 (C_0); 128,13 (2 CH); 127,40 (CH); 45,4 (CH); 35,26 (CH_2); 29,75 (CH_2); 19,93 (CH_2).

I.V. (KBr) (cm^{-1}): 3056-2869 (C-H); 1729 (C=O); 739 (aromat.)

E.M (m/z) (%rel.): 55 (100); 240 (74); 77 (53); 184 (47); 78 (38); 83 (32).

C.3. Síntese dos Compostos (10) a (13)

C.3.1. Procedimento geral para a síntese dos brometos carboxilados (21a) e (21b)².

Em um balão de 125 mL, pesou-se o (oxociclohexano carboxilato de etila e metila; 2,5g, 14,5 mmol) e dissolveu-se em 40 mL de acetona anidra e agitou-se por 5 minutos. Após este tempo, adicionou-se carbonato de potássio (8,12 g, 58 mmol) e agitou-se à reação a temperatura ambiente por 1h. Em seguida, adicionou-se lentamente os correspondentes dibrometos (1,3-dibromohexano (**1a**) ou 1,6-dibromohexano (**1b**), 30 mmol) e colocou-se a reação em refluxo por 20 h. Após este tempo, filtrou-se a solução em um funil de placa porosa e rotaevaporou-se o solvente. Os produtos foram purificados por cromatografia de coluna usando hexano como eluente.

Brometo (21a)

F.M. C₁₀H₁₄BrO₃R
M.M. 262, líquido
incolor, rendimento 63%.

Brometo (21b)

F.M. C₁₃H₂₀BrO₃R M.M. 306,
líquido incolor, rendimento 70%

C.3.2. Procedimento geral para síntese dos sulfetos carboxilados (22a) e (22b)⁴.

Em um balão de 100 mL, adicionou-se o tiofenol (0,748 g, 6,8 mmol) em 30 mL de diclorometano e agitou-se por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se carbonato de potássio (1,4 g, 10 mmol), agitou-se por 30 minutos e os correspondentes brometos **1a** e **1b** (6,1 mmol). Em seguida, adicionou-se lentamente trietilamina (0,69 g, 6,8 mmol) e as reações ocorreram num período de 10 à 12 h. Após este tempo, lavou-se com uma solução saturada de NH₄Cl (2 x 20 mL) e extraiu-se a fase orgânica com diclorometano (3 x 30 mL), secou-se sob MgSO₄, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna usando como mistura de eluentes hexano:acetato de etila 9:1.

Sulfeto (22a)

F.M. $C_{16}H_{19}O_3RS$, **M.M.** 291, líquido amarelo de odor forte, rendimento: 72%.

Sulfeto (22b)

F.M. $C_{19}H_{25}O_3RS$, **M.M.** 333, líquido amarelo de odor forte, rendimento: 78%

C.3.3. Procedimento geral para a síntese de selenetos carboxilados (25a) e (25b)⁴.

Em um balão de 2 bocas de 25 mL, preparou-se uma solução de difenildisseleneto (1 g, 3,6 mmol) em etanol anidro (40 mL) e deixou-se sob agitação por 5 minutos. Após este tempo, adicionou-se lentamente borohidreto de sódio, até a solução tornar-se branca e deixou-se em agitação por 20 minutos. Em seguida, adicionou-se rapidamente os correspondentes brometos **1a** e **1b** (6,1 mmol) e as reações ocorreram num período de 1 à 2 h. Após este tempo, lavou-se com solução saturada de NaCl (2 x 20 mL) e extraiu-se a fase orgânica com diclorometano (3 x 30 mL), secou-se sob $MgSO_4$, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna usando com eluentes hexano: acetato de etila 9:1.

Seleneto (25a)

F.M. $C_{16}H_{19}O_3RSe$, **M.M.** 338, líquido amarelo de odor forte, rendimento 78%.

Seleneto (25b)

F.M. $C_{19}H_{25}O_3RSe$, **M.M.** 384, líquido amarelo de odor forte, rendimento 76%

C.3.4. Procedimento geral para descarboxilação dos compostos (22a), (22b), (25a) e (26b)⁵.

Em um balão de 2 bocas de 25 mL sob atmosfera inerte de nitrogênio preparou-se uma suspensão de iodeto de potássio (1,1 g, 6,6 mmol) em 2,6- lutidina recém destilada (6,44 g, 6,6 mmol). Esta suspensão foi mantida sob agitação e em refluxo por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se o sulfeto ou o seleneto correspondente (6,5 mmol) e as reações ocorreram num período de 24 à 30 h. Após este tempo, lavou-se com uma solução de HCl 6 M (2 x 20 mL) e extraiu-se a fase orgânica com diclorometano (3 x 30 mL), secou-se com MgSO₄, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna usando como mistura de eluentes hexano: acetato de etila 9:1.

Os Compostos de Selênio e de Enxofre descarboxilados pelo procedimento acima são estes à seguir.

2-[3-(feniltio)propil] ciclohexanona (10)

F.M. C₁₅H₂₀OS, **M.M.** 248, líquido amarelo de odor forte.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2,43-1,26 (m, 13 H); 3,01-2,77 (m, 2H); 7,19-7,12 (m, 1H); 7,37-7,22 (m, 4H).

RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 212,86 (C=O); 136,77 (C₀); 128,98 (2 CH); 128,83 (2 CH); 125,74 (1 CH); 50,0 (CH); 41,76 (CH₂); 33,94 (CH₂); 33,71 (CH₂); 28,66 (CH₂); 27,97 (CH₂); 26,82 (CH₂); 24,90 (CH₂).

I.V. (KBr) (cm⁻¹): 3056-2859 (C-H); 1707 (C=O); 741 (aromat.).

E.M. (m/z) (%rel.): 139 (100); 41 (81); 55 (65); 69 (47); 248 (26).

Rendimento: 43 %

2-[6-(feniltio)hexil] ciclohexanona (11)

F.M. C₁₈H₂₆OS, **M.M.** 290, líquido amarelo de odor forte.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2,40-1,13 (m, 19H); 2,92-2,87 (t, *J* 7,2 Hz 2H); 7,17-7,12 (m, 1H); 7,33-7,23 (m, 4H).

RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 213,45 (C=O); 137,04 (C₀); 128,88 (2 CH); 128,81 (2 CH); 125,64 (CH); 50,73 (CH); 41,97 (CH₂); 33,87 (CH₂); 33,58 (CH₂); 29,34 (CH₂); 29,29 (CH₂); 29,11 (CH₂); 28,70 (CH₂); 28,03 (CH₂); 27,05 (CH₂); 24,85 (CH₂).

I.V. (KBr) (cm⁻¹): 3056-2856 (C-H); 1708 (C=O); 740 (aromat.).

E.M. (m/z) (%rel.): 40 (100). 55 (70); 110 (66); 123 (33); 290 (25).

Rendimento: 41 %

2-[3-(fenilselênio)propil] ciclohexanona (12)

F.M. $C_{15}H_{20}OSe$, **M.M.** 296, líquido amarelo de odor forte.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 2,46-1,26 (m, 13H); 2,98-2,82 (m, 2H); 7,32-7,18 (m, 3H); 7,58-7,40 (m, 2H);

RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 212,82 ($C=O$); 132,44 (2 $\underline{CH}$); 130,50 ($\underline{C}_0$); 128,96 (2 $\underline{CH}$); 126,64 ($\underline{CH}$); 50,23 ($\underline{CH}$); 41,97 ($\underline{CH}_2$); 33,92 ($\underline{CH}_2$); 29,65 ($\underline{CH}_2$); 27,95 ($\underline{CH}_2$); 27,88 ($\underline{CH}_2$); 27,82 ($\underline{CH}_2$); 24,88 ($\underline{CH}_2$).

I.V. (KBr) (cm^{-1}): 3055-2858 (C-H); 1707 (C=O); 692 e 737 (aromat.).

E.M. (m/z) (%rel.): 139 (100); 55 (82); 77 (63); 67 (58); 110 (38).

Rendimento: 36 %.

2-[6-(fenilselênio)hexil] ciclohexanona (13)

F.M. $C_{18}H_{26}OSe$, **M.M.** 338, líquido amarelo de odor forte.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 2,40-1,12 (m, 19H); 2,93-2,85 (t, J 7,5 Hz, 2H); 7,27-7,18 (m, 3H); 7,49-7,44 (m, 2H).

RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 213,42 ($C=O$); 132,37 (2 $\underline{CH}$); 130,71 ($\underline{C}_0$); 128,96 (2 $\underline{CH}$); 126,57 ($\underline{CH}$); 50,72 ($\underline{CH}$); 41,96 ($\underline{CH}_2$); 33,86 ($\underline{CH}_2$); 30,10 ($\underline{CH}_2$); 29,68 ($\underline{CH}_2$); 29,33 ($\underline{CH}_2$); 29,20 ($\underline{CH}_2$); 28,02 ($\underline{CH}_2$); 27,89 ($\underline{CH}_2$); 27,04 ($\underline{CH}_2$); 24,83 ($\underline{CH}_2$).

I.V. (KBr) (cm^{-1}): 3055-2855 (C-H); 1708 (C=O); 737 (aromat.)

E.M. (m/z) (%rel.): 55 (100); 41 (85); 83 (43); 69 (35); 67 (30); 338 (14).

Rendimento: 39 %

C.4. Procedimento para síntese do (*E*)-[3-(feniltio)-2-propen-1-il]ciclohexanona (14)⁶.

Em um balão de 250 mL, pesou-se o (*E*)-[3-(fenilsulfinil)-2-propenil]-ciclohexanona (2 g, 7,6 mmol) e dissolveu-se em 150 mL de ácido acético. Adicionou-se 13,65 g de zinco ativado (2,62 mmol) e deixou-se a reação sob agitação por 3h. A mistura reacional foi diluída em éter etílico, filtrou-se em celite e neutralizou-se com uma solução de NaOH 5N. Extraíu-se a fase orgânica com éter etílico (3 x 30 mL), secou-se com MgSO₄ e evaporou-se o solvente. O produto foi purificado por cromatografia em coluna usando como mistura de eluentes hexano:acetato de etila 9:1. Rendimento: 90%.

F.M. C₁₅H₁₈OS, **M.M.** 246, sólido cristalino branco.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2,43-1,25 (m, 11H); 5,92-5,74 (m, 2H); 6,20-6,15 (d, *J* 15 Hz, 1H, *trans*); 6,32-6,29 (d, *J* 9,6 Hz, 1 H, *cis*); 7,37-7,16 (m, 5H).

RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 211,43 (C=O); 135,98 (C₀); 129,04 (CH); 128,98 (CH); 126,41 (CH); 125,30 (CH); 123,96 (CH); 47,80 (CH₂); 41,35 (CH₂); 35,88 (CH); 31,02 (CH₂); 30,82 (CH₂); 25,21 (CH₂).

I.V. (KBr) (cm⁻¹): 2931 (C-H); 1702 (C=O); 747 (aromat.).

E.M (m/z) (%rel.): 149 (100,0); 41 (78); 116 (55); 115 (33); 136 (32); 147 (28); 55 (28); 246 (26).

C.5. Produtos obtidos das reações biocatalíticas.**(E)-[3-(fenilsulfinil)-2-propenil]-ciclohexanol (14a).**

F.M. C₁₅H₂₀O₂S, **M.M.** 264, líquido amarelo de odor forte.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2,20-0,79 (m, 12H); 4,15-4,06 (m, 1H); 6,26-6,21 (d, *J* 25 Hz, 1H, trans); 6,63-6,53 (m, 1H); 7,54-7,46 (m, 3H); 7,62-7,58 (m, 2H).

RMN ¹³C (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 144,195; 144,15; 139,81; 139,12; 136,18; 136,09; 136,06; 130,95; 130,89; 129,36; 129,33; 124,51; 70,40; 66,40; 39,26; 36,05; 35,48; 32,96; 31,94; 31,80; 31,31; 29,06; 23,84; 22,64; 19,83.

I.V. (KBr) (cm⁻¹): 3415 (O-H); 3056-2855 (C-H); 1038 (S=O); 749 (aromat.).

E.M (m/z) (%rel.): 97 (100); 41 (99); 55 (75); 81 (65); 77 (52); 110 (46); 67 (38); 149 (32); 247 (24).

Rendimento: 25 %.

2- (feniltio) ciclohexanol (7a)

F.M. C₁₂H₁₆OS, **M.M.** 208, líquido amarelo de odor forte.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2,37-1,25 (m, 14H); 2,15 (m, 2H); 2,4 (sl, 2H); 3,37-3,32 (q, *J* 4,5 Hz, 2H); 3,79-3,75 (m, 2H); 7,76-7,21 (m, 10H).

RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 133,74; 132,13; 129,01; 128,87; 127,72; 127,23; 72,02; 67,06; 56,48; 54,36; 33,77; 32,66; 31,66; 27,71; 26,12; 24,81; 24,25; 20,40.

I.V. (KBr) (cm⁻¹): 3381 (O-H); 3058-2859 (C-H); 751 (aromat.).

E.M (m/z) (%rel.): 110 (100); 40 (74); 81 (52); 41 (30); 79 (27); 208 (20); 51 (16).

Rendimento: 75 %.

2-(fenilselênio) ciclohexanol (8a).

F.M. $C_{12}H_{16}OSe$, **M.M.** 255, líquido amarelo de odor forte.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 1,50 -1,00 (m, 6H); 2,05 – 1,55 (m, 8H); 2,1 (m, 2H); 2,4 (sl, 2H); 2,94-2,85 (m, 1H); 3,36-3,28 (m, 1H); 3,54-3,49 (m, 1H); 3,74-3,70 (q, J 3,3 Hz, 1H); 7,36- 7,19 (m, 4H); 7,65-7,48 (m, 6H).

RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 136,07; 134,39; 129,11; 128,97; 128,10; 127,6; 72,21; 68,22; 53,52; 33,84; 33,37; 32,42; 29,05; 26,84; 25,13; 24,44; 20,89.

I.V. (KBr) (cm^{-1}): 3441 (O-H); 3055-2855 (C-H); 739 (aromat.).

E.M (m/z) (%rel.): 81 (100), 158 (64); 78 (36); 156 (33); 41 (30); 256 (26); 77 (23).

Rendimento: 45 %.

2-(fenilselênio) ciclopentanol (9a).

F.M. $C_{11}H_{14}OSe$, **M.M.** 241, líquido amarelo de odor forte.

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 1,91-1,57 (m, 7H); 2,10-2,03 (m, 1H); 2,31-2,23 (m, 1H); 7,30-7,25 (m, 3H); 7,59-7,52 (m, 2H).

E.M (m/z) (%rel.): 67 (100), 77 (55,1); 158 (38,3); 85 (23,4); 242 (16,0)

C.6. Bibliografia.

1. Assupção, R. M. V.; Morita, T. *Manual de Soluções e Reagentes e Solventes*. Ed. Edgard Blucher e Ed. da USP. **1968**.
2. Teixeira, L. H.P.; Barreiro, E.; Fraga, C. A. M. *Synth Comm.* **1997**, 27, 3241.
3. Back, T.G. *em Organoselenium Chemistry: A Practical Aproach*. Engman, L.; Gupta, V.; Oxford University Press: Londres, **1999**. Capítulo 4, pg 71. ISBN 0-19-850141-2.
4. Carreno, M. V. *Chem Rev.* **1995**, 95, 1717.
5. Gilman, H. *em Organic Syntheses*. John Wiley & Sons: Nova Iorque, **1973**. Volume V, pg 76. ISBN 0-471-05707-X.
6. Hua, D. H.; Venkaratan, S.; Jo Coulter, M.; Gurudas-Zindde, G. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 719.

Parte Experimental

Parte D

Parte Experimental – Parte D.**D.1. Procedimento para síntese de (E)-[3-(fenilsulfinil)-2-propenil]-ciclohexanona (31)¹.**

Em um balão de 2 bocas de 25 mL sob atmosfera inerte de nitrogênio preparou-se uma solução de diisopropilamina (0,504 g, 5mmol) em THF seco. Em seguida, adicionou-se *n*- butil- lítio (4,3 mL, solução 1,3M em hexano) à -78°C , e deixou-se em agitação por 1h. Em outro balão de 2 bocas de 125 mL, sob atmosfera inerte de nitrogênio, preparou-se uma solução do (fenilalil) sulfóxido (0.83 g, 5 mmol) em THF seco a -78°C . Em seguida, transferiu-se lentamente a solução resfriada (-78°C) de diisopropilamina de lítio (LDA) para este balão. Durante a mistura destes reagentes, obteve-se uma solução de cor amarela forte e agitou-se por 1 h à -78°C , e então adicionou-se a 2-ciclohexenona (0,49 g, 5 mmol) e deixou-se em agitação até chegar à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 0.72 g (12 mmol) de ácido acético em 2 mL de éter etílico e lavou-se com uma solução saturada de NH_4Cl (2 x 20 mL) e em seguida, extraiu-se a fase orgânica com éter etílico (3 x 30 mL), secou-se com MgSO_4 , filtrou-se e evaporou-se o solvente. O produto foi purificado por cromatografia em coluna usando como mistura de eluentes hexano/acetato de etila 1:1. Rendimento: 62 %.

F.M. $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{S}$, **M.M.** 262, líquido viscoso amarelo de odor forte.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 2,43-1,25 (m, 11H); 6,30-6,24 (m, 1H, SCH=); 6,60-6,49 (m, 1 H, CH); 7,55-7,48 (m, 3H); 7,62-7,58 (m, 2H).

RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 210,48 (C=O); 143,94 (C_0); 137,13; 137,0; 136,95; 131,03; 131,0; 129,37; 129,26; 124,43; 124,39; 53,38; 47,55; 41,15; 38,61; 38,53; 38,24; 30,73; 30,69; 24,84; 24,81.

I.V. (KBr) (cm^{-1}): 2933-2865 (C-H); 1708 (C=O); 1040 (S=O); 1629 (C=C); 750 (aromat.).

E.M (m/z) (%rel.): 41 (100), 55 (71); 69 (55); 77 (22); 97 (27); 109 (24); 137 (8); 246 (2); 262 (1).

D.1.1. Procedimento para síntese do (*E*)-[(3-feniltio)-2-propen-1-il] ciclohexanona (14)¹.

Em um balão de 250 mL, adicionou-se o sulfóxido (31) (2 g, 7,6 mmol) em 150 mL de ácido acético. Em seguida, adicionou-se 13,65 g de zinco ativado (2,62 mmol) e deixou-se a reação sob agitação por 3h. A mistura reacional foi diluída em éter etílico, filtrou-se em celite e neutralizou-se com uma solução de NaOH 5N. Extraíu-se a fase orgânica com éter etílico (3 x 30 mL), secou-se com MgSO_4 e evaporou-se o solvente. O produto foi purificado por cromatografia em coluna usando como mistura de eluentes hexano:acetato de etila 9:1. Rendimento: 90%.

F.M. $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{OS}$, **M.M. 246**, sólido cristalino branco.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 2,43-1,25 (m, 11H); 5,92-5,74 (m, 2H); 6,20-6,15 (dt, J 15 Hz, 1H, *trans*); 6,32-6,29 (dt, J 9,6 Hz, 1 H, *cis*); 7,37-7,16 (m, 5H).

RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 211,43 (C=O); 135,98 (C_0); 129,04 (CH); 128,98 (CH); 126,41 (CH); 125,30 (CH); 123,96 (CH); 47,80 (CH_2); 41,35 (CH_2); 35,88 (CH); 31,02 (CH_2); 30,82 (CH_2); 25,21 (CH_2).

I.V. (KBr) (cm^{-1}): 2931 (C-H); 1702 (C=O); 747 (aromat.).

E.M (m/z) (%rel.): 149 (100); 41 (77); 116 (54); 115 (33); 136 (32); 147 (28); 55 (28); 246 (25).

D.1.2. Procedimento para a síntese do (*E*) – 2 – [(feniltio)metileno] biciclo [3.3.1] nonan – 1 - ol (32)¹.

Em um balão de 100 mL, pesou-se o (*E*)-[(3-feniltio)-2-propen-1-il]ciclohexanona (**14**) (0,81 g, 3,31 mmol) e dissolveu-se em 10 mL de ácido acético recém tratado. Em seguida, adicionou-se uma solução de 1 mL (9,1 mmol) de cloreto de titânio (IV) em 10 mL de ácido acético. Agitou-se esta solução por 20 minutos, e adicionou-se 0,3 mL (16,6 mmol) de água, e novamente deixou-se a solução sob agitação por 10 minutos. Após este tempo, esta mistura foi diluída com 20 mL de éter etílico, filtrou-se em celite e neutralizou-se com uma solução aquosa de bicarbonato de sódio. Após este tempo, separou-se a fase orgânica e lavou-se a fase aquosa com éter etílico (2 x 30 mL). Em seguida, juntou-se as fases orgânicas e secou-se com MgSO₄, filtrou-se e evaporou-se o solvente. O produto foi purificado por cromatografia em coluna usando como mistura de eluentes hexano:acetato de etila 9:1. Rendimento: 51 %.

Esta reação se mostrou dependente com o tempo reacional, os resultados estão na Parte C- Resultados e Discussão.

F.M. C₁₅H₁₈OS, **M.M.** 246, sólido branco.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,46 (m, 3H); 1,58 (dd, *J* 2,4 Hz e 10,5Hz, 1H); 1,69 (m, 3H); 1,81 (m, 1H); 1,96 (sl, 1H); 2,15 (dt, *J* 2,4 e 17,4 Hz, 1H); 2,36 (m, 1H); 2,54 (ddd, *J* 2,4 e 6,6 Hz, 1H); 6,18 (t, *J* 2,4 Hz, 1H); 7,21- 7,13 (m, 1H); 7,37-7,22 (m, 4H).

RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 150,45 (C₀); 136,59 (C₀); 128,98 (CH); 128,54 (CH); 126,06 (CH); 80,72 (C-OH); 47, 05 (CH₂) 40,56 (CH₂); 34,57 [CH₂]; 32,0 (CH₂); 30,20 [CH₂]; 20,10 [CH₂].

I.V. (KBr) (cm⁻¹): 3256 (OH); 2934 (CH); 741 (aromat.).

E.M (m/z) (%rel.): 203 (100), 41 (64); 95 (40); 77 (34); 246 (32); 125 (23).

D.1.3. Procedimento para ciclização do composto (14) utilizando a condição HCO₂H 88%-CF₃CO₂H (catalítico)¹.

Em um balão de 100 mL, pesou-se o (*E*)-[(3-feniltio)-2-propen-1-il]ciclohexanona (**14**) (0,2 g, 0,81 mmol) e dissolveu-se em mL de ácido fórmico e em seguida, adicionou-se 0,1 mL de ácido trifluoracético. Agitou-se esta solução por 3 horas à 70°C, resfriou-se, adicionou-se 200 mL de éter etílico e neutralizou-se com uma solução de NaOH 5N. Após este tempo, separou-se a fase orgânica e lavou-se a fase aquosa com éter etílico (2 x 30 mL). Em seguida, juntou-se as fases orgânicas e secou-se com MgSO₄, filtrou-se e evaporou-se o solvente. O produto foi purificado por cromatografia em coluna usando como mistura de eluentes hexano:acetato de etila 9:1.

D.2. Bibliografia.

1. (a) Hua, D. H.; Venkaratan, S.; Jo Coulter, M.; Gurudas-Zindde, G. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 719. (b) Haynes, R. K.; Katsifis, A. G.; Vonwiller, S. C.; Hambley, T. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 5423.

Capítulo IV

Anexos

Anexo 1. Espectro de IV do composto 2a.

Anexo 2. Espectro de RMN ¹H do composto 2a.

Anexo 5. Espectro de RMN ^1H do composto **2b**.

Anexo 6. Espectro de RMN ^{13}C do composto **2b**.

Anexo 7. Espectro de IV do composto 2c.

Anexo 11. Espectro de RMN ¹H do composto 2d.

Anexo 12. Espectro de RMN ¹³C do composto 2d.

Anexo 15. Espectro de RMN ^{13}C do composto **3a**.

Anexo 16. Espectro de IV do composto **3b**.

Anexo 17. Espectro de RMN ¹H do espectro **3b**.

Anexo 18. Espectro de RMN ¹³C do composto **3b**.

BOMEM MB-100
03/01/05 09:31
Arquivo= 11180
Descrição: PhSo2Pro

CENTRAL ANALÍTICA-IQUSP

Scans = 20
Res = 4 cm⁻¹
Mode = 2 (Mid-IR)
Apod = Casine

Transmittance / Wavenumber (cm⁻¹)

Anexo 19. Espectro de IV do composto 3c.

Anexo 20. Espectro de RMN ¹H do composto 3c.

Anexo 21. Espectro de RMN ^{13}C do composto 3c.

Anexo 22. Espectro de IV do composto 3d.

Anexo 23. Espectro de RMN ^1H do composto 3d.

Anexo 24. Espectro de RMN ^{13}C do composto 3d.

Anexo 25. Espectro de RMN ^1H do composto 7.

Anexo 26. Espectro de RMN ^{13}C do composto 7.

Anexo 27. Espectro de RMN ^1H do composto 8.

Anexo 28. Espectro de RMN ^{13}C do composto 8.

Anexo 29. Espectro de RMN ^1H do composto 9.

Anexo 30. Espectro de RMN ^1H do composto 9.

Anexo 31. Espectro de IV do composto **10**.

Anexo 32. Espectro RMN ¹H do composto **10**.

Anexo 33. Espectro RMN ^{13}C do composto 10.

Anexo 34. Espectro de Dept do composto 10.

Anexo 35. Espectro de IV do composto 11.

Anexo 36. Espectro de RMN ¹H do composto 11.

Anexo 37. Espectro de RMN ^{13}C do composto 11.

Anexo 38. Espectro de DEPT do composto 11.

Anexo 39. Espectro de IV do composto 12.

Anexo 40. Espectro de RMN ¹H do composto 12.

Anexo 41. Espectro de RMN ^{13}C do composto 12.

Anexo 42. Espectro de DEPT do composto 12.

Anexo 43. Espectro de IV do composto 13.

Anexo 44. Espectro de RMN ¹H do composto 13.

Anexo 45. Espectro de RMN ^{13}C do composto 13.

Anexo 46. Espectro de DEPT do composto 13.

Anexo 47. Espectro de RMN ^1H do composto 7a.

Anexo 48. Ampliação do espectro de RMN ^1H do composto 7a.

Anexo 49. Espectro de RMN ^{13}C do composto 7a.

Anexo 50. Espectro de DEPT do composto 7a.

Anexo 51. Espectro de RMN ^1H do composto 8a.

Anexo 52. Ampliação do espectro de RMN ^1H do composto 8a.

Anexo 53. Espectro de RMN ^{13}C do composto **8a**.

Anexo 54. Espectro de HMQC do composto **8a**.

Anexo 55. Espectro de RMN ^1H do composto 9a.

Anexo 56. Ampliação do espectro de ^1H RMN do composto 9a.

Anexo 57. Espectro de RMN ¹H do composto 14.

Anexo 58. Ampliação do espectro de RMN ¹H do composto 14.

Anexo 59. Espectro de RMN ^{13}C do composto 14.

Anexo 60. Espectro de RMN ^1H do composto 14a.

Anexo 61. Ampliação do Espectro de RMN ¹H do composto 14a.

Anexo 62. Espectro de RMN ¹³C do composto 14a.

Anexo 63. Espectro de IV do composto 31.

Anexo 64. Espectro de RMN ¹H do composto 31.

Anexo 65. Ampliação do espectro de RMN ^1H do composto 31.

Anexo 66. Espectro de RMN ^{13}C do composto 31.

Anexo 67. Espectro de IV do composto **32**.

Anexo 68. Espectro de RMN ¹H do composto **32**.

Anexo 69. Ampliação do espectro de RMN ^1H do composto **32**.

Anexo 70. Espectro de COSY do composto **32**.

Anexo 71. Espectro de HMQC do composto **32**.